

平成 10 年度環境庁委託業務結果報告書

内分泌攪乱化学物質影響調査研究

平成 11 年 3 月

財団法人 日本公衆衛生協会

目 次

はじめに	1
第1章 内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムに関する調査研究	3
1. 内分泌攪乱物質の作用点に関する考察	5
2. 内分泌攪乱化学物質等の生殖毒性物質と精子形成障害との関連	28
ー生殖細胞死を中心として	
3. 比較胎生病理学からみた内分泌攪乱	38
4. 産業化学物質の生殖毒性に関する文献的研究	48
5. 次世代影響としての神経行動毒性評価と今後の研究課題	65
6. 魚類の生殖と性ステロイドホルモン	89
(内分泌攪乱化学物質の生殖への影響を解析する研究モデル)	
7. 内分泌攪乱化学物質等の環境因子の試験動物モデルとしてのメダカ	104
8. 奇形カエルと内分泌攪乱化学物質	184
第2章 先天奇形サーベイランスに関する調査研究	201
1. 内分泌攪乱化学物質の人への影響調査方法の研究	203
2. 日本母性保護産婦人科医会・外表奇形等調査の解析	207
3. 先天奇形を指標とした環境モニタリング	210
4. 泌尿器科領域での奇形発生状況の分析	217
5. 尿道下裂の疫学調査の検討	223

はじめに

人や野生動物の内分泌作用を攪乱し、生殖機能障害、先天奇形等を引き起こす可能性のある内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）による環境汚染は、科学的には未解明な点が多く残されているものの、生物生存の基本的条件に関わるものであり、世代を超えた深刻な影響をもたらすおそれがあることから環境保全上の重要課題である。

本業務では、内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムに関する科学的知見の整理、内分泌攪乱化学物質と先天奇形との関連を調べるサーベイランス等についての検討を実施したが、本報告書はその成果をとりまとめたものである。

本報告書は、2部構成となっており、「第1章 内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムに関する調査研究」においては、各分野の専門家に依頼し、内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムに関する文献の調査とともに、今後の調査研究の方策についてまとめている。「第2章 先天奇形サーベイランスに関する調査研究」においては、内分泌攪乱化学物質との関連が特に疑われている生殖器奇形を中心にその発生状況・関連性を検討するとともに、本邦及び諸外国の出生児の先天奇形の発生の動向を把握するシステムについて検討している。

第 1 章

内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムに関する調査研究

1. 内分泌攪乱物質の作用点に関する考察

東京大学分子細胞生物学研究所

教授 加藤 茂 明

1. 内分泌攪乱物質の分子作用メカニズムについての考察

1-1. 内分泌攪乱物質の生物化学的（科学的）定義は何か？

内分泌攪乱物質は、内分泌を攪乱する人工化合物として一般的には捉えられてきてはいるが、化学的に正確な定義はされていない。定義を明確にするには、既に内分泌攪乱物質として認知されている人工化合物の作用点、即ち生体内標的分子を同定することが、絶対先決であると思われる。このような標的分子については、到底一種とは思えず複数存在すると思われるが、その生物活性を考えると無数ではなく、限られた数の分子であると推定される。

このような標的分子群が具体的に同定された時、初めて内分泌攪乱物質群のクラス分けが可能となろう。更にこのような標的分子別のクラス分けが最も意味を持つのは、既知の人工化合物ばかりではなく、生物活性未知の人工化合物群の予見的評価であろう。内分泌攪乱活性を有することが既に知られている化合物と類似の化学構造を有する化合物群の危険性を、いち早く予見されることが可能となろう。

それではこのような標的分子群を活性評価系に持ち込む方法論は如何なるものであるか？内分泌攪乱物質の作用が性転換に代表されるように遺伝形成を変えるものでもあるため、その標的分子群は遺伝情報を制御する転写制御因子群である可能性が高い。転写制御因子群はDNA結合能を持つタンパク質であるので、それらcDNAを用いた分子生物学的手法により、簡単に生物活性を保持したタンパクを大量に作ることが十分量そして迅速に調製することが可能である。同様に分子生物学的手法により、転写制御因子としての機能への影響も短時間で評価が可能である。実際このような手法を用いることで、性ステロイドホルモン誘導体が数多く人工合成され、本来のホルモン活性を増強もしくは阻害する化合物が数多く開発されている。このことからこの系の有効性については実証済みである。従って、このような分子生物学的手法に基づいた評価系を導入することで、初めて内分泌攪乱物質候補化合物を短時間に効率良く評価することが可能と考えられる。

1-2. 内分泌攪乱物質の現状調査は、果たして、内分泌攪乱物質汚染除去の根本的解決法になりうるか？

内分泌攪乱物質による環境汚染によって引き起こされるヒトを含めた生物への害は、様々な形で、研究調査されている。

1) は、ダイオキシンを始めとした内分泌攪乱物質と目される化合物群の汚染源を調べる調査である。これによって大気中、地中、そして生物体中の存在量が調べられている。しかし前にも述べたように、内分泌攪乱物質群の作用点は複数であること、

また化学的測定法に限界があって類似の化合物群や代謝体などを同時に測定できない。従って、このような調査においては、あくまでも代表的な内分泌攪乱物質を指標とした汚染の”目安”を示すにすぎない。全く内分泌攪乱作用点の異なる化合物群についての測定は、場合によっては完全に欠落してしまう可能性が考えられる。

2) としては、性転換生物個体数の調査である。内分泌攪乱物質の影響によると考えられる性転換が、様々な生物で報告されている。しかし、性決定は決して1つの段階で成り立つものではなく、複数の複雑なステップを経ていて、内分泌攪乱物質作用点は複数と予想される。従ってこのような方法は1) の陥る全く同じ欠点であり、これも異なった種類の化合物が異なった作用点に作用し性転換を引き起こしている可能性が否めない。従って性転換生物個体数もあくまでも汚染の1つの”目安”に過ぎないように思う。

この報告者は決して1)、2) の有用性を否定するものではない。このようなアプローチがあってこそ、内分泌攪乱物質汚染の実態が浮き彫りにされ、世間にも強い関心と認識を喚起することができたことは言を待たない。しかし次の最も重要な布石は、1)、2) の結果をふまえた内分泌攪乱物質作用点の解明であろう。このような作用点を決める研究は、1)、2) とは全く異質な方法論の開発が必要であり、さしあたっては、分子生物学的手法に基づいた基礎研究の展開が大いに来たいできる。特に後者としては、性ステロイドホルモンの分子作用メカニズムや性決定機構の分子メカニズムの解明が該当しよう。このような基礎研究の成果なしに、次のステップ、つまり汚染拡散防止の根本的解決に到るとは思わない。

1-3. 内分泌攪乱物質の作用点（標的分子）は何か？

それでは内分泌攪乱物質の作用点（標的分子）は何であろうか？性転換生物の存在から、図1に示すようにその作用点について概念的に示した。作用点は、現在まで明らかになっている事象を合わせるとおよそ3つに分類出来ると考える。1つは、ダイオキシンを初めとした薬物（毒物）が結合する核内薬物レセプター（ダイオキシンレセプター）を介する情報伝達への影響である。最も単純な図式で、薬物レセプターに結合した内分泌攪乱物質が、これらレセプターの標的遺伝子群を活性化することで、性転換を初めとした内分泌攪乱を引き起こす可能性である（図2）。しかし薬物レセプターに結合する薬物すべてが、性転換を初めとした内分泌攪乱を顕著に示すわけではないので、内分泌攪乱の1部のみを証明すると思われる。最も端的な例はダイオキシンである。ダイオキシンは、薬物レセプターに非常に高い結合能を示すことで非常に良いリガンドとして働き、胎児に著しい奇形を催すが、性転換は引き起こさない。むしろ薬物代謝酵素群（p450酵素群）がダイオキシンレセプターによりその、これらp450酵素群は性ステロイドホルモンの代謝を担うものもあるため（1、2、3）、魚類などの性転換の1種の例では、性ステロイドホルモン合成異常で説明できるかも知れない（図3）。

これらの可能性より更に魅力ある仮説は、内分泌攪乱物質が結合した薬物レセプタ

一が間接的に性決定因子群や性ステロイドホルモンレセプターの機能を阻害する可能性である（図4）。これは、内分泌攪乱物質が結合した薬物レセプターは細胞質あるいは核内で、様々な相互作用因子群と会合あるいは解離することから予想される。このような相互作用因子群を通じて間接的に他の情報伝達系の機能を攪乱する可能性である。従って、薬物レセプターの細胞内動態の解析や薬物レセプターとの細胞内相互作用因子群の同定は、極めて興味深い問題の1つである。

もう1つの作用点は性決定因子群への作用である。性決定因子群は現在のところ、すべてが同定されているわけではなく、その一部が解明されたに過ぎない（図5）（4-9）。それでも、その性決定に関わる因子群の数は多く、また複雑多岐に渡ることが理解できる。このような性決定因子群の機能が薬物などによって直接的に影響を受ける例は報告がない。しかしながらこれら因子群の中には、後で述べるように核内ステロイドホルモンレセプタースーパーファミリーに属するオーファンレセプターが含まれている。よって、これら性決定に関与するオーファンレセプターのリガンドとして働く可能性は極めて興味深い作用仮説の1つである。

3番目として、核内ステロイドホルモンレセプター群が挙げられる（10、11、12）。核内ステロイドホルモンレセプターは核内レセプタースーパーファミリーに属し（図6、7）、核内に局在するリガンド誘導性転写制御因子である。従って、後に詳細に述べるように、核内レセプターはリガンドのもつシグナルを遺伝情報へと伝達する変換器として働く。このファミリーに属するレセプターは、リガンド未知のオーファンレセプターを含めると、ヒトではおよそ100種近くも存在すると考えられている。内分泌攪乱物質が、直接性ステロイドホルモンレセプターのリガンドとして働き、内因性の性ステロイドホルモン作用を攪乱する可能性は最もわかりやすく、説得力のある可能性である。しかし、性ステロイドホルモン作用に完全拮抗するような、いわゆる合成ホルモンアンタゴニストには、性転換能がないことが知られている。従って、性ステロイドホルモンレセプターに作用するとしても、性ステロイドホルモンに対して完全に拮抗するものではなく、性決定という限られた時期にレセプター機能を調節するような効果が想像される。そのような調節作用は、後に詳しく述べるように、レセプターそのものへの効果よりむしろレセプター機能に必須な転写共役因子の機能への影響が考えられる。

同様に、内分泌攪乱物質がこのファミリーに属するオーファンレセプターのリガンドとして作用する可能性を検証することは、最も興味深い対象の1つである。特に最近同定されたPXRはステロイドホルモン代謝体をリガンドとするため、内分泌攪乱物質との関係は目を離せない（13）。

このように、以上述べてきたように内分泌攪乱物質が直接核内レセプターのリガンドとして働き、レセプター機能を正負に調節する可能性が考えられるが、一方で、これらレセプターに結合することで、レセプターと相互作用する転写共役因子の機能を間接的に制御する可能性が考えられる（14、15）。核内レセプターに作用する転写共役因子はすべてが同定されたわけではなく、その一部のみが同定されている。こ

れら核内レセプター転写共役因子は、薬物レセプターや性決定因子群の転写制御に対しても共通の転写共役因子として働く可能性が推察されている。従って、もしも性ステロイドホルモンレセプター転写共役因子が、内分泌攪乱物質によってその機能による障害が引き起こされると、間接的に性決定因子群や薬物レセプターの機能障害が引き起こされる可能性が考えられる。

1-4. 性ステロイドホルモンレセプターの機能解析研究がもたらすもの

以上述べてきたように、内分泌攪乱物質が作用すると考えられる作用点について、現時点での知識で考え得る、そして可能性の高いものについて列挙してみた。このような作用点の候補の分子レベルでの機能の解明なくして、内分泌攪乱物質群の分別化、そして未知化合物の副作用の予知が難しいことについても述べた。これら作用点として考えられる3つのクラスの異なる因子群の共通した性質は、既に述べたように、いずれも遺伝情報をコントロールする転写制御因子であることである。性転換を含めた内分泌攪乱物質の生物への悪影響は、単に一時的な代謝障害や毒性ではなく、遺伝情報制御の攪乱を伴った、より重篤なものと捉えられる。このような観点から眺めてみると、3つのクラスの候補因子群のうち、転写制御因子群として最も解析が進んでおり、かつまたそれ自身が低分子量の脂溶性生理活性物質をリガンドとする核内ステロイドレセプター群（核内レセプタースーパーファミリー）が、最も内分泌攪乱物質の作用する標的分子として解析しやすい候補と思われる。

そこで、以下に既に今まで明らかになっている核内レセプターの転写制御因子としての機能を分子レベルで概観したい。これら既に明らかになった核内レセプターや転写共役因子の機能に対して、内分泌攪乱物質が如何に作用するか検討することは、今後の解析法の発展を考慮する上でも、現時点では最前のアプローチと思える。

2. 核内レセプターを介した性ステロイドホルモンの分子作用メカニズム

2-1. 性ステロイドホルモン群の作用メカニズム

性ステロイドホルモンを始めとして、核内レセプターを有する低分子量脂溶性生理活性物質には、ステロイド/甲状腺ホルモン、ビタミンA(レチノイド)、ビタミンD群のエイコサノイド、更にコレステロール代謝体などが知られている（図6、7）（10-13、16-19）。これら一群の脂溶性物質は脂溶性であるので、各々細胞膜・核膜を自由に透過し、核内に局在する特異的核内レセプターに高い親和性を示すことでリガンドとして働く。核内レセプターは、リガンド誘導性転写制御因子であって、それぞれの特異的な標的遺伝子群プロモーターに結合することで、標的遺伝子群の発現を転写レベルで制御する。標的遺伝子群産物（タンパク）は、酵素であったり、細胞内構成蛋白であったり、いずれも生理的に重要な役割を担っていると予想されている。

このように核内レセプターは、これら性ステロイドホルモンを媒体として脂溶性リガンドの持つシグナルを遺伝情報に伝える変換器であって、リガンド固有の生理活性

は、その標的遺伝子群（遺伝子産物=タンパク）群が実際担っていることがわかる（図8）。各脂溶性リガンドの生理作用は一般に多種多様で、一見その作用メカニズムは外見上互いに異なり、極めて複雑に見えるが、実はこのように何れも図1に示したように単純化できる（10、11）。即ち、これら脂溶性リガンドはいずれも核内レセプターを介し遺伝情報を呼び起こすシグナルなのである。このようにシステムの基本原理は簡単にまとめることができるが、性ステロイドホルモンをはじめとしたこれら核内レセプターリガンドは、体内で組織特異的作用を示すことが知られている。特に性ステロイドホルモン合成化合物は、組織によって、その作用が正（アゴニスト）や負（アンタゴニスト）に逆転することが知られている。このことは、後に述べるように、合成リガンドの種類によって核内レセプターの立体構造を異なった形に変えるため、レセプター機能を正負に調節する作用があることがわかっている。従って、リガンドとして作用する内分泌攪乱物質は組織特異的に作用する可能性を示唆している。

2-2. 性ステロイドホルモン核内レセプタースーパーファミリー

核内レセプター群は1つの遺伝子から分子進化したと考えられ、互いの構造機能が類似したいわゆる1つの大きな遺伝子スーパーファミリーを形成している（前述）。図7に示すようにエストロゲンでは2種のレセプターがあるが、他のステロイドホルモンではレセプターは1つのホルモンに対し一般に1種である。またステロイドホルモンレセプタータンパクのN末端が他のレセプターより長いのも特徴的である。一方、ビタミンAは6種（RAR、RXR、ただしRARはATRAの他9 CRAもリガンドとする）、甲状腺ホルモンでは2種であるが、ビタミンDのレセプターは1種のみ知られている。PPARは当初パーオキシゾーム誘導剤（クロフィブレート）が間接的に活性化するレセプターとしてPPARαが1990年に同定され（16）、続いてPPARβ/d、PPARγが見出された。その後内因性リガンドの同定が精力的に行われ、PPARαのリガンドにはロイコトリエンB₄、PPARγのリガンドはプロスタグランジンJ₂であることが報告された（17）。しかしながら、このレセプターは中鎖脂肪酸によっても活性化されるため、他のリガンドの存在が予想されている。一方、薬物の中では効率よくPPARγを活性化するものとしてトリグリタゾンが知られている。この薬剤は抗糖尿病剤として開発されたものであるので、PPARγは抗糖尿病のターゲット分子として大いに注目されている（18、19）。この他LXRのリガンドがコレステロールの代謝体の1種であること、FXRはファルネソールが有望なリガンドとして同定されたが（20、21）、最近胆汁酸がリガンドとして作用することが示されている（22）。またRXRはリガンド特異性が低く、合成ステロイドホルモンやステロイドホルモン代謝体をリガンドとしている（13）。この他にもリガンドの同定されていない、いわゆるオーファン（孤児）レセプター少なくとも30種以上は存在が知られている（12）。オーファンレセプターは核内レセプターとの相同性から単離されたものも多いが、ショウジョウバエ遺伝学や、遺伝病の原因遺伝子として同定されたものも多い。この中にはその遺伝子の欠損により副腎形成不全（DAX-1/Ad4BP）や、小脳細胞欠失（RORα）等の重篤な病態を引き起こすものもあ

り、それらの内因性リガンドは大いに注目されている(11、23)。このように、予想以上の数の低分子量脂溶性化合物が核内レセプターリガンドとして働くことから、内分泌攪乱物質が核内レセプターリガンドとして働く可能性は高い。

2-3. 核内レセプター群の構造と機能

核内レセプター群は、その高い相同性と機能からA-Fまでの領域にレセプタータンパクN末端から分割される(図9)。直接標的エンハンサー配列を認識、結合するDNA結合領域は、タンパク中央のC領域に位置する。この領域には他のDNA結合タンパクにも見られる特徴的なZnフィンガー構造が2個存在する。この構造はDNA 2重らせんに強固に結合するのに必須な構造であり、実際からDNAとZnフィンガーが強固な構造を取ることがわかっている。リガンドが結合するいわゆるリガンド結合領域はC末側のE領域に存在する。核内レセプターはホモあるいはヘテロとして2量体を形成するが、2量体化能はC及びE領域が存在する。核内に局在させる核移行シグナル(NLS)はD領域に存在する(24)。レセプターの主たる機能である転写促進能は、A/BとE領域の2箇所が担っている。何れの機能も組織や動物種の違いによって活性が異なっている(25)。このA/B領域とE領域を別々に、分子生物学的手法により調べてみると、A/B領域の転写促進機能(AF-1)は恒常的であるのに対し、E領域の転写促進機能(AF-2)はリガンド結合誘導的である(26)。またAF-1やAF-2の機能はリン酸化によって調節されることも知られている(27、28)。一方核内レセプターは、DNAに結合しただけでは転写促進しない。この点は他のDNA結合性転写時とは際だって異なる性質であるDNA結合に加えてリガンド結合が転写促進には必須である。このことはリガンド未結合レセプターでは逆にAF-1の機能が、リガンド未結合のE領域(AF-2)によって抑制されていることを示唆する。AF-2へのリガンド結合はAF-2の機能誘導のみならずAF-1本来の機能の回復と言えよう。このようなAF-1とAF-2との機能的な相互作用は、リガンドの生理活性や、組織(動物)特異的な転写促進能に密接に関わっていることが予想されている。更に後に述べるように、このAF-1とAF-2間の相互作用はリガンドの種類により異なっているため、内分泌攪乱物質が結合すると組織特異的な作用を引き起こす可能性が考えられる。

2-4. 核内レセプターの標的DNA配列

核内レセプターの相同性に見られるように核内レセプターの標的エンハンサーは、互いに極めて類似した構造を取っている(図10)。その配列は2つに大別され、1つは回文配列(パリンδροーム)と呼ばれた対称型DNA配列であり、このような配列はステロイドレセプターがホモ二量体として結合する(29、30)。エストロゲンレセプター(ER)の標的配列は5'-AGGTCA-3'の2つのコア配列が互いに向き合って、そのモチーフ間のスペースは3bpである。一方他のステロイドホルモンであるグルココルチコイド(GR)、ミネラルコルチコイド(MR)、プロゲステロン(PR)、アンドロゲン(AR)、レセプターの標的配列は5'-AGAACA-3'からなり、やはり2つのモチーフ

が3bp隔てられている。これらGR、MR、PR、ARが全く同じ配列を認識するのにも関わらず、何故全く異なる生理作用（異なる標的遺伝子群の発現制御）を現すかは依然謎である。一方非ステロイドホルモンレセプターの標的配列は直接繰返し型（ダイレクトリピート）であり、そのコア配列は5'-AGGTCA-3'であり、この2つの配列が直列に並びヘテロ二量体が結合する(31)。このモチーフ間のスペースが各レセプターの標的特異性を規定しており、1, 2, 5bpはRAR/RXR、3bpはVDR/RXR、4bpはTR/RXRが結合する。この際興味深いことにRXRは常に5'上流側のコア配列に結合し、いわゆる共役レセプターとして働くように外見上見え、3'側のコア配列に結合するレセプターのみがリガンドに応答し転写促進を行うことが分かっている(32)。またオーファンレセプターの中にはホモ二量体として結合するものの他に、単量体として標的DNAに結合するものが知られているが、いずれの標的配列もAGGTCAを基本として配列されている。

2-5. 核内レセプターによる転写促進の分子メカニズム

核内レセプター群はエンハンサー/サイレンサーに結合するDNA結合性転写制御因子群の1種と言える。従って他のDNA結合性転写制御因子同様の分子メカニズムで転写制御を行うと考えられ(図11)、TATA boxを中心とする巨大複合体である基本転写装置を必須としている(25)。この際染色体DNA上では、基本転写装置と転写促進に必須な複合体を形成するが、図10に示すように、染色体DNAは大きく湾曲すると予想されている。このようなDNA構造の大きな変化を伴うことで、RNAポリメラーゼ・を呼び入れる環境が整えられる。このような核内レセプター-基本転写因子との転写開始複合体形成には更に両者を介在する転写共役因子が必須であることが最近わかり始めた(14、15、33)。

核内レセプターの転写促進作用は、先にも述べたようにリガンド結合依存的である。従って、このような転写介し複合体形成はリガンド依存的であると考えられ、少なくとも核内レセプターに直接結合する転写共役因子は、リガンド結合依存的に相互作用すると予想された。また同時にリガンド末結合状態の核内レセプターの転写促進能はむしろ抑制されている状態であるので、この時には逆に転写を抑制する共役因子群の存在が考えられた。つまりリガンド末結合状態では共役転写抑制因子(co-repressor)が結合していて、リガンド結合により、転写抑制因子が解離する。逆に共役転写活性化因子(co-activator)が入れ替わるように結合し、転写促進を助けるというスキームである(図12)。

2-6. 核内レセプター転写共役因子

現在までにco-activatorとして働くものに3つの160kDaの機能が極めて類似したSRC-1(ERAP160)(34、35)、TIF2(36)、AIB1のファミリータンパクが知られている(37、38)。その他PGC-1(39)、Smad3(40)など、リガンド依存的に相互作用する核内因子群がいくつか同定されている。更に最近では、以

上述べてきたco-activatorを全く含まない新たなco-activator複合体TRAP (DRIP) が同定されている(14)。この他核内レセプターのみならず、他の転写因子群のco-activatorとして働くものにCBP/P300が挙げられている(41)。一方co-repressorとしてはN-CoRやSMRTが同定されているが、いずれもステロイドホルモンレセプターには作用しないようである(42、43)。これら核内レセプター共役因子群はレセプター種固有のものは同定されておらず、複数のレセプターが共有しているようである。このような転写共役因子群と共通した特徴として明らかになったことの1つは、転写共役因子自身が、ヒストンのアセチル化(44、45)、脱アセチル化する酵素(46、47)であることにある。ヒストンは染色体DNAに固く巻き付き、遺伝子発現が起きないように眠らせている。しかしヒストンがアセチル化されると、ヒストンタンパク自身の物理化学的性質に変化が生じ、DNAに固く巻き付いたヒストンに変化が生じることになる。そうしてヒストンがはずされたDNA部分が露出することで、眠っていた遺伝子が起き出す(発現誘導)と考えられている。このように核内レセプターのリガンド(ホルモン)は、核内レセプター自身の転写促進能を引き出すが、このような転写促進能の獲得には、実際細胞核内ではクロマチン構造のダイナミックな変化を伴うのである(図13)。

しかしながら、これら転写共役因子として同定されたものはいずれもAF-2に対するものであり、現在AF-1に対する転写共役因子として同定された例は極めて少ない(24)。また以上述べてきたように、実際のレセプターの転写促進はAF-1、AF-2との協調作用の上に成り立っているため、AF-1の転写共役因子群の同定は必須な課題であろう。このように、AF-1、AF-2の細胞種特異的転写促進能は、結局当該細胞種における転写共役因子群の質および量の違いによると考えるのが現在一番妥当のようである。

2-7. リガンド結合によるレセプターの構造変化と転写共役因子群との相互作用

転写共役因子群と核内レセプターの相互作用がレセプターのリガンド結合依存的であることは、レセプターのリガンド依存的な転写促進能から容易に推測できる。このため結合に伴う核内レセプターの構造変化が古くから予想されていた。最近、X線解析によるリガンド結合領域(E領域)のリガンド結合による構造変化が、いくつかの核内レセプターについて調べられた。その結果、リガンド結合によるリガンド結合領域の構造変化は、領域全体ではなくその一端が大きく変化することがわかった。即ちリガンド結合領域は、いくつかの小さな領域が集まり、リガンドを迎え入れるポケット構造から構成される。このポケットにリガンドが埋め込まれると、ポケットの外側にあるE領域C末端側に存在する小さな領域(Helix12)が大きく移動することがわかった(48)。一方AF-2を詳細に解析することで、AF-2のうち特にE領域のC末端側の部分が、直接転写共役因子に結合することが証明されており、AF-2

AD(activation domain)と呼ばれていた(49、50)。興味深いことにこのAF-2 ADこそがHelix 12そのものであることがわかったのである。更に最近のE

Rのリガンド結合領域の解析から、Helix 12のリガンド結合に伴う移動はエストロゲンによっては引き起こされるが、エストロゲンアンタゴニスト (tamoxifen、ICI 164、384) では引き起こされなかったという (51) (図14)。更に最近の解析では、アンタゴニストによるHelix 12の移動は、転写共役因子との正常な相互作用面が失われることが明らかになっている。このことは、リガンド分子のアゴニスト/アンタゴニスト活性は、Helix 12の移動によって振り分けられ、その結果、転写共役因子との相互作用に異常が生じることがわかった (52)。

一方このようなリガンド結合依存的なレセプターの構造変化は、E領域に限るものではなく、レセプター分子全体に及ぶと考えられる (53)。特にAF-1、AF-2との機能をリガンド依存的な相互作用を考えると、当然両者の間にリガンド結合依存的な構造変化が生じると考えるのが妥当である。現在まで方法上の限界からAF-2での解析に頼っているが、今後はこのAF-1 (A/B領域) とAF-2 (E領域) とのリガンド結合依存的な相互作用、構造変化を転写促進の分子メカニズム解明には視野に入れるべきであろう。特に内分泌攪乱物質は、核内レセプターリガンドとして働くと、予想外の構造変化を引き起こす可能性もあるので、AF-1機能の解析は重要である。

2-8. 組織特異的なエストロゲン化合物の分子作用メカニズム

最近、エストロゲン依存性癌の内分泌療法を目的に開発されたエストロゲン (E2) アンタゴニストとして作られたタモキシフェン (TAM) が、骨組織や脂質代謝にはアゴニストとして働くことが示された。中でもE2の骨組織特異的作用が近年臨床の場で特に脚光を浴びるようになったのは、骨特異的なE2骨粗鬆薬 (ラロキシフェン) の開発の成功であろう。ラロキシフェン (LAX) は、タモキシフェン (TAM) の類縁体であり、当初はいわゆるE2アンタゴニストとして開発された。LAXはTAM同様、乳腺や子宮に対しては、E2アンタゴニスト様作用を示すが、骨組織に対してはアゴニスト様作用を示す。TAM、LAXは厳密には完全ではなく部分的アンタゴニストでしか働かないケースがあることがin vitro系の実験から確かめられている。即ちTAM、LAXはリガンド結合領域に存在するAF-2活性を完全に阻害するが、AF-1の活性を抑制することができない (54)。AF-1やAF-2の転写促進能は細胞の種類や状態で活性が異なっているので (26)、ERのAF-1活性が高い細胞 (組織) では、TAM、LAXはアンタゴニストではなくむしろ部分的アゴニストとして働くように思われる (図15)。LAXが骨組織特異的にE2作用を示す1つの可能性は、この組織ではERのAF-1活性が高いためと推測できよう (26、27、28)。ERへはリガンド結合依存的に転写共役因子群が結合するが、この転写共役因子群は転写促進に必須なコンポーネントである。従って、TAM、LAXによるERの特徴的な構造変化は、AF-1とAF-2間のみならず、転写共役因子群との相互作用においても、E2では大きく異なることが良そうされる。いずれにしてもTAM、LAXはAF-2の機能を阻害するものの、AF-1活性を抑制し

ないことが骨特異的作用として重要と考えられる。

このように内分泌攪乱物質の想定分子の作用メカニズムの1つは、リガンドとして結合する複雑なレセプターの構造変化により引き起こされる機能の逸脱によって説明できるかもしれない。一方でこのような構造変化の違いによる機能的変異は、先に述べた転写共役因子群との相互作用を変えるものと理解されている(55)。

2-9. 核内レセプター研究の今後の展望

核内レセプターに属するメンバーが未だに続々と発見されている現状を考えると、内分泌攪乱物質を直接リガンドとするレセプターの発見は極めて可能性が高いように思われる。一方で既知レセプターに弱い結合力であっても、リガンドポケットにはまり込み、ある程度リガンドとして作用してしまう可能性も考えられる(43、49)。この場合、レセプターの異常な立体構造変化が引き起こされるので、AF-1、AF-2の細胞種特異的機能により、組織特異的に作用を現す可能性が考えられる。

いずれも核内レセプター研究の進展が著しい今、新たな知見を盛り込んだ視野に立ち、内分泌攪乱物質の作用を見極めることが必須である。

3. 文献

- 1) Rommerts F F G, van der Molen H J: Testosterone steroidogenesis. In: Burger H G, Kertzer D M, eds. The Testis. New York: Raven Press, 303-328, 1989.
- 2) Wilson J D, Griffin J E, Russell D W: Steroid 5 α -reductase 2 deficiency. Endocr Rev, 14, 577-593, 1993.
- 3) Quigley C A, Debellis A, Marschke K B, et al.: Androgen receptor defects: Historical, clinical and molecular perspectives. Endocr Rev, 16, 271-321, 1995.
- 4) Kreidberg J A, Sariola H, Loring J M, et al.: WT-1 is required for early kidney development. Cell, 74, 679-691, 1993.
- 5) Torres M, Gomez-Pardo E, Dressler G R, Gruss P: Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. Development, 121, 4057-4065, 1995.
- 6) Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R: Male development of chromosomally female mice transgenic for SRY. Nature, 351, 117-121, 1991.
- 7) Swain A, Zanaria E, Hacker A, et al.: Mouse Dax 1 expression is consistent with a role in sex determination as well as in adrenal function. Nature Genet, 12, 404-409, 1996.
- 8) Kwok C, Weller P A, Guili S, et al.: Mutations in SOX9, the gene responsible for campomelic dysplasia and autosomal sex reversal. Am J Hum Genet, 57,

1028-1036, 1995.

9) Rappaport R, Forest M G: Disorders of sexual differentiation. In: Bertrand J, Rappaport R, Sizonenko P C, eds. *Pediatric Endocrinology*. Baltimore: Williams and Wilkins, 447-470, 1993.

10) 加藤茂明: 核内レセプターと情報伝達 羊土社

11) Mangelsdorf D J, Evans R M: The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*, 83, 841-850, 1995.

12) Nuclear Receptors Nomenclature Committee: A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell*, 97, 161-163, 1999.

13) Kliewer S A, Moore J T, Wade L, Staudinger J L, Watson M A, Jones S A, McKee D D, Oliver B B, Willson T M, Zetterstrom R H, Perlmann T, Lehmann J M: An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell*, 92, 73-82, 1998.

14) Freedman L P: Increasing the complexity of coactivation in nuclear receptor signaling. *Cell*, 97, 5-8 1999.

15) Lanz R B, McKenna N J, Onate S A, Albrecht U, Wong J, Tsai S Y, Tsai M-J, O'Malley B W: A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex. *Cell*, 97, 17-27, 1999.

16) Devchand P R, Keller H, Peters J M, Tizabi M, Gonzales, F J: The PPAR α -leukotriene B₄ pathway to inflammation control. *Nature*, 384, 39-43, 1996.

17) Forman B M, Tontonoz P, Chen J, Brun R P, Spiegelman B M, Evans R M: 15-deoxy- Δ^{12} , 14-prostaglandin J₂ is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell*, 83, 803-812, 1995.

18) Ricote M, Li A C, Willson T M, Kelly C J, Glass C K: The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*, 391, 79-82, 1988.

19) Jiang C, Ting A T, Seed B: PPAR- γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*, 391, 82-86, 1988.

20) Forman B M, Goode E, Chen J, Oro A E, Bradley D J, Perlman T, Noonan D J, Burks L T, McMorris T, Lamph W W, Evans R, Weinberger C: Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolite. *Cell*, 81 687-693 1995.

21) Janowski B A, Willy P, Thota R D, Falck J R, Mangelsdorf D J: An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXRA. *Nature*, 383, 728-731 1996.

22) Russell D W: Nuclear orphan receptors control cholesterol catabolism. *Cell*, 97, 539-542, 1999.

- 23) Kastner P, Mark M, Chambon P: Nonsteroid Nuclear receptors: What are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell*, 83, 859-869, 1995.
- 24) Ylikomi T, Bocquel M T, Berry M, et al.: Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. *EMBO J*, 11, 3681-3694, 1992.
- 25) Beato M, Herrlich P, Schutz G: Steroid hormone receptors: Many actors in search of a plot. *Cell*, 83, 851-857, 1995.
- 26) Tasset D, Tora L, Fromental C, Sheer E, Chambon P: Distinct classes of transcriptional activating domains function by different mechanisms. *Cell*, 62, 1177-1187, 1990.
- 27) Kato S, Endo H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Goto Y, Nishida E, Kawashima H, Metzger D, Chambon P: Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science*, 270, 1491-1494, 1995.
- 28) Endoh H, Maruyama K, Masuhiro Y, Kobayashi Y, Goto M, Tai H, Yanagisawa J, Metzger D, Hashimoto S, Kato S: Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor α . *Mol Cell Biol*, 1999 (in press).
- 29) Umesono K, Murakami K, Thompson C, Evans R M: Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid and vitamin D3 receptor. *Cell*, 65, 1255-1266, 1991.
- 30) Kato S, Sasaki H, Suzawa M, Masushige S, Tora L, Chambon P, Gronemeyer H: Widely spaced, directly repeated PuGGTCA elements act as promiscuous enhancers for different classes of nuclear receptors. *Mol Cell Biol*, 15, 5858-5867, 1995.
- 31) Vivat V, Zechel C, Wurtz J M, Chambon P, Gronemeyer H: A mutation mimicking ligand-induced conformational change yields a constitutive RXR that senses allosteric effects in heterodimers. *EMBO J*, 16, 5697-5709, 1997.
- 32) Kurokawa R, Soderstrom M, Horlein A, Halachmi S, Brown M, Rosenfeld M G, Glass C K: Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-activator. *Nature*, 377, 451-454, 1995.
- 33) Horwitz K B, Jackson T A, Bain D L, Richer J K, Takimoto G S, Tung L: Nuclear Receptor Coactivators and Corepressors. *Mol Endocrinol*, 10, 1167-1177, 1996.
- 34) Onate S A, Tsai M-J, O'Malley B W: Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptors. *Science*, 273, 1354-1357, 1996.

- 35)Cavailles V, Dauvois P, Danielson P S, Parker M G: Interaction of protein with transcriptionally active estrogen receptors. *Proc Natl Acad.Sci*, 91, 10009-10013, 1994.
- 36)Voegel J J, Heine M J S, Zechel C, Chambon P, Groneymmer H: TIF2, a 160-kD a transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J*, 15, 3667-3675, 1996.
- 37)Anzick S L, Kononen J, Walker R L: AIB1, a steroid hormone receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science*, 277: 965-968, 1997.
- 38)Chen H, Lin R J, Schiltz R L, Chakravarti D, Nash A, Nagy L, Privalski M L, Nakatani Y, Evans R M: Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell*, 90, 569-580, 1997.
- 39)Puigserver P, Wu Z, Park C W, Graves R, Wright M, Spiegelman B M: A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, 92, 829-839, 1998.
- 40)Yanagisawa J, Yanagi Y, Masuhiro Y, Suzawa M, Toriyabe T, Kashiwagi K, Watanabe M, Kawabata M, Miyazono K, Kato S: Convergence of TGF β and vitamin D signaling pathways on SMAD proteins acting as common transcriptional co-activators. *Science*, 283, 1317-1321, 1999.
- 41)Kamei Y, Xu L, Heinzel T, Torchia J, Kurokawa R, Gloss B, Lin S-C, Heyman R A, Rose D W, Glass C K, Rosenfeld M G: A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell*, 85, 403-414, 1996.
- 42)Horlein A J, Naar A M, Heinzel T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Soderstrom M, Glass C K, Rosenfeld M G: Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor corepressor. *Nature*, 377, 397-404, 1995.
- 43)Chen J D, Evans R M: A transcriptional corepressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*, 377, 454-457, 1995.
- 44)Ogryzko V V, Schiltz R L, Russanova V, Howard B H, Nakatani Y: The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*, 87, 953-959, 1996.
- 45)Spencer T E, Jenster G, Burcin M M, Allis C D, Zhou J, Mizzen C A, McKenna N J, Onate S A, Tsai S Y, O'Malley B W: Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature*, 389, 194-198, 1997.
- 46)Nagy L, Kao H Y, Chakravarti D, Lin R J, Hassig C A, Ayer D E, Schreiber S L, Evans R M: Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell*, 89, 373-380, 1997.

- 47)Heinzel T, Lavinsky R M, Mullen T M, Kamei Y, Soderstrom M, Glass C K, Rosenfeld M G: A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature*, 387, 43-48, 1997.
- 48)Renaud J P, Rochel N, Ruff M, Vivat P, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D: Crystal structure of the RAR- α ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature*, 378 681-689, 1995.
- 49)Durand B, Saunders M, Gaudon C, Roy B, Losson R, Chambon P: Activation function 2(AF-2) of retinoic acid receptor and 9-cis-retinoic acid receptor: presence of a conserved autonomous constitutive activating domain and influence of the nature of the response element of the AF-2 activity. *EMBO J*, 13, 5370-5382, 1994.
- 50)Heery H, Kalkhoven E, Hoare S, Parker M G: A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*, 387, 733-736, 1997.
- 51)Brzozowski A M, Pike A C, Dauter Z, et al.: Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, 389, 753-758, 1997.
- 52)Shiau A K, Barstad D, Loria P M, Cheng L, Kushner P J, Agard D A, Greene G L: The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell*, 95, 927-937, 1998.
- 53)McInerney E M, Tsai M-J, O'Malley B W, Katzenellenbogen B S: Analysis of estrogen receptor transcriptional enhancement by a nuclear receptor coactivator. *Proc Natl Acad Sci*, 93, 10069-10073, 1996.
- 54)Berry M, Metzger D, Chambon P: Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type promoter context-dependent agonistic activity of the antioestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J*, 9, 2811-2818, 1990.
- 55)Takeyama K, Masuhiro Y, Fuse H, Endoh H, Murayama A, Kitanaka S, Suzawa M, Yanagisawa J, Kato S: Selective interaction of vitamin D receptor with transcriptional coactivators by a vitamin D analog. *Mol Cell Biol*, 19, 1049-1055, 1999.

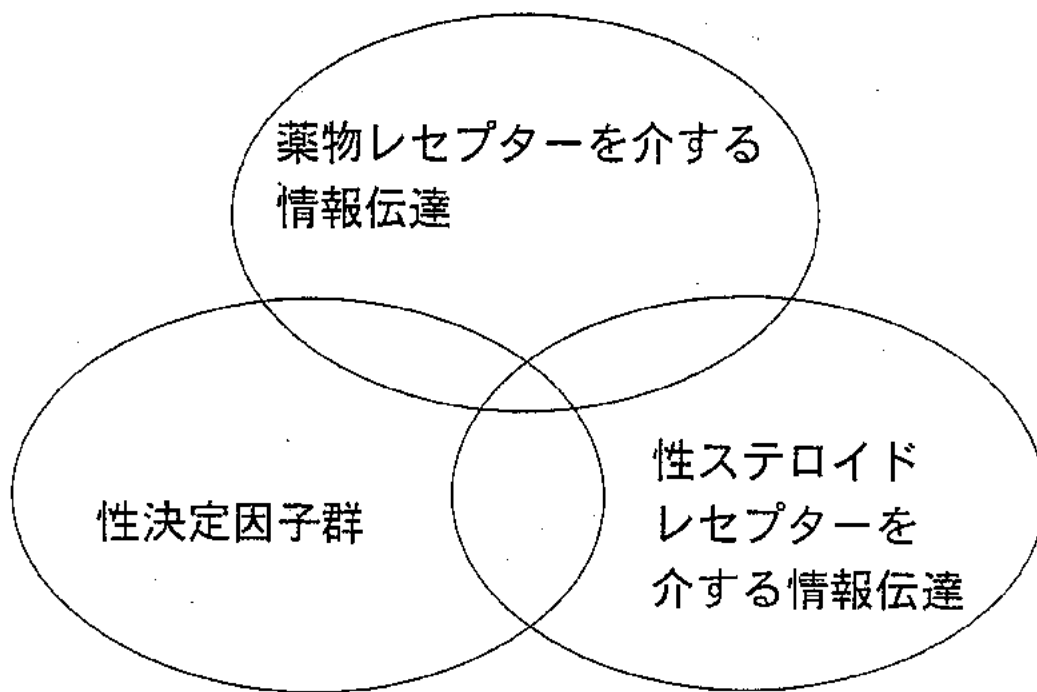


図 1

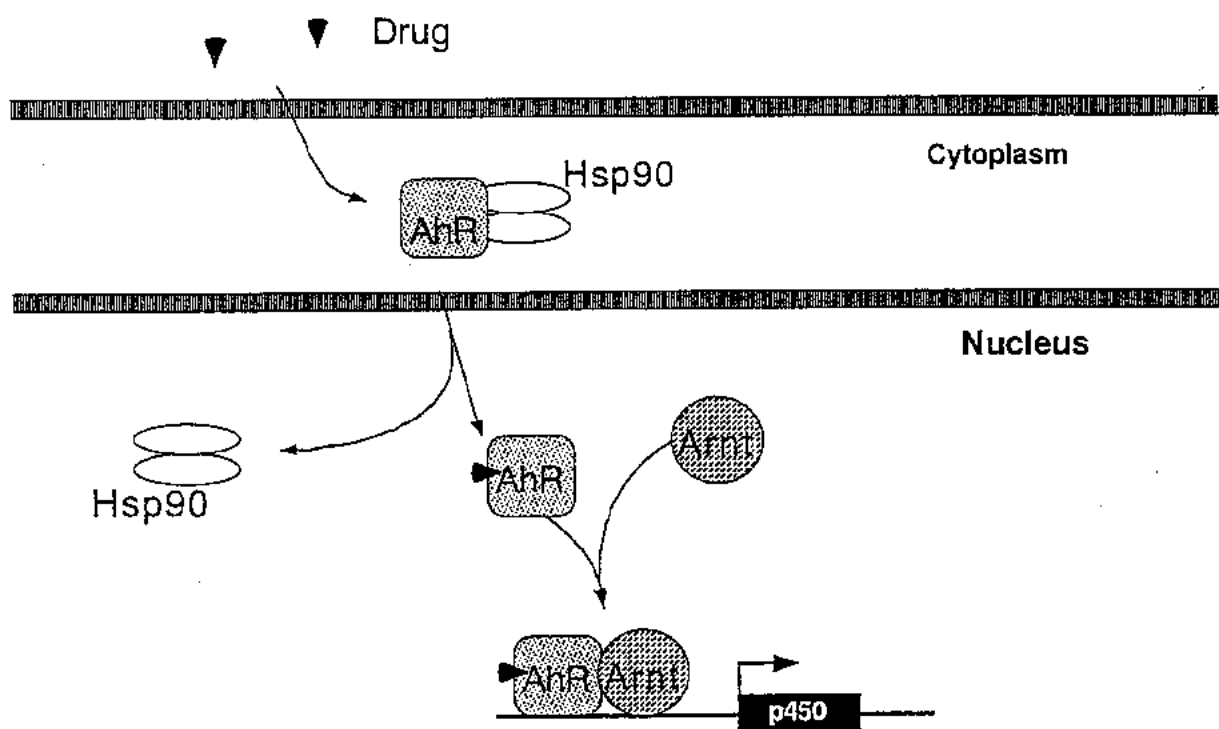


図 2

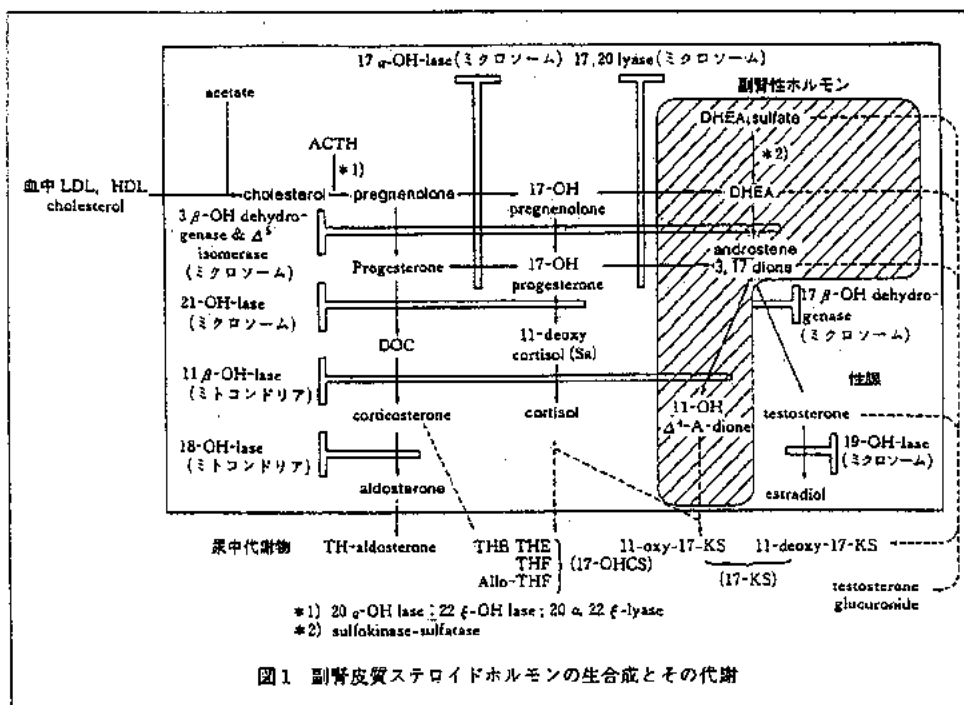


図 3

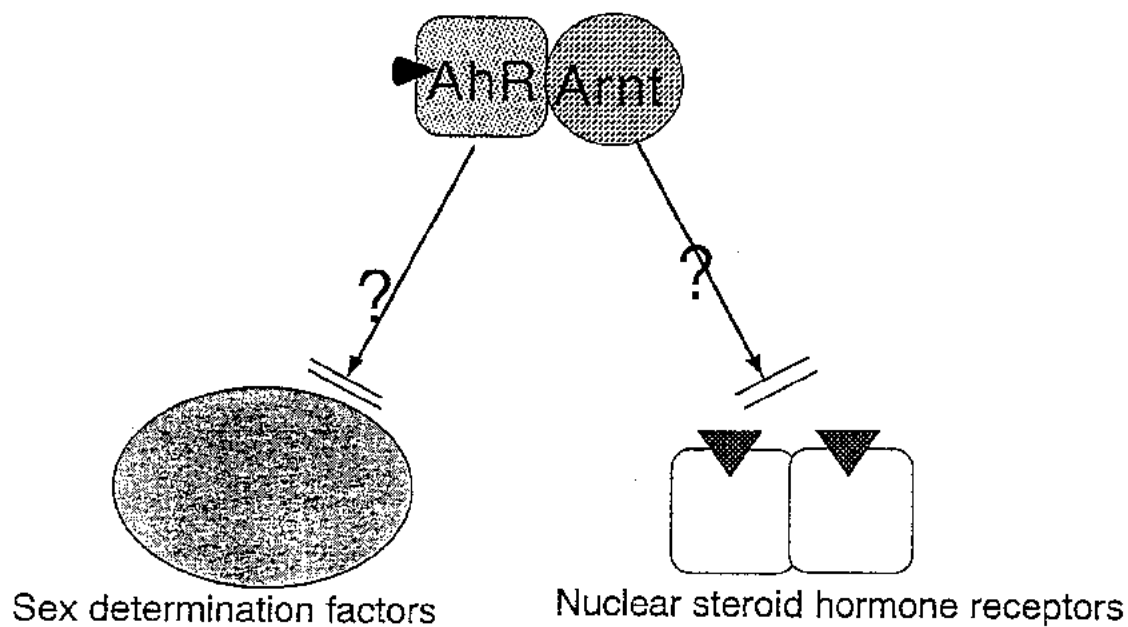


図 4

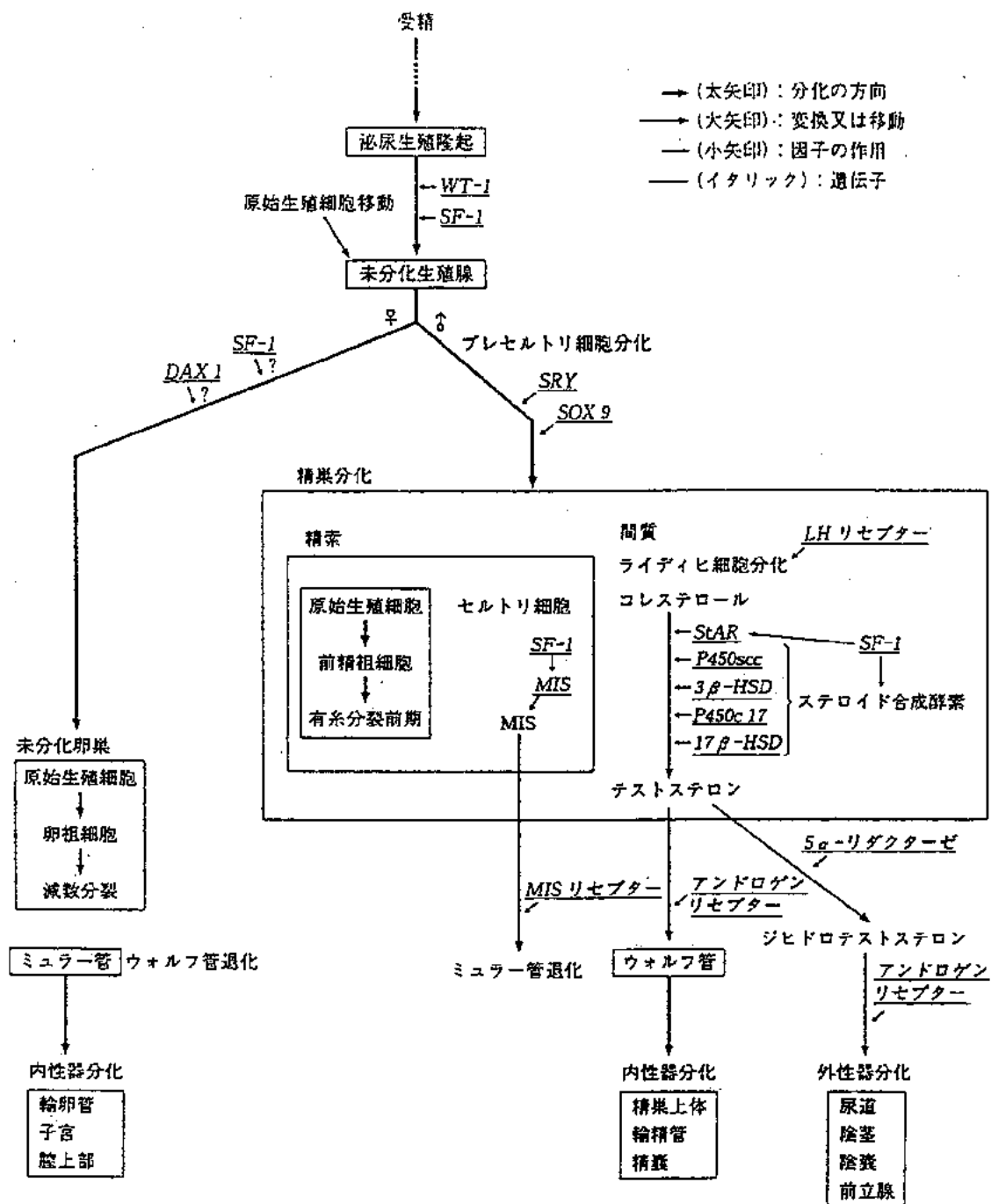


図 5

Subfamily and Group	NR/Gene	Trivial Names	Accession Number
1A	NR1A1	TR α , c-erbA-1, THRA	M24748
	NR1A2	TR β , c-erbA-2, THRB	X04707
1B	NR1B1	RAR α	X06536
	NR1B2	RAR β , HAP	Y00291
	NR1B3	RAR γ , RARD	M57707
1C	NR1C1	PPAR α	L02932
	NR1C2	PPAR β , NUC1	L07592
		PPAR δ , FAAR	
	NR1C3	PPAR γ	L40904
1D	NR1D1	REVERB α , EAR1, EAR1A	M24898
	NR1D2	REVERB β , EAR1 β , BDT3, RVR, HZF2	L31765
	NR1D3	ETS	X61548
1E	NR1E1	ETS, DR-78	U01087
1F	NR1F1	ROR α , RZR α	U04697
	NR1F2	ROR β , RZR β	Y08636
	NR1F3	ROR γ , TOR	U18997
	NR1F4	HR3, DHR3, MHR3, GHR3, CNR3, CHR3	U13075
1G	NR1G1	CNR14	U13074
1H	NR1H1	ECR	M74078
	NR1H2	OR, OR-1, NER1, RIP15, LXR β	U07132
	NR1H3	RLD1, LXR, LXR α	U22862
1I	NR1H4	FXR, RIP14, HNR1	U09416
	NR1I1	VDR	J03268
	NR1I2	ONR1, PKR, SXA, BXR	X75183
	NR1I3	MR97, CAR1, CAR α	Z30425
	NR1I4	CAR2, CAR β	AF00832
1J	NR1J1	DHR99	U07092
1K	NR1K1	NHR1	U19360
2A	NR2A1	HNFA	X76930
	NR2A2	HNFA4G	Z49828
	NR2A3	HNFA4D	Z49827
2B	NR2A4	DHNFA, HNF4D	U70874
	NR2B1	RXR α	X52773
	NR2B2	RXR β , H-2RIIBP, RCoR-1	M84820
	NR2B3	RXR γ	X60225
	NR2B4	USP, Ultraspino, ZO1, CF1	X52591
2C	NR2C1	TR3, TR2-11	M26960
	NR2C2	TR4, TAK1	L27508
2D	NR2D1	DHR78	U36791
2E	NR2E1	TLL, TLX, XTLL	S72373
	NR2E2	TLL, Tailless	M31639
2F	NR2F1	COUP-TF1, COUP-TFA	X12795
	NR2F2	EAR3, SVP44, COUP-TF1, COUP-TFB, ARP1, SVP40	M84487
	NR2F3	SVP, COUP-TF	M20663
	NR2F4	COUP-TFII, COUP-TFG	X63092
	NR2F5	SVP40	X70300
	NR2F6	EAH2	X12784
3A	NR3A1	ER α	X03635
	NR3A2	ER β	U57429
3B	NR3B1	ERR1, ERR α	X61418
	NR3B2	ERR2, ERR β	X51417
3C	NR3C1	GR	X03225
	NR3C2	MR	M16801
	NR3C3	PR	M15716
	NR3C4	AR	M20132

continued

Table 1. Continued

Subfamily and Group	NR/Gene	Trivial Names	Accession Number
4A	NR4A1	NR1B, TR3, N10, NUR77, NAK1	L13740
	NR4A2	NURR1, NOT, RNR1, HZF-3, TINDR	X75818
	NR4A3	NOR1, MINOR	O38630
	NR4A4	DHR36, NGR19	U36782
5A	NR5A1	CNR6, CAR55	U13070
	NR5A2	SF1, ELP, FTZ-F1, AD48P	O85155
	NR5A3	LHR1, XPF1A, XFF1B, FFLR, PHR, FTF	U93693
5B	NR5B1	FTZ-F1	M63711
5C	NR5B1	DHR39, FTZ-F1B	L06423
5A	NR6A1	GCNFI, RTR	U14868
5A	NR6A1	KRI, Kripa	X13331
5A	NR6A2	KRNL, Kripa related	X14153
5A	NR6A3	ECOM, Embryonic gonad, BAGLE	X16631
5A	NR6A4	ODR7	U16705
5A	NR6A5	Tiliponax	M31617
5B	NR6B1	CAX1, AHCH	S74720
5B	NR6B2	SHP	L76571

Note: subfamilies and groups are defined in the text. The groups contain highly related genes with often paralogous relationship in vertebrates (e.g., RAR α , RAR β , and RAR γ). The term isoform is reserved for different gene products originating from the same gene due to alternative promoter usage or splicing, or alternative initiation of translation.

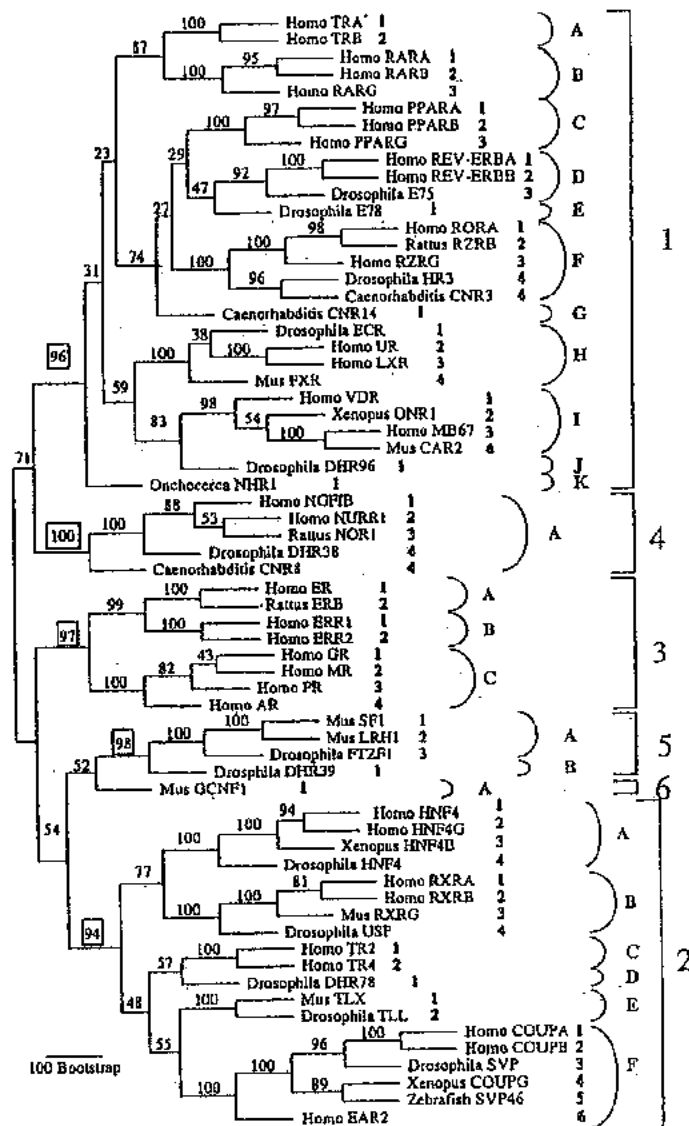
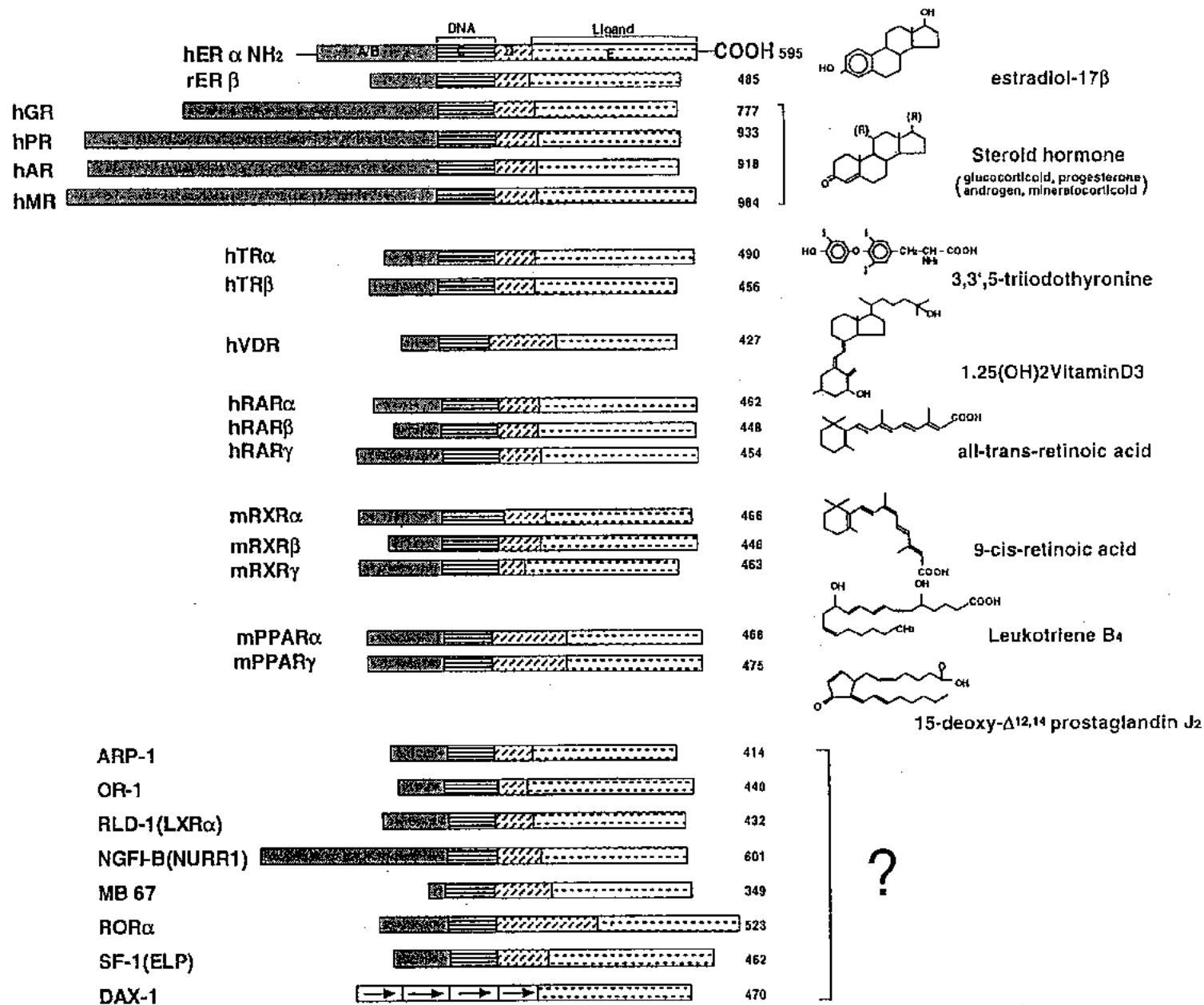


図 6 (A)

現在までに報告されている核内ステロイドホルモンレセプター群 (A)
と分子進化系統樹 (B)

図 6 (B)



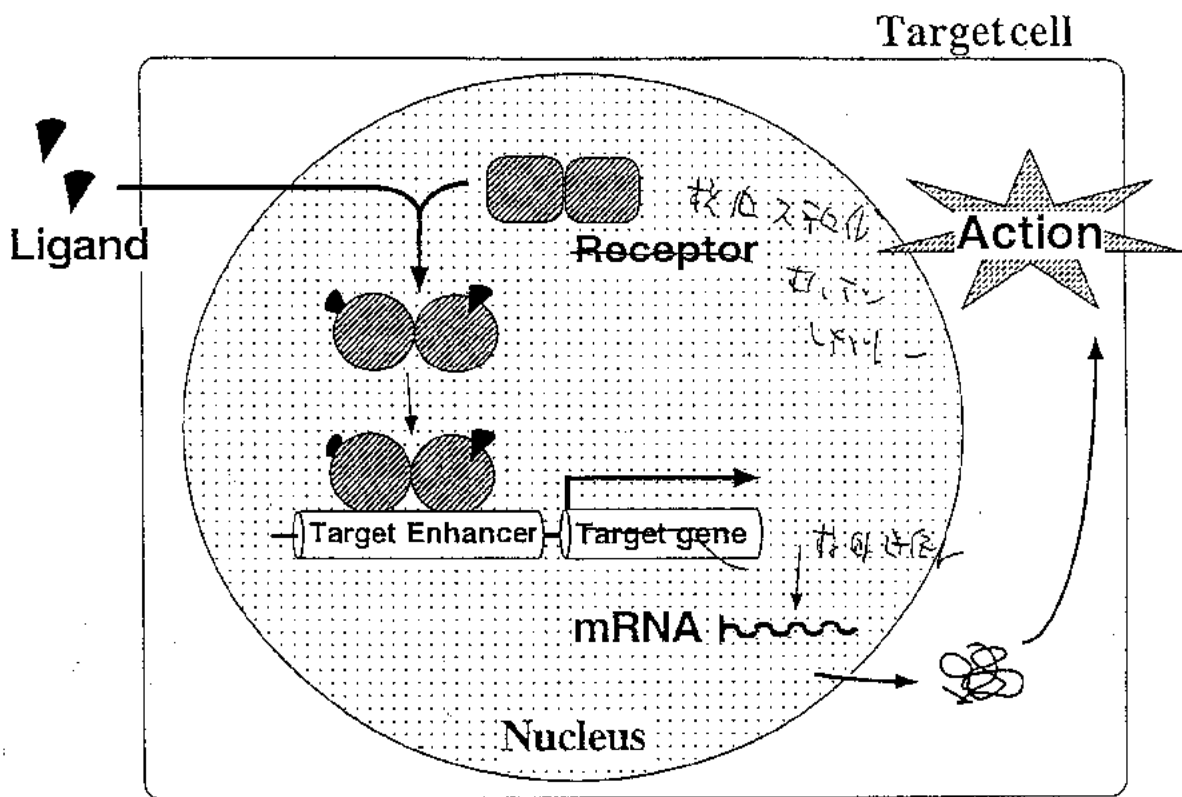


图 8

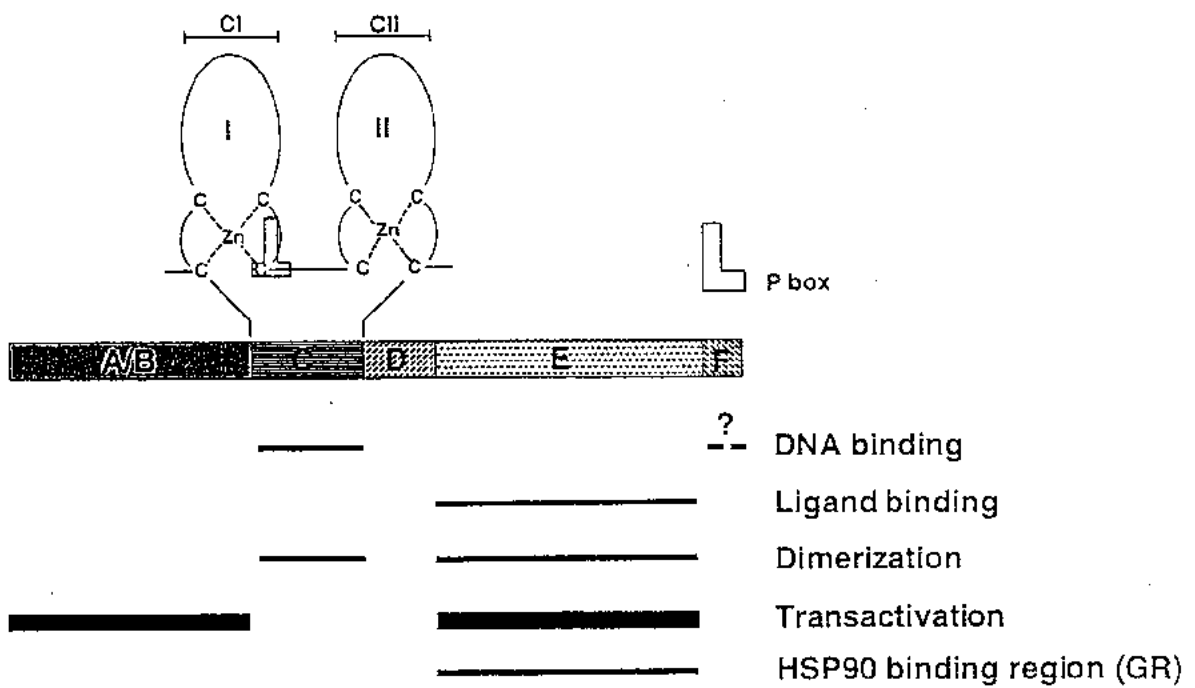


图 9

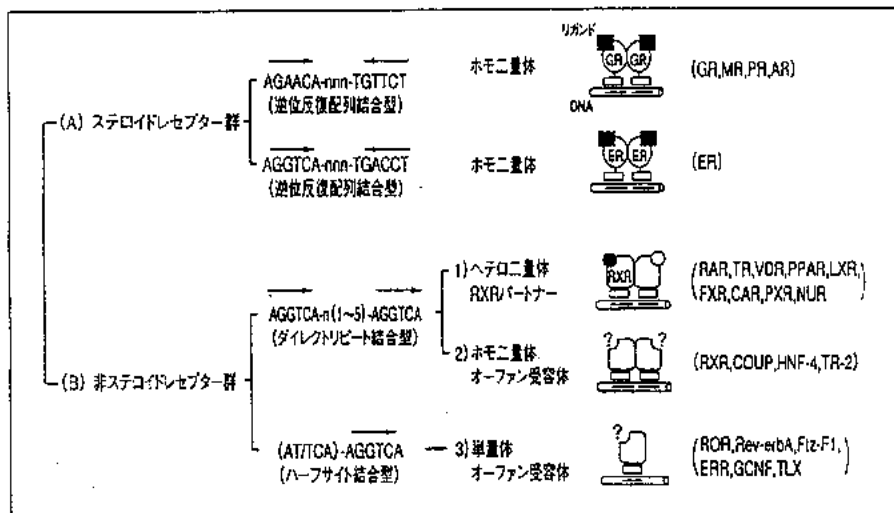


図 10

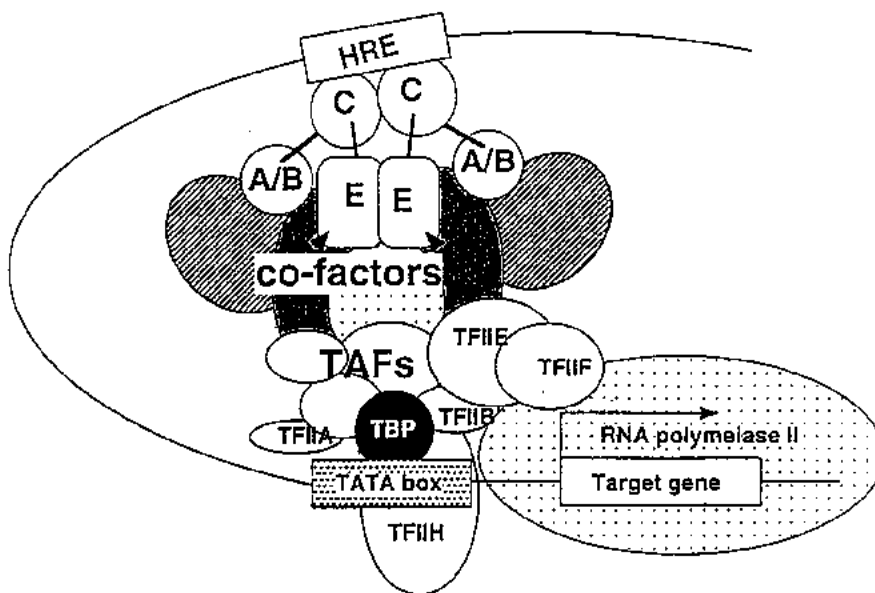


図 11

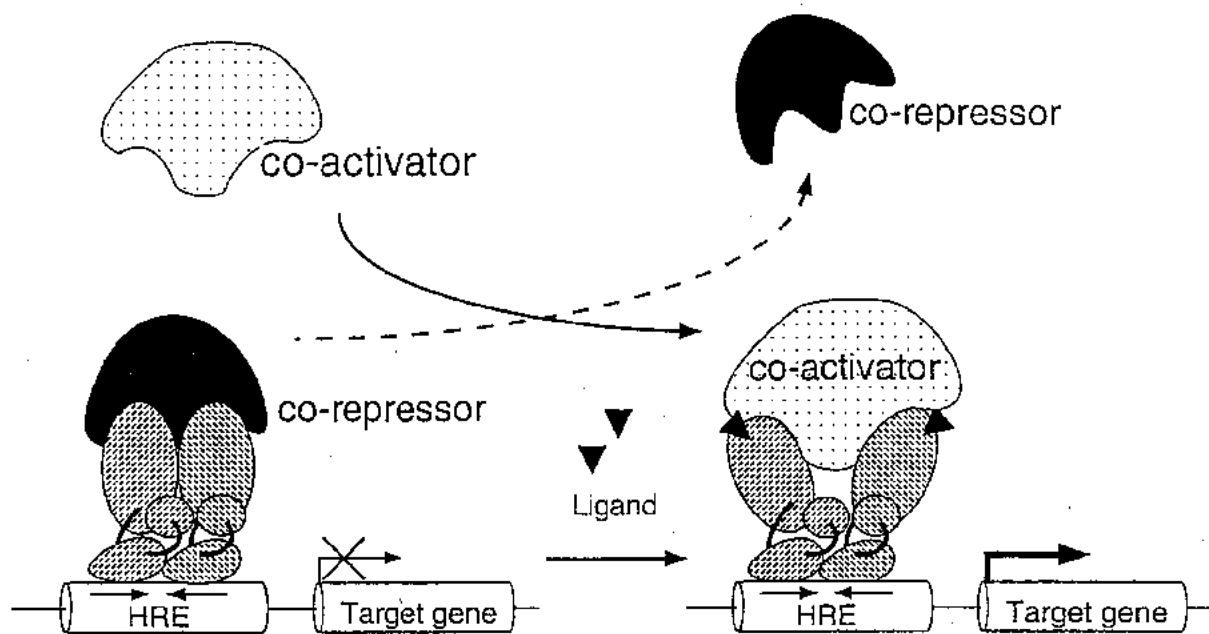


图 1 2

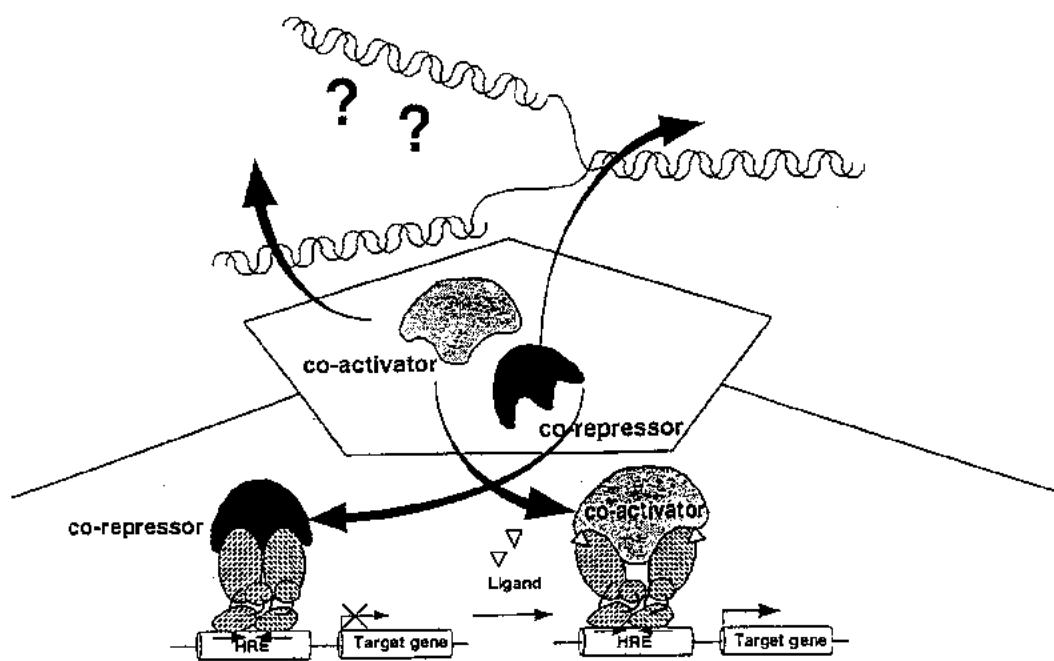
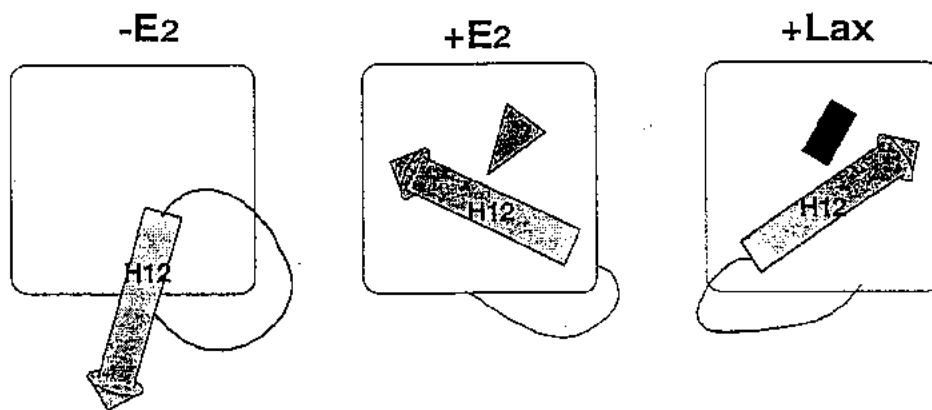
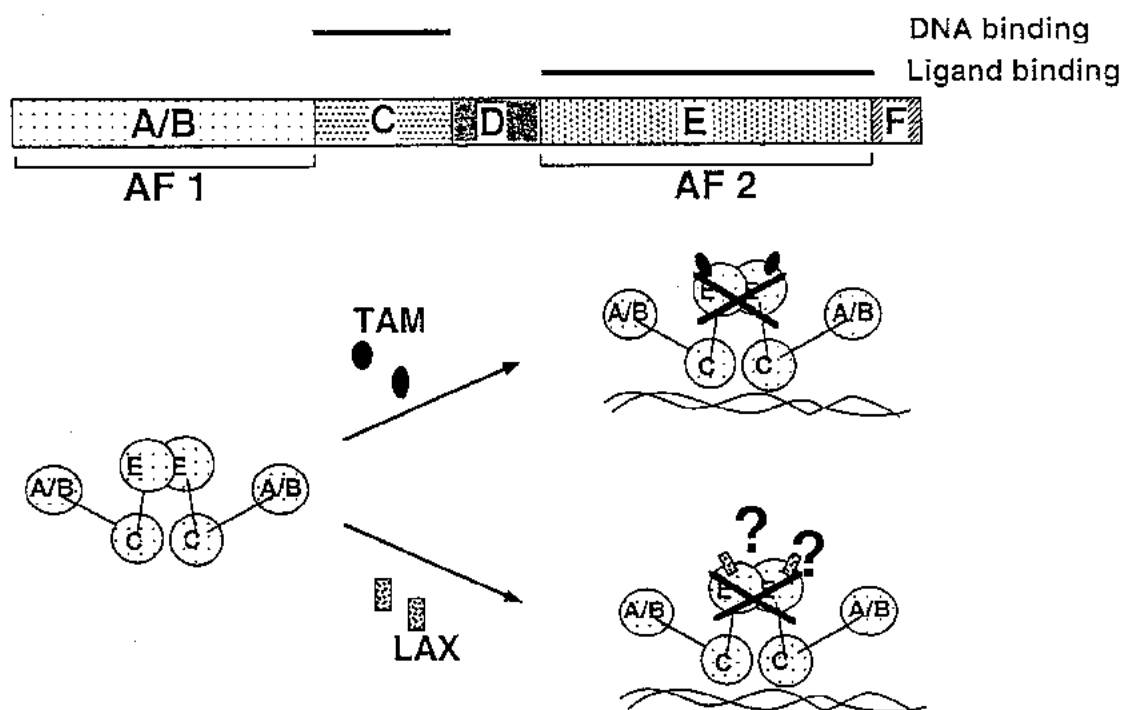


图 1 3



☒ 1 4

ER



☒ 1 5

2. 内分泌攪乱化学物質等の生殖毒性物質と精子形成障害との関連

－生殖細胞死を中心として

長崎大学医学部解剖学第三講座 教授 小路武彦

1. 緒言

環境中に人為的に放出される種々の化学物質が、ヒトを含めた生物の生命活動や生物生態系に深刻な影響を与え始めている。特に、それらの化学物質の多くがエストロゲン作用や抗アンドロゲン作用を有し内分泌生殖毒性を発揮するため種の維持に不可欠である生殖現象に悪影響を及ぼし種の存続に危機感をもたらし始めた。中でも Carlsen 等(92)1)による、最近50年間でヒト精子数が半減しているという報告、更には Sharpe と Skakkebaek(93)2)による、精子数の減少や精巣がんあるいは男性不妊症などの生殖異常の増加が環境中のエストロゲンによるという仮説の発表に伴い、精子形成過程へのそれら外因性内分泌攪乱化学物質の影響が大きく取り上げられるようになった。しかしながら、哺乳類精子形成過程へのそれらいわゆる環境ホルモン或いは種々の内分泌生殖毒性物質の作用機構に関しての細胞生物学的或いは分子細胞学的な詳細な検討は乏しく、多くの記載は現象論であったり多分に推論を含んだ結論となっており、今や因果関係の科学的根拠の提示が必要不可欠と思われる。

我々は、内分泌生殖毒性物質による精子の減少が、生殖細胞死の異常誘導によるものと考え特に能動的・自発的細胞死であるアポトーシスとの関連で検討を進めている。本報告書では、発生過程も含めた齧歯類雄性生殖細胞の細胞死の特性とその検出方法の確立、内分泌系の人為変化に伴う細胞死の変化、種々の内分泌生殖毒性物質投与に伴う生殖細胞死の誘導並びにその分子機序などについて解説し、最終的に内分泌生殖毒性の信頼できる評価系の一つとしての利用法と更に卵子形成過程も取り込み精巣並びに卵巣に対する影響の包括的な評価系の開発への具体的な提言を行いたい。

2. 精子形成過程概要

精巣は、雄性生殖腺として雄性配偶子である精子を産生し、その細胞を丸ごと放出する全分泌型の外分泌腺であると同時に、sex steroidの一つとしてアンドロゲンを産生し分泌する内分泌腺でもある。両分泌腺としての機能は脳下垂体ホルモンとの密接な相互関係により維持されている。哺乳類に於いて精巣は、胎生期に始原生殖細胞(PGC)が精細管に漂着して器官として完成するが、実際に精子産生機能が活性化するのは春期発動期以降である。精子を産生する行程は精子形成過程と呼ばれ、大きく分けて3つの過程に分類される。即ち、出生後 PGC から分化した精原細胞の体細胞分裂による増殖分化過程、精母細胞の減数分裂過程、及び精子細胞の精子への変態過程である。面白いことに、精巣の発生初期段階も含めこれらの様々な過程で生殖細胞の退化消失が認められ、精子の最終生産数に換算すると相当数が失われていることが明らかとなった。例えば、マウスやラットでは精原細胞死等に伴い 25-75%もの精子を失っている計算になり、またヒトに関しても減数分裂前期以降の精母細胞死により約 45%もの精子が消滅している 3)。これらの生殖細胞消滅機構に関しては不明な点が多々あったが、最近になってアポトーシス 4)の関与が指摘されその誘導機構の分子的理解や人為的な操作の可能性が注目を集めている。

3. アポトーシス概要

アポトーシスとは、形態観察に基づいてネクローシスと区別される細胞死の一形態として Kerr 等 (72) (4) によって提案されたものである。歴史的には、ネクローシスは細胞死に伴う細胞形態の変化を意味したことから誤解を避けるため、ネクローシスの代りに 'oncosis' を使用すべきであるという議論もあるが、ここでは最近の慣例に従って以下に定義される細胞死の形態として用いる。ある種のアポトーシスでは、蛋白合成阻害剤シクロヘキシミドによってアポトーシスが阻止されたことから、細胞死に際し新たな蛋白質合成が必要とされたが、シクロヘキシミドでアポトーシスが誘導される場合も報告され一般化は難しい。アポトーシスは核情報に基づいて生じる積極的な能動的な細胞死であると理解されており、特定の遺伝子産物の関与からアポトーシスを定義付ける試みも為されている。しかし現在、細胞種やアポトーシスの誘導原因によって予想以上に多様なアポトーシス形態が存在することが明かとなり、アポトーシスの概念は混沌としている。現段階ではアポトーシスの関与の証明には客観的な多数の傍証を組み合わせることが必要で、最終的には分子基盤での理解と人為的操作の可能性を証明することが重要である 5)。

4. アポトーシス同定法 5)

1) 電顕観察：アポトーシスは、電子顕微鏡による形態学的観察結果から定義されたもので、以下のように特徴付けられる。(1)ネクローシスでは細胞膜の損傷から始まり、ミトコンドリアを始めとする細胞内小器官延いては細胞自身の膨化が生じるのに対し、アポトーシスでは細胞が退縮する。(2)アポトーシスでは核に於いて、クロマチンの凝縮並びに核膜周囲への偏在が生じる。(3)アポトーシスでは核断片や細胞内小器官を含むアポトーシス小体が生じ、周囲の細胞に貪食される。生殖細胞のアポトーシス形態も基本的にはこれらの定義に合致するが、後述するようにアポトーシス過程の中盤からはむしろネクローシスの形態を取るもので厄介である。特に精母細胞のアポトーシス像はユニークで、多くの場合減数分裂前期で生じることと関係しているようである 6)。

更にクロマチンの凝集形態がアポトーシスの誘導方法によって異なる点 7) が指摘されておりこの点も考慮されるべきであろう。

2) 分子組織細胞化学的方法：細胞死に伴う DNA 鎖切断様式に関して、ネクローシスでは一本鎖切断が、アポトーシスでは二本鎖切断が主として生じることが知られている。組織切片上で DNA の一本鎖切断並びに二本鎖切断を細胞個々のレベルで検出するため、DNA の一本鎖切断部位を検出するための *in situ* nick translation⁸⁾ と主として DNA の二本鎖切断部位を検出するための terminalnucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL)⁹⁾ が利用されている。

特に、精巣切片では TUNEL がアポトーシス細胞の検出に頻用されており、原理的には TUNEL は一本鎖切断部位も検出し得る 10) ことも知られ、この染色性がアポトーシスの絶対的指標とはなり得ない訳であるが、我々の電子顕微鏡観察の結果と TUNEL 染色の比較結果から、精巣では基本的に TUNEL 陽性細胞はアポトーシスと考えてよさそうである。

3) 生化学的方法：アポトーシスの生化学的特徴として、DNA をアガロース電気泳動により解析すると、DNA の二本鎖切断により約 180-200 塩基対の倍数からなるバンド群 (apoptotic ladder) が出現することが知られる 11)。しかし正常精巣の場合、アポトーシスの頻度は全細胞数に比して極僅かで、更に減数分裂後の精子細胞 DNA には高頻度の一本鎖切断が存在するため 8)

スメア一部分の染色が強くきれいな ladder は通常のエチジウム染色法では検出しにくい。DNA の 3'-OH を酵素的に ³²P アナログで標識し、オートラジオグラフィーにて検出する高感度法もあるが、アポトーシスの DNA 二本鎖切断のみを検出しているのではない点を強調したい。

4) その他：通常の組織染色である、ヘマトキシリン/エオシン染色でも或る程度アポトーシス細胞は同定されるが、その検出感度は一般的に低い。分散精巣細胞なら、propidium iodide 等により DNA 染色後、flow cytometry により 1C 以下の蛍光強度のピークを検討することによりアポトーシスを観察可能であった 12,13) が、ネクローシスの存在は否定できない。

5. 胎仔期及び周産期マウス精巣に於ける始原生殖細胞死 (図1) (図2)

1) PGC の移住直後の生殖細胞死：哺乳類精巣の実質的な発生・分化は、PGC が卵黄嚢壁より精巣原基に漂着してから開始するものであるが、それ以降周期的な精子形成過程が始まるまで様々な段階で生殖細胞の大量消失が生じる。胎生期のマウスでは、PGC は胎生 12 日目辺りに精巣原基に漂着し、13 日目以降増殖活性の顕著な増大と共に頻回な生殖細胞死を示す。Couchouvanis 等 13) は flow cytometry を用いて検討し、胎生 13-17 日目まで約 4% の一定の頻度で PGC にアポトーシスが生じると報告した。我々は、より定義に即したアポトーシスの頻度を得るため電子顕微鏡により形態観察 14) を行い、直接アポトーシス細胞を計数した所、確かに胎生 13-15 日目では PGC に典型的なアポトーシスが多数観察されたが、その頻度は一定では決してなく 13 日をピークに次第に減少し 17 日までにアポトーシス像は消失した。

図 1 に示したように、PGC のアポトーシス形態は大きく 3 つの段階に分類可能である。Early stage では、クロマチンの核内凝集を有す典型的なアポトーシス像を呈するが、Intermediate stage では核部分と細胞質小器官群とが対峙する奇妙な様相を呈す。更に進んで Late stage に於いては、核成分並びに細胞質成分はそれぞれ凝集塊として散在し、むしろネクローシス形態に近い。これらの形態を示す細胞を全てアポトーシス像として計数するとその変化は図 2 のようであった。これらのアポトーシス形態は、成熟精巣での精子形成過程で見られるアポトーシス像と一致するもので、PGC から既に見られる生殖細胞特有の形態と考えられた。(図1) (図2)

2) 周産期に於ける生殖細胞死：胎生 17 日目になると、アポトーシス像は全く見られなくなるが、一方アポトーシスとネクローシスの中間的な形態、則ち細胞全体としては電子密度が増大し成分の凝集が起こるが、核ではクロマチンの変性が認められ、一方細胞内小器官の崩壊が認められた。その後、出生直後には細胞全体の電子密度も減少し、いわゆるネクローシスへ更に類似した様相を呈する細胞が多数出現した。この種の細胞は TUNEL 陰性で、ネクローシスの一種と見られるが、その詳細は不明である。

出生後の雄性生殖細胞の挙動については多くの研究があるが、生後一週間以内に約 50-75% の精子形成細胞が消滅することが Roosen-Runge と Leik 等 15) により示されている。特に出生直後では、"very dark cells" 16 と呼ばれる核と細胞質に高い電子密度を示し且つ細胞内小器官の破壊を伴う細胞が多数観察されている。

ここで特に重要なことは、胎生後期から周産期に於いてネクローシス様な形態の細胞退縮が認められることで、発生過程で見られる細胞死は "programmed cell death" と呼ばれ更にアポトーシスと同義語として見なされているが、これは明らかに過大解釈である点を認識することであろう。

3) 精子形成過程の開始期に於ける生殖細胞死

マウスでは、生後 4-6 日目から精子形成過程が開始するが、その過程で多数の精原細胞が産生され、それに伴い典型的なアポトーシス像が再現する。ここで観察される精原細胞死は、通常と異なり精細管の基底膜とは離れた管腔内に認められる (14)。これらの細胞の電顕的形態 (17) は成熟精巣の精原細胞で認められるアポトーシス形態と一致しており、TUNEL も陽性であった。その出現ピークは生後 10 日目あたりであった (図 2)。最近アポトーシス誘導を阻害する遺伝子である Bcl-2 蛋白を過剰発現する transgenic マウスにおいてこれらのアポトーシスが阻害され、最終的に精子形成過程の異常に連なることが報告された (18)。精子形成過程開始期の精原細胞アポトーシスの誘導には、Bcl-2 と複合体を形成することによりその機能を中和する蛋白である Bax 発現の増大が関係しているようである。又、この時期に於ける精原細胞のアポトーシスによる除去は、栄養細胞である Sertoli 細胞の維持能力を越える過剰な精子形成を予め防ぐ狙いがあると思われる。

4) 成熟精巣に於ける生殖細胞死

正常成熟個体での精子形成過程では、種々の分化段階の生殖細胞で細胞死が生じていることが古くから知られているが、それがアポトーシスかネクロシスかについては議論となっていた。Allan 等は、電子顕微鏡的な観察に基づいて精原細胞の細胞死はアポトーシスであるが、精母細胞等に生じている細胞死はネクロシスであると報告した (19)。一方 Kerr は、精母細胞も光顕的なアポトーシスの形態として理解されている pyknosis 像を示すことを明らかにした (20)。その後、TUNEL 染色の結果精母細胞の核も染色されると共にその出現率と DNA ladder の染色強度が良く相関することが判明し、精子形成細胞の場合は形態的には必ずしも典型的なアポトーシス像を呈していなくてもアポトーシスと見なされるようになった。

正常状態で生じる生殖細胞アポトーシスが生殖上皮周期のどの様なステージで好発するかについては、ラットではステージ I-IV と XI-XIV 即ち減数分裂の分裂期前後 (21) で、又マウスでもステージ XII 辺りの減数分裂分裂期前後の premeiotic 生殖細胞で頻回であることを我々は観察している。

尚、成熟精巣で見られる精子形成細胞アポトーシスの誘導の分子機構に関しては現在不明である。また、Bcl-2 の過剰発現マウスでも、成熟精巣アポトーシスを阻害することは出来ない (18)。

6. 内分泌系の人為操作に伴うアポトーシスの変化

1) 下垂体摘出モデル: Tapanainen 等 (22) によると、幼若ラット (21 日齢) から下垂体摘出を行うと、精巣から抽出した DNA のアガロースゲル電気泳動に於いて、2 日後では明らかな ladder が観察された。Russel & Clermont (23) による、下垂体摘出後 5.5 日でステージ VII の精母細胞と精子細胞に顕著な退化が生じるという観察に基づいて考えると、この ladder 形成は主として精母細胞に由来するものと考えられる。また FSH 或いはテストステロン投与により顕著に ladder 形成が抑えられることから、下垂体摘出に伴う精母細胞のアポトーシスの誘導はテストステロンの欠損によると考えられた。

2) GnRH antagonist 投与モデル: 上記の下垂体摘出モデルと同様の機構に絡むアポトーシス研究モデルとして GnRH antagonist の腹腔投与も利用されている。Billig 等 (24) は、幼若ラット (16-32 日齢) に azaline-B を投与して検討した所、DNA ladder 形成の観察と共に TUNEL による精母細胞の陽性染色結果を得た。一方成熟ラットでの同様の検討では FSH と LH のレベルの顕著

な減少は認められたにもかかわらず azaline-B の効果は見られなかった。このことは、最初の精子形成過程は以降の過程と比較して FSH の要求性と同様にテストステロンへの要求性も高いことを示している。

本研究では、成熟ラットの特にステージ VII でアポトーシスが観察されず、むしろステージ I と XII-XIV で精母細胞のアポトーシスが頻度高く見られたことは要注意である。Sinha Hikim 等 25) は、GnRH antagonist として Nal-Glu を成熟ラットに投与した所、テストステロンの消失とステージ VII での精母細胞並びに精子細胞のアポトーシスを見出した。この結果はアンドロゲン受容体発現が、同じくステージ VII の Sertoli 細胞で強く発現していることを考慮すると合理的であるが、Billig 等の内容とは矛盾する。両論文での成熟 spermatogenesis のステージ VII への両拮抗剤の作用の差異は、後述するように薬理的な機構の違いを反映している可能性もあり検討を要する 21)。

3) 潜伏辜丸モデル：加温による spermatogenesis の阻害モデルとして潜伏辜丸は頻用されるものの一つで特に A 精原細胞以外の生殖細胞を退化消滅することが出来る。Sikone 等 26) は、幼若ラット (22 日齢) 精巣を腹腔内に固定し、潜伏精巣とすると 7 日以内に DNA ladder 形成が 3-4 倍となり、TUNEL により主として精母細胞がアポトーシスを起こしていることが明らかとなった。この際、血中テストステロンレベルには変化がなかった。成熟ラットで潜伏精巣を起こすと、24-28 時間で明らかに精原細胞以外の生殖細胞にそのステージに関わらずアポトーシスの誘導が観察された 27)。

従って、このアポトーシスの誘導には、ホルモン非依存的な障害機構が関わっていることが予想される。一般的に精原細胞は加温に抵抗性を示すが、他の細胞は弱く加温効果により死滅するのは予想できることであるが、これらの研究はそれがアポトーシスを介していることを示した訳である。もっとも、Allan 等 28) によると、精巣を 43 °C で 30 分加温処理すると精原細胞と preleptotene 精母細胞はアポトーシスを示すが他の精母細胞はネクローシスを生じるとあるので、加温の程度で死滅様式が変化する可能性もある。

4) エストロゲン大量投与モデル：成熟マウスにエストロゲンを大量投与すると type B 精原細胞以降の分化段階の生殖細胞が消失することが知られている 29)。我々も、成熟マウス腹腔内へ β -estradiol-3-benzoate を連続大量投与したところ特に精母細胞並びに精子細胞が TUNEL 陽性となり、アポトーシスで死滅していることが判明した。この際、後述するアポトーシス誘導受容体である Fas が生殖細胞に強く発現され、また Sertoli 細胞によるアポトーシス誘導シグナルである Fas リガンド発現も増強されていることも判った 30)。エストロゲン大量投与による雄性生殖細胞アポトーシス誘導と同様な現象が diethylstilbestrol 投与で生じることも既に報告されている 31)。

7. 生殖毒性物質のアポトーシスへの影響

Troiano 等 12) は、ethane dimethane sulphonate を成熟ラットに投与し、Leydig 細胞を障害し血中テストステロンを検出レベル以下に下げ、生殖細胞の DNA 量を flow cytometry で検討した。その結果 DNA の断片化が検出されアポトーシスの誘導が示唆されるが、DNA ladder は認められなかった。

Ku 等 32) は、2-methoxyethanol の精母細胞への毒性をラットとモルモットで検討し、pachytene 精母細胞でラットでは形態的にはネクローシス像を示し、モルモットではアポトーシス像を示すこ

とが明らかにした。しかし、両者で共に DNA ladder の出現と TUNEL 陽性像が得られ、最終的には両種で pachytene 精母細胞はアポトーシスを起こしたものと判定された。この様に種々の薬剤で精子形成細胞にアポトーシスが誘導されることが明らかとなってきたが、その好発生殖上皮周期についても興味ある知見が報告されつつある。Cai 等 21) は、抗ガン剤である cyclophosphamide のラットへの投与による生殖細胞アポトーシスの誘導がステージ I-IV と XI-XIV で顕著であることを示し、methoxyacetic acid 投与の場合 33) と同様に減数分裂の分裂期前後が影響を受けやすいことが判明した。更に Lee 等 34) は、成熟マウス精巣にて mono-(2-ethylhexyl)phthalate や 2,5-hexanedione 等の Sertoli 細胞障害剤投与により TUNEL 染色からみた生殖細胞アポトーシスの増大を認めた。

8. 精子形成細胞アポトーシスと Fas/Fas ligand 系

アポトーシスが注目を集めている最も大きな理由は、その死過程が特定の遺伝子によって制御されているという点にある。我々は、Fas/Fas ligand 系の生殖細胞アポトーシス誘導への関与を考え種々のアプローチを行ってきた。Fas 35) は膜貫通型の糖蛋白質抗原で、この抗原に対する IgM 抗体を作用することによりアポトーシスを引き起こすことが知られる。Fas の遺伝子は後にクローニングされ TNF/nerve growth factor 受容体 family に属することが判明し、更に Fas と同様の機能を持つ APO-1 と同一物質であることも判明した。Fas の天然のリガンドとして type II の膜貫通型蛋白である Fas ligand が発見され 35)、自己免疫疾患等での免疫系に絡んだ役割を中心として解析が進められている。更に免疫系以外でも、卵巣での卵胞閉鎖への関与 36) や潰瘍性大腸炎 37) 或いは腎虚血再灌流における尿細管上皮のアポトーシスの誘導 38) には Fas/Fas ligand 系の関与が強く示されている。成熟マウス精巣では、正常でもある程度の TUNEL 陽性細胞が認められ特に精原細胞と精母細胞に生じる。我々が独自に作製した抗 Fas 及び抗 Fas ligand 抗体は、ホルムアルデヒド固定パラフィン切片で特異的シグナルを検出できるユニークなものであるが、これらを用いて精巣での発現を検討した 3,39)。その結果、Fas は Leydig 細胞と生殖細胞に散発的に発現しており、Fas ligand は Sertoli 細胞に特異的に検出された。しかしながら、切片上では同一精細管内での両者の同時発現は観察されず自然に生じているアポトーシスの関与については現在疑問が残る。また、常染色体劣性遺伝突然変異マウスである lpr (lymphoproliferation) (レトロウイルストランスポゾンの Fas 遺伝子第二イントロンへの挿入があり、転写活性が著しく低下している) や gld (generalized lymphoproliferative disease) マウス (Fas ligand の細胞質部分に点突然変異がありその機能を失っている) でも、TUNEL 陽性細胞を多数検出することから Fas 系が精巣でのアポトーシス誘導の唯一の系ではないことが明らかである 3)。Sertoli 細胞が発現する Fas ligand の生理的機能については、精巣内への免疫細胞の進入を阻止するためである可能性が指摘されている。抗原刺激等で活性化された T 細胞はしばしば Fas 陽性であるからである。

最近になって、Lee 等 35) は我々の結果と同様に成熟マウス精巣にて Fas 並びに Fas ligand 発現を確認し、更に mono-(2-ethylhexyl)phthalate や 2,5-hexanedione 等の Sertoli 細胞障害剤投与により両遺伝子発現の顕著な増大と TUNEL 染色からみた生殖細胞アポトーシスの増大が認められ、障害モデルに於ける生殖細胞死誘導への Fas 系の関与が示唆された。我々もマウス虚血再灌流精巣モデル並びにエストロゲンの大量投与精巣モデルに於いて同様の知見を得た 30,39)。

9. ヒト精巣病態とアポトーシス

ヒトの精子形成過程に於いてアポトーシスの詳細な研究は見当たらないが、少なくとも減数分裂過程、特に第二次精母細胞当たりで約 45%の細胞が消失していることが知られている。我々は、ヒト精巣性不妊に於ける病態の一つとして知られている maturation arrest への生殖細胞死の関与を検討しているが 40)、多くの症例で残り少ない生殖細胞集団で TUNEL 陽性精原細胞並びに精母細胞を見い出しており、電顕的検討でもアポトーシスが好発しているのが認められている。面白いことにこれらの症例では、Fas 陽性生殖細胞と Fas ligand 陽性 Sertoli 細胞が隣接して存在しており、Fas 系がアポトーシス誘導原因となっている可能性が示唆された。

10. 結語

以上述べてきたように哺乳類精子形成過程に於いて、特に生殖細胞死に関してはその生理的特性や個体発生的変化はもとより種々の生殖毒性を示す化学物質の影響も分子レベルで解析が可能となってきている。現在、内分泌攪乱物質による影響として社会的に大きな衝撃を起こしている精子数の減少問題は、いたずらに驚き恐れるのではなく個々の物質について直接的な評価系を用いて検証することが必要であると強く思われる。このための検証系として、マウス精子形成過程に於ける生殖細胞アポトーシス誘導作用の検討は、個体レベルで胎仔、新生仔、幼若及び成熟期に渡って科学的な因果関係をもって種々の物質の内分泌生殖毒性の評価を可能とする点多いに魅力ある評価系と思われる。

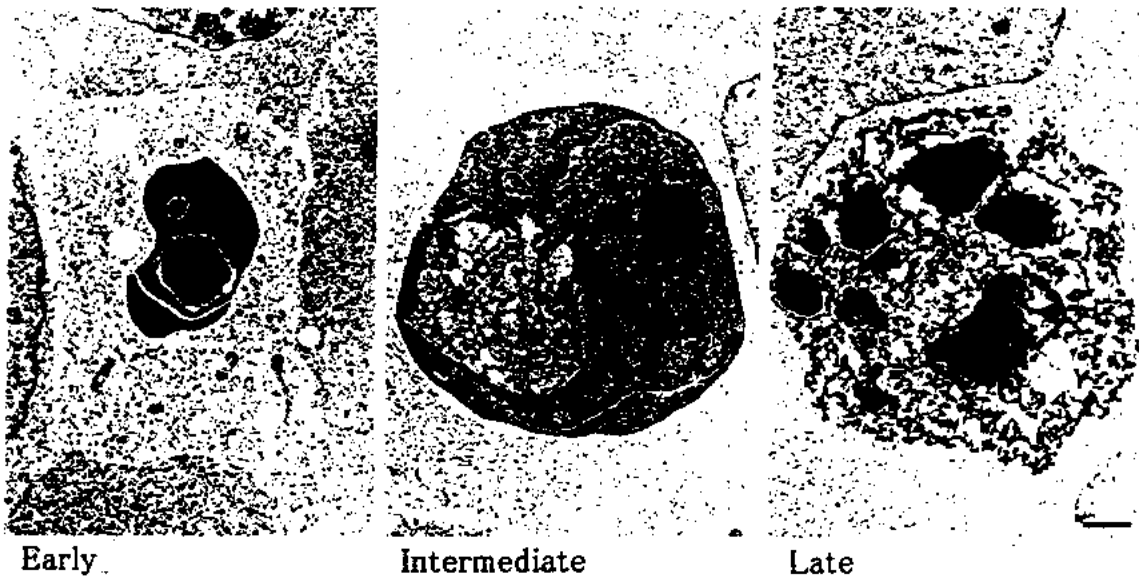
11. References

- 1) Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, et al: Evidence for decreasing quality fo semen during past 50 years. *Br Med J* 305: 609-613, 1992
- 2) Sharpe RM & Skakkebaek NE: Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 341: 1392-1395, 1993
- 3) 小路武彦: 精巣機能とアポトーシス. *ホルモンと臨床* 45 (3): 255-262, 1997
- 4) Kerr JFR, Wyllie AH & Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257, 1972
- 5) 小路武彦 & 中根一穂: アポトーシス概論. in *現代病理学大系 補遺 1*, 東京, 中山書店, 35-45, 1995
- 6) Blanco-Rodriguez J & Martinez-Garcia C: Spontaneous germ cell death in the testis of the adult rat takes the form of apoptosis: re-evaluation of cell types that exhibit the ability to die during spermatogenesis. *Cell Prolif* 29: 13-31, 1996
- 7) Dini L, Coppola S, Ruzittu MT & Ghibelli L: Multiple pathways for apoptotic nuclear fragmentation. *Exp Cell Res* 223: 340-347, 1996
- 8) Koji T: Nonradioactive in situ nick translation: A useful molecular histochemical tool to detect single-stranded DNA breaks. *Acta Histochem Cytochem* 29: 71-79, 1996
- 9) Gavrieli Y, Sherman Y & Ben-Sasson SA: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493-501, 1992
- 10) Hashimoto S, Koji T, Niu J, et al: Differential staining of DNA strand breaks in

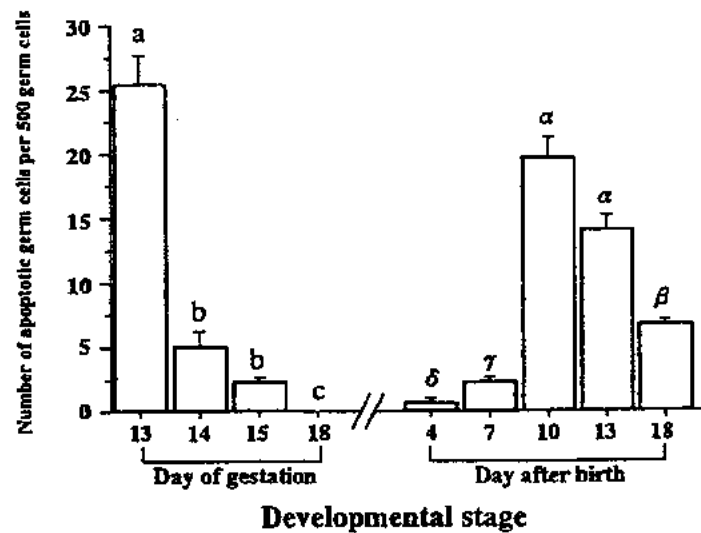
- dying cells by non-radioactive in situ nick translation. *Arch Histol Cytol* 58: 161-170, 1995
- 11) Wyllie AH: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555-556, 1980
 - 12) Troiano L, Faustini Fustini M, Lovato E, et al: Apoptosis and spermatogenesis: evidence from an in vivo model of testosterone withdrawal in the adult rat. *Biochem Biophys Res Commun* 202: 1315-1321, 1994
 - 13) Coucouvanis EC, Sherwood SW, Carswell-Crumpton C, et al: Evidence that the mechanism of prenatal germ cell death in the mouse is apoptosis. *Exp Cell Res* 209: 238-247, 1993
 - 14) Wang R-A, Nakane PK & Koji T: Autonomous cell death of mouse male germ cells during fetal and postnatal period. *Biol Reprod* 58: 1250-1256, 1998
 - 15) Roosen-Runge EC & Leik J: Gonocyte degeneration in the postnatal male rat. *Am J Anat* 122: 275-300, 1968
 - 16) Miething A: Germ-cell death during prespermatogenesis in the testis of the golden hamster. *Cell Tissue Res* 267: 583-590, 1992
 - 17) Koji T & Wang R-A: Male germ cell death in mouse testes. In *Apoptosis: Its role and Mechanism* (ed by Yamada T & Hashimoto Y), Tokyo, Business Ctr. for Acad. Soc. Japan, 85-96, 1998
 - 18) Rodriguez I, Ody C, Araki K, et al: An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J* 16: 2262-2270, 1997
 - 19) Allan DJ, Harmon BV & Roberts SA: Spermatogonial apoptosis has three morphologically recognizable phases and shows no circadian rhythm during normal spermatogenesis in the rat. *Cell Prolif.* 25: 241-250, 1992
 - 20) Kerr JB: Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the spermatogenic cycle. *J Reprod Fert* 95: 825-830, 1992
 - 21) Cai L, Hales BF, & Robaire B: Induction of apoptosis in the germ cells of adult male rats after exposure to cyclophosphamide. *Biol Reprod* 56: 1490-1497, 1997
 - 22) Tapanainen JS, Tilly JL, Vihko KK, et al: Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol Endocrinol* 7: 643-650, 1993
 - 23) Russel LD & Clermont Y: Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. *Anat Rec* 187: 347-366, 1977
 - 24) Billig H, Furuta I, Rivier C, et al: Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology* 136: 5-12, 1995
 - 25) Sinha Hikim AP, Wang C, Leung A, et al: Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology* 136: 2770-2775, 1995

- 26) Shikone T, Billig H & Hsueh AJW: Experimentally induced cryptorchidism increases apoptosis in rat testis. *Biol Reprod* 51: 865-872, 1994
- 27) Henriksen K, Hakovirta H & Parvinen M: In-situ quantification of stage-specific apoptosis in the rat seminiferous epithelium: effects of short-term experimental cryptorchidism. *Int J Androl* 18: 256-262, 1995
- 28) Allan DJ, Harmon BV & Kerr JFR: Cell death in spermatogenesis. In *Perspective on Cell Death* (ed by Potten CS), NY, Oxford University Press, 229-259, 1987
- 29) Libbus BL & Schuetz AW: Reinitiation of spermatogenesis by hormones as assessed by cellular parameters in vitro. *Biol Reprod* 21: 353-364, 1979
- 30) Koji T, Ohta H & Kobayashi N: Involvement of Fas/Fas ligand system in the induction of germ cell apoptosis in ischemia-reperfusion and estrogen-treated mouse testes. *Zool Sci* 15 (Suppl): 15, 1998
- 31) Nonclercq D, Reverse D, Troubeau G, et al: In situ demonstration of germinal cell apoptosis during diethylstilbestrol-induced testis regression in adult male Syrian hamsters. *Biol Reprod* 55: 1368-1376, 1996
- 32) Ku WW, Wine RN, Chae BY, et al: Spermatocyte toxicity of 2-methoxyethanol (ME) in rats and guinea pigs: evidence for the induction of apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 134: 100-110, 1995
- 33) Brinkworth MH, Weinbauer GF, Schlatt S, et al: Identification of male germ cells undergoing apoptosis in adult rats. *J Reprod Fertil* 105: 25-33, 1995
- 34) Lee J, Richburg JH, Younkin SC, et al: The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology* 138: 2081-2088, 1997
- 35) Nagata S & Golstein P: The Fas death factor. *Science* 267: 1449-1456, 1995
- 36) Hakuno N, Koji T, Yano T, et al: Fas/APO-1/CD95 system as a mediator of granulosa cell apoptosis in ovarian follicle atresia. *Endocrinology* 137: 1938-1948, 1996
- 37) Iwamoto M, Koji T, Makiyama K, et al: Apoptosis of crypt epithelial cells in ulcerative colitis. *J Pathol* 180: 152-159, 1996
- 38) Nogae S, Miyazaki M, Kobayashi N, et al: Induction of apoptosis in ischemia-reperfusion model of mouse kidney: Possible involvement of Fas. *J Am Soc Nephrol* 9: 620-631, 1998
- 39) Koji T, Ohta H, Kobayashi N, et al: Involvement of Fas /Fas ligand system in the induction of germ cell apoptosis in normal and ischemia-reperfusion testis of adult mouse. *Cell Struct Funct* 22: 757, 1997
- 40) Eguchi J, Koji T, Nomata K, et al: Involvement of apoptotic cell death through the Fas-Fas ligand system in "maturation arrest" of the male infertility status. *Contracept Fertil Sex* 23: S84, 1995.

Various stages of germ cell apoptosis (F13)



[図1] マウス胎生13日精巣に於ける始原生殖細胞アポトーシスの電顕像
Early, Intermediate, Late の三つのステージが分類される。Bar: 2 μ m



[図2] マウス精巣の発生に伴うアポトーシス生殖細胞の出現

胎生13-15日精巣でのアポトーシスは電子顕微鏡観察により、またそれ以降では TUNEL 陽性細胞

として計数された。値は3-4匹からの Mean+SEM であり、Student's t-test により有意差検定を行った。各グループにおいて、有意な差異が認められるもの ($p < 0.05$) は異なる文字で区別した。

3. 比較胎生病理学からみた内分泌攪乱

井上 稔 名古屋大学環境医学研究所

要約

内分泌、自律神経系の中樞である視床下部は、男女の二形性が認められる領域である。視床下部の神経細胞の分化は、妊娠後半の胎児期に起こるが、強力な性ホルモン物質に曝露された場合には性分化が障害される。

視床下部の第三脳室腹側周辺域は、血液脳関門が欠如し、血中の化学物質に直接接触することから、胎児でなくても強いホルモン作用をもつ物質に曝露されれば、視床下部一下垂体系での内分泌攪乱が起こる可能性がある。

いっぽう、神経伝達物質グルタミン酸、またはそのアゴニストのような興奮性化学物質は、視床下部の神経細胞を興奮させる。過剰量の興奮毒は神経細胞を興奮死させ、中大量の興奮毒は視床下部一下垂体系を刺激し、いずれも内分泌、自律神経系を攪乱する恐れがある。

胎児・新生児の視床下部では、血液脳関門を欠く領域は成人より広く、神経細胞も脆弱であり、毒物に曝露されたり、性分化に必要な細胞環境の攪乱にあった場合には、不可逆的な障害が起こる恐れがある。発達中の脳の障害という観点から、外因性化学物質の内分泌攪乱作用を検討する必要性について述べた。

始めに

環境を汚染した人為起源の化学物質がホルモン作用をもつことで、生態系が混乱し始めているのは事実としても、われわれが直接影響を受けるほど大量に曝露されることがあるだろうか。外部から取り入れた化学物質がホルモン作用をもっていたとしても、巧妙なフィードバック機構があり、それらの物質に単純に影響されとは限らない。しかし、フィードバックの中樞が

影響を受けて、内分泌が攪乱される可能性も考えられる。そこで、下垂体からのホルモン分泌を支配するとともに、自律神経系の最高位の中樞である(30)、視床下部(広義)の障害に注目して、内分泌攪乱を考察する。

I. 視床下部

大脳皮質の形態や機能に(重さ以外)男女差はないが(7)、視床下部には男女の二形性がある。この性分化は胎児期に起こり、性ホルモンの影響を受けるので、外因性性ホルモン作用物質によっても影響を受ける可能性がある。

I. 1. 視床下部の性的二形性

ラット視索前野の内側核(medial nucleus)は、雄が雌の5倍の体積をもち、神経細胞数もその分だけ多い(12)。同様のことはヒトでも認められ、視索前野内側核の大きさは男性が女性の2.5倍、細胞数は2.2倍(48)である。この神経核を破壊すると、雄ラットの交尾回数が激減するという(2)。雌ラットでは、発情期に入るためのゴナドトロピン放出ホルモン(LH/FSH-RH)放出が減少する(51)。

いっぽう、この神経核の近くにある視索前野室傍核前腹部(anteroventral periventricular nucleus)は雌の方が雄より大きく、細胞密度も高い(3)。この核及び視索上核(supraoptic nucleus)の神経細胞は、バソプレッシンとオキシトシンを合成し、これらのホルモンは軸索中を流れて下垂体後葉に貯留されて後葉ホルモンとして放出される(30)。オキシトシンの生理作用として、子宮筋収縮、卵管の蠕動亢進、乳汁分泌亢進と、雌に関係する作用が知られており、視索前野室傍核が雌で大きい理由かもしれない。

これらが存在する第三脳室腹側周辺域は、血液脳関門が欠如し、血中の化学物質に直接接触する。

I. 2. 視床下部の細胞発生

視床下部の神経細胞発生は、脳の神経細胞発生の最も早期に始まる。マウスでは受精後 10 日から 12 日 (45)、ラットでは受精後 13 日から 15 日に大多数の神経細胞が第三脳室の脳室帯で最終細胞分裂を終える (17)。最終的に第三脳室から遠い外側背側に位置を占める神経細胞が早く発生し、内側に位置する細胞は後から発生する。この時期は、ヒトの脳の発生では受精後 5 ~ 8 週に相当し、大脳皮質神経細胞の発生時期より早い (付表)。しかし、性による二形性を示す、視索前野の内側核と室傍核の神経細胞は発生期間が長く、同じころ発生を始めても、全ての神経細胞が最終分裂を終えるのは、ラットの受精後 17 日頃 (ヒトの 13 週に相当) になる (13,29)。

最終分裂を終えた神経細胞は、第三脳室の脳室帯を離れて最終的な位置まで遊走して集合し、分化する。この時期に神経細胞の数の調整がおこなわれ、ラットでは生後 13 日頃 (ヒトの受精後 24 週程度) までに一定の細胞死が起こる。二形性を示す核の神経細胞は、産生された時は雌雄同数と考えられるが、細胞死に雌雄差があることで最終的な細胞の数の差ができる。

I. 3. 性分化に対するホルモンの影響

視床下部の性による二形性が現れるのは、ヒトでは胎児期である。哺乳類の脳は元来雌であり、性分化の臨界期に生殖腺でつくられるホルモンによって、雄の脳になると考えられる。

胎児の生殖腺に始源生殖細胞が遊走 (ヒトでは受精後 6 週) した後、生殖腺はわずかながらテストステロンとエストラジオールの両方を合成し始める。受精後 8 週から、精巣ではテストステロン、卵巣ではエストラジオールの合成が高まり、出生近くまで性ホルモンの高い状態が続く。エストラジオールは、胎児の肝臓で大量

に作られる胎児型のエストロゲン結合蛋白 (fetoneonatal estrogen binding protein, FEBP/ α -fetoprotein, AFP) と強く結合しており、自由に神経細胞に入れない。神経細胞は能動的に、結合蛋白に結合したエストラジオールを取り込むので、その量を調整できる。また神経細胞は、この結合蛋白を既に取り込んで持っており、フリーのエストラジオールが入ってきても捕捉できる。結合蛋白 FEBP/AFP は、母体と胎盤でつくられるエストロゲンの胎児への輸送にも働く。いっぽうテストステロンはフリーであり、神経細胞に入ることができる。結合蛋白 FEBP/AFP の合成は、性ホルモンの高い期間に一致し、生後には減少する (8,24)。生後の、性ステロイド結合蛋白は、アンドロゲンとも結合する。

胎児の神経細胞に入ったテストステロンは、アロマターゼによってエストラジオールに変換され (テストステロンの A 環が芳香化され)、受容体に結合する。このとき、変換されなかった少量のテストステロンと、テストステロンから変換された比較的大量のエストラジオールの、相乗作用によって男性化が起こるといわれる。女性の神経細胞も、生存・分化のために少量のエストラジオールは必要である。

すなわち、神経細胞の受容体に結合するエストロゲンの多いことが脳の男性化に必要であり、この点が性器の発達とは逆であることに注意を要する (8)。

脳の性分化が起こる時期と一致してアロマターゼが発現し、ラットでは受精後 18 日から生後 2 日にかけて (ヒトの脳では受精後 15 週から 20 週に相当) 最も高くなり、その後ゆっくり減少するが、生後 21 日 (ヒトの脳では出生間際に相当) でもまだ検出される (46)。アロマターゼの存在する部位は、性による二形性が現れる領域を含む視床下部や扁桃核である。そして、アロマターゼの活性および mRNA の誘導には、テストステロンが必要といわれる (14)。

ラットの雄の新生児を去勢すると、視索前野の内側核の細胞死が増え、この核 (雄では雌の

数倍大きい) が小さくなった(6)。いっぽう、出生から5日間テストステロンを注射した雌ラットでは、視索前野の室傍核前腹部の細胞死が増え、この核(雌では雄より大きい) が小さくなった(27)。また妊娠中でも、ラットの受精後16日(ヒトの脳では受精後11週程度)に、母親1匹当たり4 mgのテストステロンを注射して産まれた雌は、成長しても膣が開口せず、膀胱に隣接して精囊と前立腺がみられた。視索前野の内側核(雌では雄より小さい)の体積は2倍になっていた(21)。

以前には、妊娠中に天然あるいは合成のアンドロゲンやエストロゲン、黄体ホルモンによる治療を受けた婦人の女兒に、陰核の肥大など男性化が起こった例がある。ジエチルスチルベストロールを妊娠4～30週に投与された母から産まれた女兒の外性器の男性化は、胎児副腎に異常を起こしたことによる男性ホルモン生成の結果と推定されている(41,44)。脳の観察は報告されていないが、ジエチルスチルベストロールなど合成ホルモンは、エストロゲン結合蛋白と結合しないので(24)、脳の男性化が起こったかもしれない。黄体ホルモンの使用では、男児の尿道下裂も報告されている。これらはmgオーダーで投与された。その他にも、マウスからサルまで多種類の動物を使った、性ホルモンによる催奇形性の実験は数多い(41)。妊娠中とはいえ、生理的な性ホルモンの血中濃度は多くても $\mu\text{g/l}$ のオーダーであるから、投与量はかなり高い。環境化学物質でこのようなことが起こり得るかどうか分からないが、極めて強力な性ホルモン作用をもつ物質が存在するかもしれない。エストロゲン作用をもちながら、結合蛋白と結合せずフリーで胎児脳内に入れば、脳の性分化に悪影響を及ぼす可能性がある。

I. 4. アロマターゼ活性の影響

水域汚染物質のトリブチル錫やトリフェニル錫が、巻き貝の雌にペニスができるなど、雌を雄化するメカニズムとして、アロマターゼ活性

の低下によるという説がある(52)。それによると、エストラジオールの合成には、テストステロンあるいは androstenedione が前駆体となり、アロマターゼの反応を受けるので、アロマターゼ活性が低下すると、前駆体のアンドロゲンが増えてしまうというが、詳細は不明である。実験的に合成アロマターゼ阻害剤や、環境汚染物質であるメチルコラントレンなどにサケの卵胞を曝露すると、エストラジオール分泌が低下するという(1)。カメの卵を雌になる温度で孵卵し、アロマターゼ阻害剤を投与すると、卵巢と精巢の中間 ovotestis ができる(9)。Cd、Co、Cu、Hg、Ni、Zn など重金属のイオンは、精巢 Leydig 細胞のテストステロン合成を阻害する(23)。これら金属イオンは胎盤を通過しないものが多いが、新生児期の曝露によるテストステロン低下は、脳のアロマターゼ活性および mRNA の誘導の低下につながり(前頁 I. 3)、性分化が障害される恐れがある。

すなわち、外因性化学物質がアロマターゼ活性を低下させた場合には、雄では脳の雌化、雌では性器の雄化という、両性に対する異なった影響が現れる可能性がある。アロマターゼ遺伝子をノックアウトしたマウスでは、雌は子宮が未発達で、雄は交尾できるが、交尾回数が極めて少なかった(16)。

交配直後の雌ラットにトリブチル錫を投与すると、子宮の脱落膜反応が抑制されて、胎芽の着床が阻害される(15)。われわれは、メチル水銀でも同様にマウスの脱落膜反応が異常になり、胎芽の着床異常が起こることを示した(22)。トリフェニル錫も妊娠ラットに投与すると、妊娠が継続しない(5)。これらの現象は、妊娠の成立に関わるホルモンの異常が起こった可能性を示すが、そのメカニズムは不明である。卵巢や副腎のアロマターゼ活性低下によって、エストロゲン合成が減少することで、妊娠反応に異常が生ずる可能性も否定できない。

II. 興奮性神経毒

興奮性神経毒性に関しては、主として興奮性アミノ酸の研究が進んでおり、その点では環境汚染化学物質とはやや異なるが、重金属などには興奮性神経毒性の疑われるものがある。多数のアゴニストやアンタゴニストが知られ、各サブタイプの受容体もクローニングされているので、毒性メカニズムが興奮毒性である環境化学物質については、解析がより容易かもしれない。

II. 1. グルタミン酸

1968 年、チャイニーズ・レストラン・シンドロームの原因物質がグルタミン酸ソーダ (monosodium glutamate, MSG) であることがつきとめられた(42,43)。空腹でたった 1 杯の雲呑スープを食っただけで、首の背側から腕の焼灼感、胸の痛みや頭痛が起こった。当時の中華スープには大量の、例えばラーメン・スープ 1 杯には 10 g を越える、MSG が含まれていたと推定される (味の素社私信) が、スープを最初に食べる習慣のない我国では問題にならなかった。症状を引き起こす MSG の最低量は 2 ~ 12 g であった(43)。

翌年 Olney は、マウスの新生児に 0.5 ~ 4 g/kg 体重の MSG を投与すると、視床下部弓状核の神経細胞が破壊されることを報告した。神経伝達物質グルタミン酸の興奮毒性によって、神経細胞がアポトーシスに陥ると考えられる。さらに、新生児期に 10 日間 MSG を連続投与した児を育てると、摂食量はむしろ少ないのに肥満し、それでいて長骨は短く、雌は不妊になったことから、内分泌系の障害が示唆された(31)。視床下部一下垂体系の内分泌が障害され、成長ホルモンの不足による長骨の発育不全、性ホルモンの攪乱による不妊が起こったと考えられる。嗜眠性であったことも視床下部の障害と矛盾しない。

その後、ラットの新生児期に MSG を投与すると、高インスリン血症となることがわかった(40)。弓状核の神経細胞にはインスリン受容体があるので(54)、弓状核破壊によって、自律神経系を通じたインスリンのネガティブ・フィー

ドバックができなくなったと考えられる。

MSG を含む食品を摂取した場合の血中濃度の推移は、他のアミノ酸との関係で一定でないと思われるが、MSG 水溶液をヒトが飲用した実験では、摂取 1 時間後までに急速に血中グルタミン酸濃度が上昇し、その濃度はマウスに経口投与した場合と比較して 5 倍であった(34)。経口投与で、マウスの新生児の視床下部弓状核に神経細胞死を起こす MSG の量は 0.5 g/kg 体重であることから計算すれば(32)、ヒトはマウスより 5 倍感受性が高いとして、体重 10 kg の子供が 1 g の MSG を食せば危険な可能性がある。成獣のマウスの方が感受性が低く、2 g/kg 以上で神経細胞死が起こる。この計算式を用いれば、体重 50 kg の成人でも、20 g 以上の MSG を一度に食することは危険かもしれない。

II. 2. 胎児に対する毒性

MSG に対する脳の傷害感受性は、若齢動物の方が成獣より高いことから、ヒトでは胎児の傷害が危惧された。マウスの新生児の脳は、ヒトの受精後 20 ~ 24 週の脳の発達に匹敵する。われわれは経胎盤的に、グルタミン酸、アスパラギン酸がマウス胎児の脳の神経細胞死を引き起こすことを示した。傷害部位は視床下部弓状核に限らず、嗅球、視索前野、視床下部腹内側核、海馬に及んだ。また、これらの部位は血液脳関門がなく、化学物質に直接曝されることも示した(18-20,28)。傷害部位は内分泌の中核であり、例えばエストロゲン受容体は、嗅球、扁桃核、内側視索前野、視床下部の腹内側核、弓状核などに強く分布する(47)。弓状核とそれにつながる中央隆起には、インスリン、プロラクチン、アンギオテンシン II、カルシトニンなどの受容体がある(54)。

II. 3. 神経興奮の影響

Olney らは、成獣の雄ラット弓状核に神経細胞死を引き起こさない量の MSG (1 g/kg) の注射によって、血中黄体形成ホルモン(LH)とテスト

ステロンが上昇することをみつけた(33)。弓状核神経細胞は、ゴナドトロピン放出ホルモン(LH/FSH-RH)を合成しているので、MSGによる興奮刺激でLH/FSH-RHを放出し、下垂体から黄体形成ホルモン(LH)を放出させたと考えられる。それによって、精巣からのテストステロン分泌が上昇したと思われる。

また去勢した若いアカゲザルに、150 mg/kgのグルタミン酸あるいはアスパラギン酸を静注したところ、血中黄体形成ホルモン(LH)が有意に上昇した。卵胞刺激ホルモン(FSH)は、上昇したが、統計的に有意でなかった(26)。その他にも、グルタミン酸、またはアゴニストを用いた実験で、ラットやサルに、黄体形成ホルモン、卵胞刺激ホルモン、成長ホルモン、プロラクチンの分泌を促進させたり、早期性成熟を起こした報告がある(34,38)。また逆に、グルタミン酸のアンタゴニストを用いれば、性成熟を遅らせることもできる(53)。環境化学物質のなかに、グルタミン酸アンタゴニストの作用をもつものがあるかもしれない。

すなわち、過剰量の興奮毒は視床下部の神経細胞をアポトーシスに陥らせることによって、中大量の興奮毒は神経細胞を興奮させ視床下部-下垂体系を刺激することによって、いずれも内分泌系を攪乱する。また逆に、グルタミン酸のアンタゴニストは神経細胞の興奮を阻害することで内分泌系を攪乱する。

II. 4. 実際に曝露される可能性

動物に黄体形成ホルモンの分泌を有意に上昇させるMSGの量は、弓状核に神経細胞死を起す量の1/3～1/4である。体重50 kgの人に外挿すれば、1回5 g以上のMSGを度々食すると内分泌が攪乱される恐れがある。とくに子供は感受性が高く、体重も少ないので、注意を要する。米国のスーパーマーケットで売っているスープ180 mlには、最大1.3 gのフリーのグルタミン酸が含まれており、清涼飲料水にはアスパルテームが入っている(34)。人工甘味料のアスパル

テームは、アスパラギン酸とフェニルアラニンのジペプチドであり、腸で加水分解されて2つのアミノ酸になる。アスパルテームの重量の40%がアスパラギン酸になるから、MSGの例から計算すると、アスパルテームを10 g以上食すると興奮毒性を示すかもしれない。とくに、清涼飲料水にアスパルテームが入っているような場合には、他の食物の干渉なしに吸収され、アスパラギン酸の血中濃度が上昇することになる。わが国で販売されている清涼飲料水では、低カロリーを特徴とするものにアスパルテームの表示があった。しかし、アスパルテームの甘さは砂糖の160倍強いので、多量に使用することはないと思われる。

その他に、同様な興奮性をもつアミノ酸として、システインがある。強さはグルタミン酸と等しいという(32)。これら興奮性アミノ酸が、飲食物にフリーの形で含まれた場合には、相加的な効果を現すので、食品に過剰な化学調味料や蛋白加水分解物を添加することを避けるべきと、Olneyは警告している(34)。米国では、女兒の第二性徴の出現が過去に比べて1年以上早くなっているというが(52)、これと関係があるかどうか不明である。

II. 5. ドモイン酸

化学調味料や人工甘味料を含む食物を摂取することによって、視床下部に細胞死が起ったり内分泌が攪乱されるほど、興奮性アミノ酸の血中濃度が上がることはないと思われる。しかし1987年に、グルタミン酸の数百倍も強いアゴニストが出現した。この年、カナダで起こったムラサキイガイの食中毒事件では、少なくとも107人が罹患し、症状は嘔吐、腹痛、下痢、頭痛、記憶障害等であったが、4人の死者が出た(37)。原因物質は、ある種の珪藻がつくるドモイン酸(domonic acid)であった。剖検では、海馬、扁桃核などの神経細胞死とグリオシスがみられ、実験動物にグルタミン酸アゴニストのカイニン酸を投与したモデルと酷似していた(50)。生存者

の PET 診断で、海馬と扁桃核のグルコース代謝の半減した例もあり、興奮毒性による障害は明らかであろう。マウスの成獣に 7 mg/kg のドモイン酸を注射すると、海馬、視索前野、視床下部弓状核、腹内側核などに広範な神経細胞死がみられる(4)。

この事件では 20 歳未満の患者は報告されていない(37)、内分泌障害があったかどうかも分からない。現在でも米国西海岸のマテ貝とイチョウ蟹にドモイン酸が見つかるので、許容基準を検討したところ、イチョウ蟹の内臓中に 30 mg/kg、マテ貝では 20 mg/kg を許容基準とすることにしたという(25)。このように、想像を超える強さの興奮性神経毒が他にもあるかも知れない。

II. 6. 有機錫

有機錫化合物のうち、トリアルキル錫には神経毒性を示すものがある。哺乳類に毒性の強いものはトリメチル錫とトリエチル錫で、動物実験では、新生児の感受性が高いことが知られる。トリメチル錫の職業性中毒は記憶障害を伴い、ラットに投与した場合は、海馬、扁桃核、梨状葉に神経細胞死が起こる。これら傷害は、グルタミン酸アゴニストのカイニン酸によるラットの傷害と類似している(10)。トリエチル錫も、海馬歯状回や梨状葉に神経細胞死を起こす(55)。新生児期のラットに投与すると、成長しても迷路学習の障害、交尾行動の障害などがみられる(39)。胎生期にトリブチル錫に曝露されたラットは、迷路学習に遅滞がみられる(11)。その他、トリフェニル錫は興奮性神経毒性をもつという報告がある(35)。

II. 7. メチル水銀

メチル水銀の興奮性神経毒性については、グ

ルタミン酸のアゴニスト *N*-methyl-D-aspartate

(NMDA) による誘発電位には影響がないという報告がある(49)いっぽう、MK-801 など NMDA 型グルタミン酸受容体アンタゴニストを神経細胞培養系に加えると、メチル水銀による細胞障害が抑えられるという肯定的な結果もある(36)。メチル水銀の毒性は多様であり、マイクロチューブル/分裂装置合成を阻害して細胞分裂を抑える作用もあるが、脳の病巣では反応性アストロサイトが増殖する。神経細胞のみをターゲットとした毒性を考えると、興奮毒性の可能性もある。

おわりに

以上述べたように、視床下部の腹側の第三脳室周辺は、血液脳関門が欠如する。この部分には、視索前野、視床下部腹内側核、弓状核、中央隆起など、下垂体前葉を支配する領域が含まれる。視索前野は、下垂体後葉への神経分泌系でもある。視索前野内側核と室傍核は性的二形性を示す。もし血中に、強力なホルモン作用物質あるいは興奮性神経毒があれば、直接中枢が攪乱されることで、内分泌が攪乱される可能性がある。これまで外因性化学物質の内分泌攪乱に関する研究は、受容体結合を中心に行われてきたが、上記のように、内分泌の高位中枢への影響についての広範な研究が望まれる。

とくに発生・発達中の胎児・新生児の視床下部は神経細胞が脆弱であり、血液脳関門を欠く領域は成人より広い。胎児の視床下部が、神経毒に曝露されたり、性分化に必要な細胞環境の攪乱にあった場合には、成人より重篤な障害が生じ、不可逆的な内分泌障害となる恐れがある。発達中の脳の障害という観点から、外因性化学物質の内分泌攪乱作用を検討する必要がある。

付表 ヒト，マウス，ラットの受精後週齢・日齢と脳の発生

ヒト	マウス	ラット	器官・組織発生
3週	8日	9日	神経板から神経管形成、 一次脳胞（前脳胞・中脳胞・菱脳胞）形成 （体節形成）
4週	9日	10日	神経管の閉鎖終了 （眼胞・心臓・肢芽形成）
5週	10日	11日	二次脳胞（終脳・間脳・中脳・後脳・髄脳） 脳室帯細胞の増生、 間脳・中脳で神経細胞の分化開始
6週～7週	11日～12日	12日～14日	大脳外套の脳室帯細胞増生 大脳の神経細胞分化開始 大脳皮質原基への細胞遊走開始
8週～15週	13日～16日	15日～18日	大脳皮質原基形成 大脳皮質原基への遊走
16週～20週	17日～出生 (19日)	19日～出生 (21日)	大脳皮質神経細胞の産生完了 大脳皮質原基へ最後の遊走
20週～24週	出生～生後2週		大脳皮質の層構築、皮質神経細胞の分化 海馬歯状回・小脳皮質形成、髄鞘形成開始 主要な脳回出現（ヒト）
25週～出生 (39週)	生後2週～4週		二次的脳回出現（ヒト） 髄鞘形成

引用文献

1. Afonso, L.O., Campbell, P.M., Iwama, G.K., Devlin, R.H. and Donaldson, E.M. (1997) The effect of the aromatase inhibitor fadrozole and two polynuclear aromatic hydrocarbons on sex steroid secretion by ovarian follicles of coho salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.* 106:169-174.
2. Arendash, G.W. and Gorski, R.A. (1983) Effects of discrete lesions of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area or other medial preoptic regions on sexual behavior of male rats. *Brain Res. Bull.* 10:147-154.
3. Bleier, R., Byne, W. and Siggelkow, I. (1982) Cytoarchitectonic sexual dimorphisms of the medial preoptic and anterior hypothalamic areas in guinea pig, rat, hamster, and mouse. *J. Comp. Neurol.* 212:118-130.
4. Bruni, J.E., Bose, R., Pinsky, C. and Glavin, G. (1991) Circumventricular organ origin of domoic acid-induced neuropathology and toxicology. *Brain Res. Bull.* 26:419-424.
5. Chernoff, N., Setzer, R.W., Miller, D.B., Rosen, M.B. and Rogers, J.M. (1990) Effects of chemically induced maternal toxicity on prenatal development in the rat. *Teratology* 42:651-658.
6. Davis, E.C., Popper, P. and Gorski, R.A. (1996) The role of apoptosis in sexual differentiation of the rat sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. *Brain Res.* 734: 10-18.
7. De Courten-Myers, G.M. (1999) The human cerebral cortex: Gender difference in structure and function. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 58:217-226.
8. De Vries, G.J., De Bruin, J.P.C., Uylings, H.B.M. and Comer, M.A. eds. (1984) Sex Differences in the Brain. *Prog. Brain Res.* 61, Elsevier.
9. Dorizzi, M., Richard-Mercier, N. and Pieau, C. (1996) The ovary retains male potential after the thermosensitive period for sex determination in the turtle *Emys orbicularis*. *Differentiation* 60:193-201.
10. Dyer, R.S., Walsh, T.J., Wonderlin, W.F. and Bercegeay, M. (1982) The trimethyltin syndrome in rats. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 4:127-133.
11. Garlund, A.T., Archer, T., Danielsson, K., Danielsson, B., Fredriksson, A., Lindqvist, N.G., Lindstrom, H. and Luthman, J. (1991) Effects of prenatal exposure to tributyltin and triethyltin on behaviour in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 13:99-105.
12. Gorski, R.A., Gordon, J.H., Shryne, J.E. and Southam, A.M. (1978) Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. *Brain Res.* 148:333-346.
13. Gorski, R.A. (1986) Sexual differentiation of the brain: A model for drug-induced alterations of the reproductive system. *Environ. Health Persp.* 70:163-175.
14. 原田信広 (1992) P-450・アロマターゼ (エストロゲン合成酵素) の構造と機能. *蛋白質核酸酵素* 37:3051-3059.
15. 原園 景、江馬 眞、川島邦夫 (1998) ラットにおける着床前期間に投与したトリブチルスズの着床阻害作用—脱落膜反応に与える影響. 第25回日本トキシコロジー学会学術年会 (名古屋)
16. Honda, S., Harada, N., Ito, S., Takagi, Y. and Maeda, S. (1998) Disruption of sexual behavior in male aromatase-deficient mice lacking exons 1 and 2 of the *cyp19* gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252:445-449.
17. Ifft, J.D. (1972) An autoradiographic study of the time of final division of neurons in rat hypothalamic nuclei. *J. Comp. Neurol.* 144:139-204.
18. Inouye, M. and Murakami, U. (1973) Brain lesions in mouse infants and fetuses induced by monosodium L-aspartate. *Cong. Anom.* 13:235-244.
19. Inouye, M. and Murakami, U. (1974) Brain lesions and obesity in mouse offspring caused by maternal administration of monosodium glutamate during pregnancy. *Cong. Anom.* 14:77-83.
20. Inouye, M. (1976) Selective distribution of radioactivity in the neonatal mouse brain following subcutaneous administration of ^{14}C -labeled monosodium glutamate. *Cong. Anom.* 16:79-84.

21. Ito, S., Murakami, S., Yamanouchi, K. and Arai, Y. (1986) Prenatal androgen exposure, preoptic area and reproductive functions in the female rat. *Brain Dev.* 8: 463-468.
22. Kajiwara, Y. and Inouye, M. (1992) Inhibition of implantation caused by methylmercury and mercuric chloride in mouse embryos in vivo. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 49:541-546.
23. Laskey, J.W. and Phelps, P.V. (1991) Effect of cadmium and other metal cations on in vitro Leydig cell testosterone production. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108: 296-306.
24. MacLusky, N.J. and Naftolin, F. (1981) Sexual differentiation of the central nervous system. *Science* 211: 1294-1303.
25. Marien, K. (1996) Establishing tolerable dungeness crab (*Cancer magister*) and razor clam (*Siliqua patula*) domoic acid contamination. *Environ. Health Perspect.* 104: 1230-1236.
26. Medhamurthy, R., Dichek, H.L., Plant, T.M., Bernardini, I. and Culter, G.B. (1990) Stimulation of gonadotropin secretion in prepubertal monkeys after hypothalamic excitation with aspartate and glutamate. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71:1390-1392.
27. Murakami, S. and Arai, Y. (1989) Neuronal death in the developing sexually dimorphic periventricular nucleus of the preoptic area in the female rat: effect of neonatal androgen treatment. *Neurosci. Lett.* 102:185-190.
28. Murakami, U. and Inouye, M. (1971) Brain lesions in the mouse fetuses caused by maternal administration of monosodium glutamate. *Cong. Anom.* 11:171-177.
29. Nishizuka, M., Sumida, H., Kano, Y. and Arai, Y. (1993) Formation of neurons in the sexually dimorphic anteroventral periventricular nucleus of the preoptic area of the rat: Effects of prenatal treatment with testosterone propionate. *J. Neuroendocrinol.* 5:569-573.
30. 沖中重雄、小林 隆、時実利彦(編) (1966) 視床下部—基礎と臨床。文光堂。
31. Olney, J.W. (1969) Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164:719-721.
32. Olney, J.W. and Ho, O. (1970) Brain damage in infant mice following oral intake of glutamate, aspartate or cysteine. *Nature* 227:609-611.
33. Olney, J.W., Cicero, T.J., Meyer, E.R. and De Gubareffe, T. (1976) Acute glutamate-induced elevations in serum testosterone and luteinizing hormone. *Brain Res.* 112:420-424.
34. Olney, J.W. (1994) Excitotoxins in foods. *Neurotoxicol.* 15: 535-544.
35. Oyama, Y. and Akaike, M. (1990) Triphenyltin: a potent excitatory neurotoxicant. Its reciprocal effects on voltage-dependent Na and K currents of mammalian brain neuron. *Neurosci. Lett.* 119:261-264.
36. Park, S.T., Lim, K.T., Chung, Y.T. and Kim, S.U. (1996) Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonists. *Neurotoxicol.* 17:37-46.
37. Perl, T.M., Bedard, L., Kosatsky, T., Hockin, J.C. Todd, E.C. and Remis, R.S. (1990) An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid. *N. E. J. Med.* 322:1775-1780.
38. Plant, T.M., Gray, V.L., Marshall, G.R. and Arslan, M. (1989) Puberty in monkeys is triggered by chemical stimulation of the hypothalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2506.
39. Ruppert, P.H., Dean, K.F. and Reiter, L.W. (1984) Neurobehavioral toxicity of triethyltin in rats as a function of age at postnatal exposure. *Neurotoxicol.* 5:9-22.
40. Scallet, A.C. and Olney, J.W. (1986) Components of hypothalamic obesity: bipiperidyl-mustard lesions and hyperphagia in monosodium glutamate-induced hyperinsulinemia. *Brain Res.* 374:380-384.
41. シャルダイン, J.L., 谷村 孝(訳) (1979) 薬の催奇形性とその評価。講談社。
42. Schaumburg, H.H. and Byck, R. (1968) Sin cib-syn: Accent on glutamate. *N. E. J. Med.* 279:105.
43. Schaumburg, H.H., Byck, R., Gerstl, R. and Machman, J.H. (1969) Monosodium L-glutamate: Its pharmacology and role in the Chinese Restaurant Syndrome. *Science*

- 163: 826-828.
44. Shepard, T.H. (1992) Catalog of Teratogenic Agents (7th ed.) Johns Hopkins Univ. Press
 45. Shimada, M. and Nakamura, T. (1973) Time of neuron origin in mouse hypothalamic nuclei. *Exp. Neurol.* 41:163-173.
 46. Shinoda, K., Nagano, M. and Osawa, Y. (1994) Neuronal aromatase expression in preoptic, strial, and amygdaloid regions during late prenatal and early postnatal development in the rat. *J. Comp. Neurol.* 343: 113-129.
 47. Shughrue, P.J., Lane, M.V. and Merchenthaler, I. (1997) Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat central nervous system. *J.Comp. Neurol.* 388:507-525.
 48. Swaab, D.F. and Fliers, E. (1985) A sexually dimorphic nucleus in the human brain. *Science* 228:1112-1115.
 49. Szucs, A., Angiello, C., Salanki, J. and Carpenter D.O. (1997) Effects of inorganic mercury and methylmercury on the ionic currents of cultured rat hippocampal neurons. *Cell. Mol. Neurobiol.* 17:273-88.
 50. Teitelbaum, J.S., Zatorre, R.J., Garpenter, S., Gendron, D., Evans, A.C., Gjedde, A. and Cashman, N.R. (1990) Neurologic sequelae of domoic acid intoxication due to the ingestion of contaminated mussels. *N. E. J. Med.* 322:1781-1787.
 51. Terasawa, E., Wiegand, S.J. and Bridson, W.E. (1980) A role for medial preoptic nucleus on afternoon of proestrus in female rats. *Am. J. Physiol.* 238:E533-E539.
 52. 特集(1999)新興環境汚染病—臨床家も考えよう. 日医雑誌 121:635-709.
 53. Urbanski, H.F. and Ojeda, S.R. (1990) A role for *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in the control of LH secretion and initiation of female puberty. *Endocrinology* 126:1774-1776.
 54. Van Houten, M. and Posner, B.I. (1981) Cellular basis of direct insulin action in the central nervous system. *Diabetologia* 20:255-267.
 55. Veronesi, B. and Bondy, S. (1986) Triethyltin-induced neuronal damage in neonatally exposed rats. *Neurotoxicol.* 7:69-79.

4. 産業化学物質の生殖毒性に関する文献的研究

名古屋大学大学院医学研究科環境労働衛生学教室
竹内康浩

1. 目的

生殖は生物種の維持にとってもっとも基本的な機能で、化学物質の生殖毒性は子孫に対して悪影響を及ぼす可能性があり、人類の生存にとって極めて重要な問題である。そのために、最近では化学物質の生殖毒性が世界的に重視されるようになってきた。この様な状況の中で、最近、韓国でフロン代替溶剤として2-ブロモプロパンが使用され、男女の労働者に特異的な生殖障害を生じた中毒事例が報告され、産業化学物質の生殖毒性について大きな関心を引き起こした。ところが、よく使われている数万種の産業化学物質の中で生殖毒性が注目されているものは少ない。最近、Ellenhorn¹⁾は多くの生殖毒性情報のある職業因子をまとめているが、男性（雄性）の生殖毒性の評価は主として精巣障害が指標となっており、比較的検出が簡単であるが、女性（雌性）の場合は卵巣機能ばかりでなく、着床、妊娠維持、胎児の発達、子供の発達など生殖毒性の評価は複雑で、曝露と生殖障害との因果関係を明確に示す資料は少ない。また、最近ではダイオキシン、PCBなどの環境化学物質の性ホルモン様作用による生殖障害が関心を集めているが、生殖機能は複雑で、内分泌の攪乱作用、生殖器官への直接作用、中枢神経系を介した間接作用など、多様な作用経路があり、さらにこれらの複合的な作用も考えられ、化学物質による生殖機能障害は多様である。従って、多くの化学物質が多かれ少なかれ生殖毒性を有する可能性があり、生殖毒性の解明も広い視点からの研究が必要である。

2. 方法

ここでは化学物質の生殖毒性に関する国際的な取り組み、韓国での2-ブロモプロパン中毒による生殖障害事例、2-ブロモプロパンの生殖毒性に関する動物実験結果、その他の産業化学物質による生殖障害に関する研究を文献的に検討し、将来の研究課題等に言及する。

3. 結果

1) 生殖毒性に対する国際的取り組み

ヨーロッパ連合(EU)と北欧(Nordic council)では、最近相次いで職場環境での生殖及び次世

代への影響(Reproductive health hazards at work)を考慮した法制度の整備を行っている。例えば、ヨーロッパ連合(EU)の場合²⁾、化学物質等のMSDS(製品安全データシート)を用意する際の必要事項が催奇形性(teratogenicity)から生殖毒性(toxic to reproduction)に変わり、不妊(fertility)や発達毒性(developmental toxicity)が含まれるようになった。表1にその分類例を示す(表1)。また、危険性評価が人への疫学的な量・反応関係を考慮したものになった。北欧5カ国(Nordic Council)の場合も^{3,4)}、この点ではEUと同様であり、さらに生殖毒性の分類も発がん物質のIARCの分類に準じた生殖毒性物質の分類を提唱している。即ち、分類1A: 人の生殖への影響を有することを示す十分なデータがあるもの、分類1B: 人の生殖への影響を有することを示すデータはあるが限定的でありかつ1種の動物のデータがあるもの、または人の症例報告があり、代謝が人と同じ動物のデータがあるもの、または代謝が人と同じ2種以上の動物のデータがあるもの、分類2: 人の生殖への影響の可能性があり、かつ 1) 1種の動物で2つ以上の系のデータがあり、1種の動物で支持する証拠があるか、2) 不十分であるが人の研究があるもの、分類3: 生殖への影響が疑われるが上記のように分類できないものとしている。この基準に基づいた分類例では生殖毒性を有することがよく知られている殺虫剤のDBCP(1,2-ジブromo-3-クロロプロパン)は1Aに分類されている。有機溶剤では1Aはないが、1B: 2-エトキシエタノール、2-メトキシエタノール、ヘキサン、2: テトラクロロエチレン、3: 塩化メチレン、スチレン、トルエン、1,1,1-トリクロロエタン、トリクロロエチレン、キシレン、があげられている。

2) 最近発生したオゾン層破壊物質代替品と使用された2-ブromopropanによる生殖障害例

2-1) 労働者の中毒事例

フロン等がオゾン層を破壊する恐れがあるという論文が1974年に発表されて以来、国際的に調査研究が行われてきた。その結果、1985年に「オゾン層保護のためのウィーン条約」⁵⁾が、1987年には「オゾン層を破壊する物質に関するモントリオール議定書」⁶⁾が採択され、国際的な規制措置が定められた。モントリオール議定書にもとづいて我が国でも1995年末までにクロロフルオロカーボン(CFC)と1,1,1-トリクロロエタンの生産が全廃された。このため、様々なフロン代替品が産業現場に導入されているが、これらの毒性は必ずしも十分に明らかになっていない。韓国のL社の電子部品工場で日本から輸出された2-ブromopropanがフロン113の代替溶剤として1994年2月から使用された。1995年7月には5名の労働者で月経が停止していることが偶然発見され注目されるようになった。調査の結果、1994年夏以降、月経の停止、頭痛、めまい、風邪様症状の持続、腰痛、神経痛、末梢神経の麻痺、全身の紫斑などの症状が発生していた。職場の疫学的な調査結果はKimら⁷⁾及びParkら⁸⁾より発表された。2-ブromopropanが原因物質として疑われたが、この物質の生殖毒性についてはMSDS(製品安全データシート)

にも記載がなく、文献的にも生殖毒性の報告がなかった。我々は韓国と協力して 2-プロモプロパンの生殖毒性を検討するための動物実験を行ってきた。韓国の電子部品会社のタクトスイッチ部品組立工程で 2-プロモプロパンを使用していた女性労働者 16 名に卵巣機能低下症、男性労働者 6 名に精子形成機能低下症、生殖機能及び造血器障害が共に認められたもの 7 名が発生した。女性では貧血、白血球数減少、血小板数減少などの造血器障害および月経の中断、卵胞刺激ホルモン (FSH) の著しい増加、黄体化ホルモン (LH) の増加認められている。男性では造血器障害、精子数の減少 (6 名中 2 名は無精子症)、活動精子率の減少が認められ、精子形成能の著しい障害を示している。患者の発生したタクトスイッチ部品組立室の 2-プロモプロパンの濃度は局所排気装置を稼働させた場合には 9~19 ppm であったが、労働者が暴露される可能性のある浸漬槽の浸漬液上 1 m の濃度は 2-プロモプロパン 4,140 ppm が検出されている。2-プロモプロパンは沸点が低く、揮発しやすいために、適切に環境対策が行われないで使用された場合には作業環境濃度は高濃度に達したことが予測された。Koh ら⁹⁾は 2 年後の追跡調査で、月経が停止した女性 16 名中、月経の回復したのは 1 名のみで、他の 1 名は無月経のまま妊娠し健康な子供を出産したと報告している。また、6 名について腹腔鏡検査を実施し、そのうち 4 名については卵巣の生検を行った。生検所見は 4 例とも類似していた。卵巣皮質には巣状又はびまん性の線維化が認められた。各種発達段階の卵胞は認められず、始原卵胞は不規則な萎縮を示し、その中には卵細胞と顆粒細胞は認められなかった。

2-2) 動物実験による生殖毒性とその機序の証明

我々は雌雄のラットを用いて、2-プロモプロパンを濃度段階別に吸入暴露して、毒性の検討を行った。その結果の要約を以下に示す。

2-2-1) 雄に対する毒性実験¹⁰⁻¹²⁾

雄ラットに 2-プロモプロパン 3,000 ppm, 1,000 ppm, 300 ppm, 8 時間/日、9 週間曝露実験を行った。3,000 ppm 群は 9~10 日曝露で瀕死状態になったので曝露を中止し、9 週後に他の群と同時に剖検して観察した。体重は 3,000 ppm 群では曝露中に著しく減少したが、曝露中止後には回復し、9 週後には 300 ppm 群とほぼ同じになった。1,000 ppm 群は曝露中はほとんど体重が増加しなかった。300 ppm 群は曝露中も体重は増加したが、対照群より増加率は有意に小さかった。実験結果の要約を表 7 に示した (表 7)。体重当たり精巣重量、精子数、活動精子率は量依存的に著しく減少し、3,000 ppm 群でも回復は認められなかった。活動精子率は 1,000 ppm 以上の曝露群では動いている精子は全く認められなかった。肝、腎、脾等の重量では有意な変化は認められなかった。末梢血液の所見では、赤血球数、白血球数、血小板数は量依存的に有意に減少したが、曝露を中止した 3,000 ppm 群では回復が見られた。これらの結果は 2-プロモプロパンが精巣に対して特異的なつよい毒性を有すること、造血機能も障害することを示した。

2-2-2) 雌に対する毒性実験¹³⁻¹⁵⁾

雌ラットに 2-プロモプロパン 1,000 ppm, 300 ppm, 100 ppm, 8 時間/日、9 週間曝露実験を行った。曝露による性周期の変化は表 8 に示した (表 8)。1,000 ppm 群では 2 週目頃から

性周期が乱れはじめ、4匹では連続発情状態となり、残りの5匹では発情休止期が著しく延長した。300 ppm 群では7週目頃から発情休止期が延長した。卵巣の組織所見では 1,000 ppm 群及び 300 ppm 群で濃度依存的に正常卵胞数の減少、閉鎖卵胞及び嚢胞状卵胞の著しい増加、黄体数の減少がみられた。卵巣以外の臓器には特別な変化は認められなかった。上記の実験動物の卵巣の連続切片を用いて卵胞の検索を行い、100 ppm 以上の曝露群で各発達段階の卵胞数がいずれも減少していることを明らかにした。また、3,000 ppm、8時間/日、1回曝露後の経時的変化を観察し、始原卵胞が最も早く減少し、始原卵胞の卵細胞のアポトーシスが増加していることを示した。以上の所見から、2-プロモプロパンが始原卵胞の卵細胞に対して特異的な毒性を有することが認められた。

3) その他の産業化学物質による生殖障害例

有機溶剤取り扱い労働者に性欲減退、生理不順などの訴えがしばしば見られ、生殖機能への影響が注目されてきた。その作用機序については比較的高濃度の有機溶剤曝露による自律神経系や内分泌系への作用を介しての間接的で非特異的な影響が考えられてきた^{16,17)}。しかし、セロソルブなど幾つかの有機溶剤が特異的な生殖毒性を有することが明らかにされ、生殖器への直接的な作用が注目されるようになった。ここでは生殖毒性が知られたセロソルブ類、ヘキサン、塩化メチレン、その他の最近の報告

例を紹介する。

3-1) セロソルブ類

北欧の分類で1Bとされている2-メトキシエタノール、2-エトキシエタノールはそれぞれメチルセロソルブ、セロソルブの名称で知られ、シンナーの成分やどぶ漬け塗装の溶剤等として広く使われている。沸点がそれぞれ124.5℃、135℃と比較的高いために、室温で使用される場合には蒸発しにくく、労働者が高い濃度の曝露をうける機会は少なく、その毒性はあまり注目されされてこなかった。しかし、今宮ら¹⁸⁾はメチルセロソルブアセテートを雄マウスに、皮下注射(100, 500 mg/kgを背部皮下に週6日、16回投与)、経口投与(0.25%, 2.5%の水溶液を飲水として18日間投与)、吸入曝露(30Lのチャンバー内で200 ppm、1日4時間、週6日、17日間曝露)を行い、皮下投与では総投与量100mg/kg以上で、経口投与では200 mg/kg以上で著明な精巣の萎縮を認めたが、200 ppmの吸入曝露では明らかな精巣の萎縮は認めていない。長野ら^{19,20)}は雄マウスに、セロソルブ類を、週5回、5週間、強制経口投与した実験で、メチルセロソルブでは250 mg/kg以上で、セロソルブでは1,000 mg/kg以上で精巣の重量が著明に減少することを示した。精巣毒性の強さはメチルセロソルブ≧メチルセロソルブアセテート>セロソルブ≧セロソルブアセテートであった。Raoら²¹⁾は雌雄ラットにメチルセロソルブ 30, 100, 300 ppmを6時間/日、5日/週、13週間吸入曝露し、曝露していない雌雄ラットと交尾させた実験で、

雄300 ppm曝露群は完全な不妊症となったが、雄30, 100 ppm曝露群では妊娠に影響は見られず、雌ではいずれの曝露濃度群でも影響は見られなかったと報告している。Welchら²²⁾は造船所の塗装労働者で、セロソルブ(2-エトキシエタノール)とメチルセロソルブ(2-メトキシエタノール)に曝露されている73名と非曝露対照者40名を調査した。対象労働者はセロソルブ0~21.9ppm(平均 2.7 ppm)、メチルセロソルブ0~5.7 ppm(平均 0.8 ppm)の曝露を受けていた。塗装労働者では精子数の減少及び無精子症の増加、1回射精当たりの精子数の減少を認めている。Jenniferら²³⁾はセロソルブに曝露されていた造船所の労働者の調査を行った。呼吸域でのセロソルブの濃度は0~24 ppm(幾何平均値 6.6 ppm)であった。曝露労働者の37名(参加者の50%)と非曝露者39名(参加者の26%)から精液試料が得られた。一回の射精当たりの精子数はそれぞれ113 x 106/mlと154 x 106/mlで、曝露労働者の方が有意に少なかったと報告している。Veulemansら²⁴⁾は不妊者1,019名と対照475名の症例対照研究を行った。エチレングリコールエーテル類の曝露をそれらの尿中代謝物メトキシ酢酸とエトキシ酢酸で調べた。エトキシ酢酸は39名の症例と6名の対照で認められ、オッズ比 3.11 (p=0.004)で有意差が認められた。メトキシ酢酸は1名の症例と2名の対照に認められたのみであった。これらのデータから米国のACGIH及び日本の産業衛生学会は表2のように1984年にセロソルブ類の許容濃度を一斉に引き下げた(表2)。

3-2)ヘキサン

ヘキサンは末梢神経障害の原因物質としてよく知られているが、精巣毒性も動物実験で認められている。ヘキサンの生体内代謝物である2,5-ヘキサジオンの生殖毒性を示す動物実験は多いが、ヘキサン曝露による生殖障害の報告は少ない。Nylenら²⁵⁾は雄SD系ラットにヘキサン1,000 ppmを、21時間/日、7日/週、61日間曝露し、精巣の著しい萎縮を認め、曝露終了後14ヶ月後にも萎縮が回復しないことを報告している。Daughtrey²⁶⁾は雌雄のSD系ラットに市販のヘキサン900 ppm, 3,000 ppm, 9,000 ppm, 6時間/日、7日/週、交尾前に10週間曝露し、妊娠、授乳中も曝露を続けた。しかし、交尾、妊娠、仔数、仔生存率等の生殖毒性の指標には有意な影響が認められなかった。F1, F2の体重は9,000 ppm群で抑制されたが、他の2群では体重への影響は認められなかった。著者らはこれらの結果から、許容濃度レベル(米国ACGIH:50 ppm)の職業曝露では生殖毒性は生じないと推測している。ヘキサンの職業性曝露による生殖障害の報告は見あたらない。

3-3)塩化メチレン

Kelly²⁷⁾は塩化メチレン曝露と精子減少を伴う症例の報告を行っている。塩化メチレンに曝露されていた4名の男子労働者が前立腺と精巣の疼痛を訴えたので、標準的な方法で精子の解

析を行い、男性生殖障害の検討を行った。症例は1984年12月から1986年6月の間に診察した86名の労働者の内8名が陰部の疼痛を訴えていた。この8名は自動車部品の接着と洗浄に従事し、塩化メチレン入りのバケツに手を入れたり、合成樹脂製の部品に塩化メチレンをふりかける作業で、皮膚や衣類にも塩化メチレンが付着していた。平均68 ppm(3.3-154.4 ppm)の塩化メチレン曝露を受けていた。8例のデータのまとめを表3に示した(表3)。症例1は1984年12月に精巣と下腹部の疼痛を訴えて受診。抗生剤の投与を受けるが症状は回復しなかった。運動、排尿等では痛みは増強されなかった。時々立ち眩みと記憶障害及び人格変化も訴えていた。2人の子供を持っているが、1978年9月生れと1980年4月生れである。この作業で塩化メチレンに曝露されるようになってからは、1983年以来避妊はしていないが、子供は生まれていない。症例2は結婚しておらず、子供はない。症例3は1976年3月に1人子供をもうけたが、彼が塩化メチレンに曝露されるようになって6か月後に流産した。1980年以後は避妊していないが子供は生まれていない。症例4は1980年以来子供を持とうとしたが出来なかった。米国のNational Toxicology Program (NTP)²⁸⁾はラットとマウスを用いて、ラットに塩化メチレン0, 1,000, 2,000 or 4,000 ppm、マウスに0, 2,000 or 4,000 ppmを6時間/日、5日/週、102週間吸入曝露した。その結果、ラットでは精巣の萎縮が対照群 62% (31/50)、1,000 ppm群 63% (31/49)、2,000 ppm群 62% (31/50)、4,000 ppm群 76% (38/50)と高率に認められたが曝露群と対照群との間には有意差は認められなかった。マウスでは対照群 0% (0/50)、2,000 ppm群 8% (4/50)、4,000 ppm群 62% (31/50)で、4,000 ppm群に精巣萎縮の有意な増加が認められた。卵巣の萎縮はマウスでは対照群 12% (6/50)、2,000 ppm群 60% (28/47)、4,000 ppm群 74% (32/43)で、2,000 ppm以上の曝露群で有意な増加が認められた。Nitschkeら²⁹⁾はラットに塩化メチレン100, 500, 1,500 ppm, 6日/日、5日/週、14週間暴露した後、交尾させ、F1ラットを出産させた。さらに、F1ラットに17週暴露し、交尾させ、F2ラットを出産させた。生殖毒性の指標としては交尾、妊娠、仔数、仔生存率、仔体重増加等を調べたが、いずれの曝露群でも対照群に比して異常は認められなかった。

3-4) 1-ブロモプロパン

1-ブロモプロパン1,000 ppm, 8時間/日をラットの雄に曝露した実験では³⁰⁾、曝露4週後から運動神経伝導速度(MCV)の遅延、遠位潜時(DL)の延長が見られ、曝露5~7週後には後肢の麻痺、歩行障害が出現した。曝露5~7週後に屠殺して神経の病理組織学的検索では末梢神経の軸索と髄鞘の変化が認められた。1-ブロモプロパン800 ppm, 400 ppm, 200 ppm, 8時間/日、12週間をラットの雄に曝露した実験では³¹⁾、400 ppm以上の群で四肢の握力の低下、800 ppm群ではMCVの遅延とDLの延長が認められ、病理組織学的にも末梢神経の変性が認められた。曝露群の精巣重量は対照と比較していずれの群も有意差は認められなかったが、400 ppm以上の群で精

巢上体の重量減少、精子数の減少、活動精子率の減少、無尾精子出現率の増加が認められ、200 ppm以上の群で精嚢重量の減少が認められた。1-ブロモプロパン800 ppm, 400 ppm, 200 ppm, 8 時間/日、12 週間をラットの雌に曝露した実験では 800 ppm群で性周期の停止、400 ppm群で性周期の有意な周期の乱れが認められた。以上の所見から、1-ブロモプロパンは神経と雄生殖器に対して、比較的低濃度曝露でも毒性を有することが示された。生殖毒性については、1-ブロモプロパンは2-ブロモプロパンと作用機序が異なり、精子の成熟過程を障害する可能性がある。

3-4) その他の産業医化学物質の最近の生殖毒性に関する研究

3-4-1) 塩化アリル

塩化アリルは末梢神経毒性はよく知られているが、最近、塩化アリルが特異的に強い生殖毒性を有することが報告された。Zhaoら³²⁾は塩化アリル124 mg/kg (半数致死量の1/5) をマウスに皮下に1回投与した実験を行い、投与群では体重増加の抑制は認められなかったが、精巣重量の減少、精巣の精巣細胞数の減少、精巣上体の精子数の減少、形態異常精子の出現頻度の増加が認められた。投与4日後に精巣の精細胞数の減少、14日後には精巣上体における精子数の減少と無尾精子の出現頻度の増加が認められた。精巣上体における尾部異常精子の出現は精子数の減少より早期に出現した。これらの結果は、塩化アリルが投与直後に精巣を障害したこと、精巣上体における精子の成熟課程も障害したことを示した。投与39日後にも精巣障害は改善されず、重度の精巣障害を有する動物の割合は増加する傾向にあり、塩化アリルによる精巣障害は不可逆的であった。

シクロヘキサノール³³⁾は、3つの動物実験で低濃度曝露でも精巣と精子に影響が認められ、雄生殖器が標的臓器であるとされ、オランダでは安全係数100を掛けて、従来 200mg/m³ (50 ppm) であった許容濃度を、より適切な人間と動物のデータが出るまでの暫定値として1 mg/m³に引き下げられた値が提案されている。

Chapinら³⁴⁾は雄性ラットを用いて、塩化メチル3,500 ppm, 6 時間/日、5日間曝露し、3日間曝露せず、再び4日間曝露した実験を実施した。実験9日目には精子形成が遅延し、精巣上皮の空胞化と細胞の剥離が曝露後の経過とともに広がった。19日目に屠殺したすべての動物で精巣上体尾部に両側性の肉芽腫が認められた。曝露5日後には血中テストステロンは6 ng/ml (対照120±31ng/ml) 以下であった。塩化メチルは主として精巣の後期精細胞またはセルトリ細胞に作用し、精子形成を遅延させる可能性があるとしている。

岩室ら³⁵⁾は6-トリニトロトルエン (TNT) を雄性ラットに300 mg/kg、6 日/週、2週間投与し、投与終了2週間後に屠殺して検索した実験で、対照群に比して、精巣、精巣上体、精嚢重量がそれぞれ50%、70%及び65%まで有意に減少したと報告している。

石原ら³⁶⁾はラットを用いて、わが国で使用頻度の高いフタル酸エステル、ジエチルヘキシルフタレート (DEHP) 1%及び2%混合食餌を投与し、2週後、4週後、6週後に剖検した。2%混合食餌群では6週後に精巣重量/体重が有意に減少し、投与中止4週後も精巣重量が小さかった。1%

混合食餌群では6週後には精巣重量／体重は対照群と差は認められなかったが、投与中止4週後には精巣重量が対照群に比して小さくなった。組織学的には精巣の精祖細胞とセルトリ細胞は残存していたが、他の細胞はほとんどの段階で障害を受けていたと報告している。

4. 産業化学物質の生殖毒性分類の試み

日本産業衛生学会の許容濃度等の勧告(1998)³⁷⁾のⅢ.発がん物質の分類に準じて職業性生殖障害因子の分類を試み、表4～7に示した。現在はデータが限られており、不十分のものであるが、生殖毒性に関する新しい情報は次々と報告されており、今後の情報収集とデータの吟味により、充実したものにして行くことは生殖障害の予防に重要と考える(表4～7)。

5. 産業化学物質の生殖毒性の再検討の必要性

従来の職業曝露の許容濃度を設定する際に、生殖毒性に関する情報は非常に少なかったこともあり、生殖毒性情報は許容濃度設定にあたって活用されることは少なかった。Jankovicら³⁸⁾は生殖試験で1度でも陽性を示した5,000-6,00種の化学物質をリストアップした。これを米国環境保護庁のリスクアセスメントの手法を用いてスクリーニングし、213種の量・反応関係を評価して職業曝露生殖影響ガイドライン(ORG)の算出を試みている。その結果、ORGはその内の13%が許容濃度と等しいか高い値を示したが、87%は許容濃度がないか許容濃度より小さい値を示したと報告している。今後、このような産業化学物質の生殖毒性の再検討や重視が労働衛生にとって重要であるばかりでなく、環境化学物質の毒性評価にとっても重要な情報源になるものと考えられる。

6. まとめ

- 1) 化学物質の生殖毒性は人類の生存にとって極めて重要な問題であり、生殖毒性に関する考え方、試験法、評価基準、分類法、予防対策などの検討が国際的に進展している。
- 2) 人間の生殖機能に対する産業化学物質の毒性情報はきわめて少ない。生殖機能は複雑で、直接作用のほかに、中枢神経、自律神経、内分泌系を介する間接的な作用によっても影響され、その調査・研究の困難性によると考えられる。
- 3) 産業化学物質の生殖毒性は非特異的なもののみではなく、ジブロモクロプロパン(DBCP)、セロソルブ類、2-ブロモプロパンなど特異的な生殖毒性を有するものが少なからず存在することが解明されつつある。

4) 動物実験では雄に対する生殖毒性の報告は沢山あるが、雌に対するものは極めて少ない。雄に対する生殖毒性に関しても、精巣重量、精巣の組織所見の報告は多いが、精子数、活動精子率、奇形精子率等の報告は少ない。

5) 最近フロン代替溶剤として用いられた2-ブロモプロパンの労働者の中毒例及び動物実験で、月経停止、雌の性周期の障害、始原卵胞の卵細胞のアポトーシスなど、女性（雌）に対する特異的な毒性が明らかとなり、女性に対する生殖毒性を見直す必要性を示した。

6) 特に、女性や動物の雌に対する生殖毒性情報は少なく、今後の研究が期待される。雄に関するデータでは精巣重量や精巣の組織所見のみでなく、1-ブロモプロパンなどの実験結果が示すように、精子の成熟過程も障害されることが知られており、雄の生殖毒性を評価する際には精子数、活動精子率、精子の奇形率等に関する検索が必要と考える。

7. 文献

1. Ellenhorn MJ. Ellenhorn's Medical Toxicology Williams & Wilkins Baltimore, 1997:149-171,
2. Council Directive 92/85/EEC, (Official Journal EU, 1992, No.L348)
3. Nordic criteria for reproductive toxicity (Nordic Council of Ministers, Nord. 1992:16)
3. Taskinen HK. Nordic criteria for reproductive toxicity. J Occup Environ Med 1995;37:970-973
4. Vienna Convention for the Protection of the Ozone Layer(1985)
5. Montreal Protocol on Substances that Delete the Ozone Layer(1987)
7. Kim Y, Jung K, Hwang T, Jung G, Kim H, Park J, Kim J, Park J, Park D, Park S, Choi K, Moon Y. Hematopoietic and reproductive hazards of Korean electronic workers exposed to solvents containing 2-bromopropane. Scand J Work Environ Health 1996;22:387-91
8. Park J, Kim Y, Park D, Choi K, Park S, Moon Y An outbreak of hematopoietic and reproductive disorders due to solvents 2-bromopropane in an electronic factory, South Korea: Epidemiological survey. J Occup Health 1997;39:138-143
9. Koh JM, et al. Primary ovarian failure caused by a solvent containing 2-bromopropane. Eurp J Endocrinol 1998;138:554-556
10. 竹内康浩、市原 学、上島通浩、久永直見、朝枝伸幸. フロン代替溶剤として使用された2-ブロモプロパンによる生殖機能障害. 労働の科学 1996;51:669-673
11. Ichihara G, Asaeda N, Kumazawa T, Tagawa Y, Kamijima M, Yu X, Kondo H, Nakajima T, Kitoh J, Yu IJ, Moon YH, Hisanaga N, Takeuchi Y. Testicular toxicity of 2-bromopropane. J Occup Health 1996;38:205-206
12. Ichihara G, Asaeda N, Kumazawa T, Tagawa Y, Kamijima M, Yu X, Kondo H, Nakajima T, Kitoh J, Yu IJ, Moon YH, Hisanaga N, Takeuchi Y. Testicular and hematopoietic toxicity of 2-bromopropane, a substitute for ozone layer-depleting chlorofluorocarbons. J Occup Health 1997;39:57-63
13. Kamijima M, Ichihara G, Yu X, Xie Z, Kitoh J, Tsukamura H, Maeda K, Nakajima T, Asaeda N, Hisanaga N, Takeuchi Y. Disruption in ovarian cyclicity due to 2-bromopropane in the rat. J Occup Health 1997;39:3-4
14. Kamijima M, Ichihara G, Kitoh J, Tsukamura H, Maeda K, Yu X, Xie Z, Nakajima T, Asaeda N, Hisanaga N, Takeuchi Y. Ovarian toxicity of 2-bromopropane in the non-pregnant female

rat. J Occup Health 1997;39:144-149

15. Yu X, Kamijima M, Ichihara G et al. 2-Bromopropane causes ovarian dysfunction by damaging primordial follicles and their oocytes in female rats. Toxicol Appl Pharmacol 1999; in press

16. 竹内康浩、西崎恒男、高城 晋、馬淵千之. トルエンを主とした有機溶剤使用者に発生した間脳症候群の2症例. 産業医学1972;14:563-571

17. 竹内康浩、田中豊穂、松本忠雄、松下敏夫. トルエン曝露時の間脳-下垂体-副腎皮質系の反応に関する実験的研究. 産業医学1972;14:543-553

18. 今宮俊一郎、中山栄基、長野嘉介、小谷野道子、大林久雄、安達秀美. エチレングリコールメチルエーテルアセートの毒性に関する研究—とくに精巣の変化について—. 第49回日本産業衛生学会講演集 1976:98-99

19. 長野嘉介、中山栄基、小谷野道子、大林久雄、安達秀美、山田 勉. エチレングリコール誘導体（セロソルブ類）のマウスの精巣に対する作用. 第50回日本産業衛生学会講演集 1977:216-217(産業医学1979;21:29)

20. 長野嘉介、中山栄基、小谷野道子、大林久雄、安達秀美、山田 勉. エチレングリコールモノアルキルエーテル類によるマウス精巣の萎縮. 産業医学1979;21:29-35

21. Rao KS, Cobel-Geard SR, Young JT et al. Ethylene glycol monomethylether: II. Reproductive and dominant lethal study with rats and rabbits. Fund Appl Toxicol 1983;3:49-54

22. Welch LS, Schrader SM, Turner TW, Cullen MR. Effects of exposure to ethylene glycol ethers of shipyard painters:II. Male reproduction. Am J Ind Med 1988;14:509-526

23. Jennifer MR, Schrader SM, Clapp DE, Halperin WE, Turner TW, Hornung RW. Semen quality in worker exposed to 2-エトキシエタノール. Brit J Ind Med 1989;46:399-406

24. Veulemans H, Masschelein R, Groeseneken D. Exposure to ethylene glycol ethers and spermatogenic disorders in man: a case-control study. Brit J Ind Med 1993;50:71-78

25. Nylen P, Ebendal T, Eriksdotter-Nilsson M, Hansson T, Henschen A, Johnson AC, Kronevi T, Kvist U, Sjostrand NO, Hoglund G, Olson L. Testicular atrophy and loss of nerve growth factor-immunoreactive germ cell line in rats exposed to n-hexane and a protective effect of simultaneous exposure to toluene or xylene. Arch Toxicol 1986;63:296-307

26. Daughtrey WC, Neeper-Bradley T, Duffy J, Haddock L, Keenan T, Kirwin C, Soiefer A.

- Two-generation reproduction study on commercial hexane solvent. *J Appl Toxicol* 1994;14:387-393
27. Kelley M. Case reports of individuals with oligospermia and methylene chloride exposure. *Reproductive Toxicology* 1988;2:13-17
28. National Toxicology Program(NTP). Toxicology and carcinogenesis studies of dichloroethane(methylene chloride) (cas no.75-09-2) in F344/rats and B6C3F1 mice(inhalation studies). US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institute of Health, 1986
29. Nitschke KD, Eisenbrandt DL, Lomax LG, Rao KS. Methylene chloride: Two-generation inhalation reproductive study in rats. *Fund Appl Toxicol* 1988;11:60-67
30. Yu X, Ichihara G, Kitoh J, Xie Z, Shibata E, Kamijima M, Asaeda N, Takeuchi Y. Preliminary report on the neurotoxicity of 1-bromopropane, an alternative solvent for chlorofluorocarbons. *J Occup Health* 1998;40:234-235
31. 市原 学、兪小忠、鬼頭純三他. 1-ブロモプロパン曝露ラットの神経、生殖器の病理組織学的変化と血液生化学的. *産衛誌*1999;41:513
32. Zhao M, Omura M, Tokunaga S, Romero Y, Inoue N. Histopathological changes within the testis caused by allyl chloride exposure in mice. *Bull Environ Toxicol* 1998;60:494-501
33. Stijkel A, van Eijndhoven JCM, Bal R. Drafting guidelines for occupational exposure to chemicals: the Dutch experience with the assessment of reproductive risks. *Am J Ind Med* 1996;30:705-717
34. Chapin RE, White RD, Morgan KT, Bus JS. Studies of lesions induced in the testis and epididymis of F-344 rats by inhaled methyl chloride. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984;76:328-343
35. 妙子, 本間志乃、熊谷嘉人、下城信弘. 内分泌攪乱物質であるニトロトルエンの関連物質 2,4,6-トリニトロトルエンのラット雄性生殖器に与える影響. *日衛誌* 1999;54:248
36. 石原勝、那須滋、竹中生昌他. フタル酸エステルのラット精巣障害に関する研究. *日衛誌* 1999;54:249
37. 日本産業衛生学会. 許容濃度等の勧告(1998). *産衛誌*1998;40:129-153
38. Jankovic JD, Drake F. A screening method for occupational reproductive health risk. *Am Ind Hyg Assoc J* 1996;57: 641-9

表1 生殖に有害と考えられている要因

1. 遺伝子に有害な因子	ベンゼン、エピクロロヒドリン、酸化エチレン、遺伝子毒性抗ガン剤、スチレンオキシド、塩化ビニル、電離放射線（放射性核種を含む）
2. 生殖器に有害な因子	ジプロモクロロプロパン (DBCP)、鉛とその無機化合物、2-エトキシエタノール、エチレンジプロマイド、クロロブレン、マンガン、2-メトキシエタノール、二硫化炭素、合成エストロジェンとプロジェストロン
3. 妊娠中の有害因子	
化学的因子	発がん物質、麻酔ガス、水銀及びその化合物、一酸化炭素、鉛、細胞増殖抑制剤、有機溶剤、変異原性物質 (R45)、発がん物質 (R46)、発達毒性物質 (R61)
生物学的因子	ウイルス (B型肝炎、ヘルペス、サイトメガロ、水痘、風疹)、細菌 (ジフテリア)、トキソプラズマ
物理学的因子	電離放射線（放射性核種を含む）

表2 セロソルブ類の許容濃度（総てに皮膚吸収あり）

溶剤名	米国ACGIH (1984-85)	日本産業衛生学会 (1985)
メチルセロソルブ (2-メトキシエタノール)	25 ppm ⇒ 5 ppm	5 ppm
メチルセロソルブアセテート (2-メトキシエチル酢酸)	5 ppm	5 ppm
セロソルブ (2-エトキシエタノール)	50 ppm ⇒ 5 ppm	200 ppm ⇒ 5 ppm
セロソルブアセテート (2-エトキシエチル酢酸)	100 ppm ⇒ 5 ppm	100 ppm ⇒ 5 ppm

表3 塩化メチレン高濃度曝露職場の8例の検診結果

番号	年齢	職場歴 (年)	職種	職種歴 (年)	COHb (%)	曝露後COHb測定ま での時間	喫煙	中枢神経 症状	生殖器検査	精子数 ($10^6/\text{ml}$)
1	30	1.5	接着と洗 浄	1.5	5.6	24	—	+	精巣圧痛	15
2	20	1.8	同上	1.5	6.4	16	—	+	精巣圧痛	26
3	28	1.4	同上	1.4	5.1	16	—	+	精巣圧痛	5
4	27	7.0	同上	2.9	1.2	8	—	—	精巣萎縮	2
5	47	6.0	同上	1.5	7.3	24	+	+	精巣萎縮	データなし
6	33	2.2	同上	2.2	1.2	90	—	—	前立腺の変 化(boggy prostate)	データなし
7	25	4.0	同上	1.5	11.0	4	—	—	異常なし	データなし
8	31	0.7	同上	0.4	17.3	8	+	+	精巣圧痛	データなし

表4 第1群：人間に対して生殖障害性のある因子

職業因子	男性生殖障害				女性生殖障害
	人の所見	関連 程度	動物の所見	関連 程度	関連の程度と所見
クロルデコン	精子数減少及び 精子活動率低下	1	精巣障害	1	—
ジブロモクロプロパン (DBCP)	精子数減少、無精子 症、ホルモン異常	1	精巣障害	1	神経発達障害
エストロジェン	精子数減少	1	精巣障害	1	—
熟	精子数減少	1	精子数の減少	1	±胎仔仮死
鉛	精子数減少	1	精巣障害、 精子数減少、 精子活動率低 下、精子形態異	1	自然流産
電離放射線	精子数減少	1	精巣障害	1	—
*2-ブロモプロパン	精子数減少、 無精子症	1	精巣障害	1	月経停止、卵巣障 害

1:強い関連性を示すデータあり、2:関連性を示す限定的データあり、3:関連性示さない限定的なデータあり、+: 確定的関連性あり乃至その可能性あり、±: 疑問のある関連性データあり、—: 関連性情報なし、(*:Ellenhorn¹⁾のデータに新たに追加したもの)

表5 第2群：人間に対しておそらく生殖障害性があると考えられる因子で，証拠がより十分なもの

職業因子	男性生殖障害				女性生殖障害
	人の所見	関連程度	動物の所見	関連程度	関連の程度と所見
クロロブレン	精子活動率低下、精子形態異常、性欲減	1	精巣障害	2	—
二硫化炭素	精子数減少、精子活動率低下	1, 3	精巣障害	2	±妊娠率低下、自然流産
ボロン	精子数減少	2	精巣障害	1	—
カドミウム	受精力低下	2	精巣障害	1	±子供の神経発達遅延
エチレンジブロマイド (EDB)	精子活動異常	2	精巣障害	1, 3	—
エチレングリコールエステル類	精子数減少	2	精巣障害	1	自然流産、奇形
*トリニトロトルエン	精子数減少	2	精巣障害	1	

1:強い関連性を示すデータあり、2:関連性を示す限定的データあり、3:関連性示さない限定的なデータあり、+: 確定的関連性あり乃至その可能性あり、±: 疑問のある関連性データあり、—: 関連性情報なし、(*:Ellenhorn¹⁾ のデータに新たに追加したもの)

表6 第2群：人間に対しておそらく生殖障害性があると考えられる因子で、証拠が比較的
不十分なもの

職業因子因子	男性生殖障害				女性生殖障害
	人の所見	関連 程度	動物の所見	関連 程度	関連の程度と所見
カーバリル	精子形態異常	2	精巣障害	2	
マンガン	性欲減退	2	精巣障害	2, 3	
塩化メチレン	精子数減少	2	精巣障害	2, 3	±混合曝露で自然流産の増加
スチレン		2			混合曝露による生殖毒性 ±胎仔毒性
トリクロロエチレン		2			±中枢神経発達障害
ジメチルジクロロビニル フオスフェート(DDVP)			精子数減少	1	
エピクロロヒドリン			精巣障害	1, 3	
酸化エチレン			精巣障害	2	±自然流産、動物で奇形
ポリ臭化ビフェニル			精巣障害	2	胎児死亡率の増加
ポリ塩化ビフェニル			精巣障害	2	子供の色素沈着、低体重児、 月経周期の変化
一酸化炭素			精巣障害	2	胎仔神経障害、 中枢神経奇形
*1-ブロモプロパン			精子数減少、活動精 子率減少	1	ラット性周期の遅延乃至停止
*塩化アリル			精巣萎縮	1	
*ヘキサン			精巣障害	1	
*シクロヘキサノール			精巣障害	1	
*ジエチルヘキシルフタレ ート(DEHP)			精巣障害	1	

1:強い関連性を示すデータあり、 2:関連性を示す限定的データあり、 3:関連性示さない限定的なデータあり、+: 確定的関連性あり乃至その可能性あり、±: 疑問のある関連性データあり、-: 関連性情報なし、

(*:Ellenhorn¹⁾ のデータに新たに追加したもの)

表7 第3群：人に対して生殖毒性が疑われるが、上記のように分類できないもの

職業因子因子	男性生殖障害				女性生殖障害
	人の所見	関連 程度	動物の所見	関連 程度	関連の程度と所見
ベンゼン			精子活動率低 下、精巣障害	2	
ベンゾ [a] ピレン			精巣障害	2	
四塩化炭素			精巣障害	2	
キシレン					混合曝露による生殖毒性 ±動物で骨化の遅延
テトラクロロエチ レン					±自然流産の増加、 動物で発達障害
トルエン等芳香族 炭化水素					+低体重児、奇形、 胎仔溶剤症候群
水銀					+死産、新生児性比の変化
*1,1,1-トリクロロ エタン					不十分な証拠
*塩化メチル			精子形成の遅延	2	

1:強い関連性を示すデータあり、 2:関連性を示す限定的データあり、 3:関連性示さない限定的なデータあり、+: 確定的関連性あり乃至その可能性あり、±: 疑問のある関連性データあり、-: 関連性情報なし。(※:Ellenhorn¹⁾ のデータに追加したもの)

5. 次世代影響としての神経行動毒性評価と今後の研究課題

北海道大学医学部予防医学講座公衆衛生学分野 岸 玲子

1. 次世代影響評価としての神経行動毒性の重要性

内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）の問題を契機として、ヒトでの次世代影響、発達毒性は世界的に大きな関心を呼んでいる。私たちが日常曝露している環境化学物質のうち、65,000 物質は何らかの毒性をもつと報告されている⁽¹⁾にもかかわらず、これまで次世代影響については、生殖への影響、催奇形性などの形態的異常、あるいは出生した仔動物の発達や諸機能についてはほとんど系統的には調べられてこなかった。

一方、産業職場で用いられることが多い幾つかの化学物質については、女性労働者を対象とした疫学研究から、不妊や流産、生下時体重の低下などの次世代への影響が報告されている。これまでの中毒学の多くの知見からも、動物実験では胎盤を通過して胎仔に移行すること、胎仔には排泄器官がなく薬物代謝酵素も未発達なため、母親よりも長く停留蓄積することが報告されている物質もある。さらに環境中に存在する化学物質の中には脂溶性に富み、神経系へ取り込まれ易いものもあることを考えると、中枢神経系の発生に影響を及ぼし、さらに生体の統合機能としての行動にまで影響を与える可能性もありうると考えられる。よって今後はこのような次世代影響を生殖毒性にとどまらず、神経行動発達についても調べることで、あるいはヒトでの実際のリスク評価につながる疫学研究を行うことは重要になってくる。

図1には化学物質の用量（Dose）と、毒性発現率との関係を示した。次世代影響は複数の outcome をもつが、その中でも仔の行動機能異常は、不妊や子宮内死亡、出生仔での先天奇形（形態構造の異常）、仔の発達及び成長の遅れなどの outcome よりも低い用量で発現する可能性がある鋭敏な健康影響指標である。

図2にはヒトの初期発生（受精後 56 日まで）の過程を示した。図のように受精後 6-7 日目に胚は着床し、20-23 日目までに 3 胚葉への初期分化が起こり、その後 56 日目までの間に器官形成が行われる。循環器系や呼吸器系などの多くの系はこの器官形成期の間で大部分の器官原基の形成を終えるが、神経系、特に中枢神経系の発達はその後生後約 1 年くらいまで時間をかけて徐々に発達する。

図3は発生段階のごとに、発達毒性をもつ化学物質に対する仔の感受性の変化を示した。ヒトの場合器官形成期である受精後 22-56 日が、最も催奇形性の感受性が高い時期に相当する。発達毒性をもつ化学物質は多くの場合、物質に曝された胚のわずかな部分にしか影響を与えないが、胚が初期のものであればあるほど、その後の発生分化によって形成される器官のより多くの部分に影響が発現すると考えられる。このため、一般的には胚発生

が進むにつれて発達毒性をもつ化学物質による影響は小さくなると考えられる。しかしながら、中枢神経系の発達は受精後 22-56 日の器官形成期（多くの器官の）後も継続し続けるため、神経毒性及び行動毒性の化学物質に対する感受性は、長い期間にわたって高いまま、より後の時期まで渡ると考えられる。

以上のように、神経行動毒性はその他の毒性と比べてより感度が高いと考えられること、またその感受性の高い時期が長く、出生後にまで渡ると考えられることから、次世代影響の神経行動毒性の重要性が示唆される。

2. 神経行動毒性評価法について

（1）最近の動向

神経行動毒性の評価については、1985 年にアメリカの EPA（環境保護庁）による有害物質規則法（TSCA）の神経毒性試験ガイドラインに発表され、ついで 1987 年にはアメリカ EDA と FDA の共通プロトコールが発表された。最近では 1997 年に OECD（経済協力開発機構）によって、化学物質の 28 日間反復毒性試験ガイドラインに、免疫毒性とともに神経行動毒性の評価項目が追加された。

一方、次世代の発達神経行動毒性の評価法に関しては、1986 年に WHO で「行動奇形 (behavioral teratogenicity)」についてのガイドラインが発表された。1998 年には OECD 検討会議で、神経系の発生から発達までを含め、妊娠期及び授乳期の曝露影響についての安全性評価を行うことが決議された。

（2）神経行動毒性評価の手法（表 1）

神経行動毒性を評価する場合には、化学物質の神経系への形態的影響及び機能的影響の両方の面から行う。具体的には、形態的影響は曝露によって生じる神経系の病理学的及び組織学的変化のほか、脳の重量及び体積（サイズ）の変化、GFAP などの神経細胞障害の指標となるようなマーカー測定などを評価する。また機能的影響は、1) 末梢神経の伝導速度、誘発電位、脳波の変化などの神経生理学的影響、2) 神経伝達物質の合成・分解などの活性のほか、伝達物質量、代謝活性の変化などの生化学的影響、3) 行動については運動協調性（ロータロッド試験など）や感覚機能（聴覚・視覚・嗅覚・痛覚異常など）の測定を行い、行動機能については自発運動量測定、情動性の検査（オープンフィールドテストなど）、不安行動や性行動の検査（社会相互作用テストなど）、学習及び記憶能力の検査（オペラント学習テスト、迷路テストなど）を評価する。

（3）発達神経行動毒性評価の手法（表 2）

化学物質による発達神経毒性を正確かつ鋭敏に評価するためには、適切なテストバッテリーの選択が重要である。発達神経毒性評価の場合は、1) 体重、開眼時期、歯牙崩出時

期などの仔動物の発育、2) 神経反射や神経筋機能といった生理運動機能の発達、3) 嗅覚、聴覚、視覚などの感覚の発達、4) 自発運動量や情動性の発達、5) 学習能力の発達、6) 性成熟度などの試験を行う。発達神経毒性評価の具体例を表3にあげる。

どのようなテスト項目を選択するかは、その化学物質についての既存データの有無による。既にヒトでの発達神経毒性学的データや、動物実験での神経行動毒性学的データがある場合は、既知のデータに関連した分野に焦点をあてたテストを行うことが多い。また、ヒトおよび動物実験いずれのデータもない場合は、上述した全ての神経機能について検討できるようにテストバッテリーを組んで評価する。

観察期間については、上述のような出生直後の発育から、性成熟までを含めた評価を行う場合、出生直後から成熟年齢までの期間を通して継続するのが適当である。

投与（曝露）濃度は、対照に加えて少なくとも3段階とする。最高投与量は発達神経毒性の評価に支障をきたす（胎生期及び新生児）死亡、奇形発生などが現れない、最大量を用いる。また投与開始日、投与期間、1日の投与回数については、投与する化学物質の吸収及び代謝速度、薬物代謝酵素の誘導の有無、肝機能障害の有無なども考慮に入れて検討すべきであろう。

3. スチレンの次世代影響（私どもの研究から）

プラスチック硬化剤として産業界で広く製造、使用されている有機溶剤スチレンについて、生殖毒性、発達毒性の検討を行った。

（1）胎盤及び胎仔側への移行率⁽²⁾

放射性同位元素 ^{14}C で標識したスチレンを妊娠マウスに注入し、注入後5及び30分、1、2、6及び24時間後に、母マウス及び胎仔組織および血液、胎盤、羊水、羊膜、子宮中のスチレン及びその代謝物濃度を測定したところ、スチレン注入後5分で母マウスの肺、腎臓、肝臓、脂肪組織、脳に、そして胎仔組織にも（濃度は低い）スチレンが分布しているのが観察された。胎盤中の濃度 ($0.21 \pm 0.13 \mu\text{mol/g tissue}$) は5分後でピークに達していた。注入後1時間では、胎仔血中の濃度がピークに達し、注入後24時間には、母の血中及び脳濃度と胎仔の血中濃度はほぼ同程度になった。このことから母マウスに注入されたスチレンは、胎盤を通して容易に胎児に移行しうること、さらに子宮内の仔は排泄器官がないことから（母の体内濃度が、腎臓および尿からの溶剤排泄によって低下した後も）体内に長く貯留していることが明らかになった。

（2）生殖への影響⁽³⁾

スチレン曝露による生殖への影響については、妊娠7-21日の母ラットに0、50、300 ppmで6hr/day スチレンを吸入させると、300 ppm曝露で母ラットの体重増加がcontrol (0 ppm) よりも低下し、出生後21及び77日目の仔の体重がcontrol よりも有意に低下す

るが、妊娠期間、産児数、仔の出生直後の死亡率には差が認められなかった（表 4、表 5）。

（3）発達神経行動毒性評価による検討⁽³⁾

妊娠 7-21 日に 0、50、300 ppm で 6hr/day スチレンを吸入させた母ラットから産まれた仔では、身体的発達に関しては歯崩出、開眼について曝露による影響が認められた（表 6）。また生理運動機能に関しては、驚愕反射、正向反射、ピボッティング移動、棒把握（握力）の項目で曝露による影響が認められた（表 6、図 4、図 5）が、置き直し反応、断崖回避反応については曝露による影響は認められなかった。ロータロッド平衡機能に関しては 300 ppm 曝露で影響が認められた（表 7）。情報行動に関しては、300 ppm 曝露でオープンフィールド行動（表 8）、活動性（表 9）、に差が認められた。またオペラント学習（表 10）にも影響が認められた。性成熟に関しては、雌の膈開口時期は曝露による影響を受けなかった（表 6）。

（4）病理組織学的/生化学的背景⁽⁴⁾

妊娠 7-21 日に 0、50、300 ppm で 6hr/day スチレンを吸入させた母ラットから産まれた仔の脳重量、脳内タンパク量、大脳及び小脳中の神経伝達物質量を測定したところ、脳重量及び脳内タンパク質量には曝露による影響は認められなかった。大脳中の神経伝達物質量については、300 ppm 曝露で 5-HT (5-hydroxytryptamine, serotonin) とその代謝物である 5-HIAA (5-hydroxyindoleacetic acid)、NA (norepinephrine) の代謝物である HVA (homovanillic acid) 量が有意に低下しているのが認められた。一方、DP (dopamine)、NA、DOPAC (3,4-dihydroxyphenylacetic acid, DP 代謝物) 量には影響が認められなかった（表 11）。小脳中の神経伝達物質量については、影響は認められなかった。

（5）肝薬物代謝酵素活性⁽⁵⁾

スチレンやトルエンなど有機溶剤は主に肝ミクロソーム分画に存在する薬物代謝酵素（チトクローム P450）によって代謝されるが、この代謝には性差とともに、仔の発達時期による差、また妊娠時／非妊娠時の差が認められる。肝ミクロソーム分画にトルエンを加えた際に生じる、ベンジルアルコール量を測定して代謝活性を調べたところ、トルエンを高濃度（5.0 mM）加えたときの成熟雄ラット（18 週令）の代謝活性は成熟雌ラットや、未成熟雄ラット（3 週令）のものより有意に高かった。雌ラットでは成熟個体と未成熟個体の代謝活性に差は認められなかった。また妊娠ラット（妊娠 10 日及び 21 日）では代謝活性は低下していた（表 12）。

また、スチレン代謝が主に P450 のどの isotype に支配されるかを調べるために、肝ミクロソーム分画を anti-P450IIC11/C6 及び anti-P450IIE1 モノクローナル抗体で前処理した場合のベンジルアルコール量を測定した。未成熟ラットでは雌雄とも anti-P450IIE1 抗体処理を行った場合に、成熟雄ラットでは anti-P450IIC11/C6 抗体処理を行

った場合に代謝活性が阻害され、成熟雌ラットでは anti-P450IIC11/C6、anti-P450IIE1 抗体のいずれの抗体処理でも同程度に代謝活性阻害が見られた。また、妊娠ラットでもその傾向は変わらなかった（図6）。

4. 文献レビュー（ステレンの生殖及び次世代への影響についての研究）

有機溶剤の1つであるスチレンの、ヒト及び動物での妊娠及び次世代影響についてのこれまでの報告を以下にまとめる。

（1）ヒトでの報告（表13）

スチレンの職業的曝露による妊娠に対するリスク要因（ヒトへの生殖毒性としての報告）が数多く出されているが、現在のところまだその毒性に関しては議論が続いている状況である。スチレンの女性労働者の生殖毒性について、1970年代はじめにロシアからいくつかの報告がなされたが、曝露濃度など詳細な記述がないこと、対照の有無などの重要な点について不明確であり信頼性に欠けるため、ここでは除外している。フィンランドの Holmberg ら⁽⁶⁾のグループが行った化学工場労働者の調査では、1976年から1977年までのフィンランド先天異常登録から43人の中枢神経系欠損をもつ子供を抽出し、母親へのインタビューを行った。43人中2人の子供の母親は強化プラスチック工場で働いており、スチレン、ポリエステル、有機パーオキシサイド、アセトンの曝露を受けていた。しかしこの報告では研究集団が小さく、化学物質曝露濃度の測定が行われていないなどの問題がある。これ以降もフィンランド先天異常登録に基づく調査が続けられ、132人の中枢神経系欠損の子供達についての調査が行われたが、スチレン曝露と関連した先天異常の例は報告されていない。またスウェーデンの Ahlborg ら⁽⁷⁾の報告では43人と人数は少ないが、強化プラスチック工場作業員では低体重児出産が対照に比べて多かったという結果も得られている。Lemaster ら⁽⁸⁾の強化プラスチック工場での調査では、環境濃度の測定も行われている。30 ppm 以下の低濃度曝露者では子供の体重は対照群と差がなかったが、82 ppm の高濃度曝露者（積層作業など）では子の体重は、対照群の母親の子の体重よりも4%低かったことが報告されている。

自然流産に関しては、フィンランドの Hemminki ら⁽⁹⁾が1973年から1976年までのフィンランド国民健康登録から得られた15,482人の自然流産に関する調査がある。化学工場で働く女性労働者の流産の率は、一般国民全体の流産の率よりも有意に高かった（15.57% vs. 7.98%）。これらの化学工場で働く女性労働者はスチレン曝露していたが、この報告では症例数が6例と少ないことが問題となっている。Harkonen ら⁽¹⁰⁾の同様の調査結果では、67人の lamination 作業を行っている女性労働者では自然流産の発生率に関して、対照である化学物質を取り扱わない工業労働者と比較して差がなかったと報告している。

内分泌系やホルモンに対する影響の発現例として生理不順を考え、Holmberg ら⁽¹¹⁾は

上述の 14 人の lamination 作業従事女性労働者で調査を行った。スチレンに曝露した女性労働者と対照者との間に有意差はなかった。Lemaster ら⁽¹²⁾ は米国内の 36 の強化プラスチック会社の 174 人の女性労働者と、449 人の年齢、人種、収入をマッチさせたスチレン非曝露者との電話聞き取り調査を行った（スチレンの曝露程度は作業内容に基づいて層化している）。その結果、生理期間、生理不順などについての差は認められなかった。また多変量（回帰）分析においても、職業的スチレン曝露と生理不順に関連性は見られなかったと報告されている。

以上のように次世代影響として発生、発達毒性の面から先天的奇形、胚/胎児死亡、出生時低体重の増加についての報告はあるが、正確なスチレン曝露濃度やスチレン以外の化学物質への曝露程度などが十分に明らかになっておらず、またバイオロジカルモニタリングの欠如、及び交絡要因の調整などもなされていないため、スチレン曝露による因果関係を明確化したものは現在までのところ見られない。

（2）動物実験での報告（表 1 4）

スチレンの次世代影響、および生殖学的影響については 1989 年の Brown⁽¹³⁾ の総説に詳しい。妊娠中スチレン曝露による胎児への影響は Ragule ら⁽¹⁴⁾ がスチレン 0、5、50 mg/m³ の妊娠中曝露を行っている。50 mg/m³ の高濃度曝露では胚/胎児死亡数が有意に増加したが、低濃度曝露では影響は見られなかった。また、0、1.5、5 mg/m³ の曝露を妊娠全期間中に行った群と、妊娠前期のみ行った群の 2 群での実験を行った。両群において胎仔死亡の増加が見られ、有意に母ラット当たりの総胎仔死亡が増加したと報告しているが、必ずしも詳しいデータが記載されているわけではなかった。またスチレンの催奇形性については、Vainio ら⁽¹⁵⁾ がニワトリを用いて、胚の器官形成期に 2.5 mg/kg のスチレンを卵腔内に注入後 9 日間保温し、孵化した雛では骨の奇形が認められている。Murray ら⁽¹⁶⁾ はラットとウサギの発達毒性について調べ、ウサギには 300 及び 600 ppm のスチレンを 7 時間/日曝露し、ラットには 180 mg/kg/day のスチレンを経口で与えた。ラットではスチレン投与によって、母ラットの妊娠 6 日から 9 日の体重増加の低下をもたらしたが、これは餌摂取量の減少によるものと考察している。一方、着床数、生存仔数、仔の体重、外的奇形及び骨奇形には影響は見られなかった。ウサギでは曝露による影響は見られなかった。これらの結果から彼らは、母体に影響の生じるくらいの高濃度でも胎児に対する発達毒性はごくわずかであると結論している。Kankaanpää ら⁽¹⁷⁾ はマウスにスチレン曝露を 250 ppm、6 時間/日、妊娠 6-16 日で行った。新生仔死亡数、胎児死亡数、奇形（骨格欠損）が対照に比べて有意に増加（2.9% vs. 0.9%）したと報告しているが、統計的検定が不十分であった。また彼らは、ハムスターにも 300、500、750、1000 ppm のスチレン曝露を妊娠 6-18 日に行い、1000 ppm 曝露でのみ胎児死亡数が増加していたが、奇形はみられなかったと報告している。

Beliles ら⁽¹⁸⁾ は 3 世代生殖実験を行っている。飲料水にスチレンを 0、25、250

ppm の濃度で溶解した実験を行っているが、飲水量は濃度依存的に減少していた。2 年におよぶ実験期間は全生存期間に曝露を行ったと等しいと考えられるが生殖毒性、催奇形性は見られなかった。また F2 世代において雌の体重がわずかに減少しているのが確認された。これらのことから彼らは、スチレン投与と生殖毒性の間には関連性はないと結論している。母ラットへの影響については、Chernoff ら⁽¹⁹⁾ が 9 種類の化学物質について実験を行っている。その中でスチレンについては経口投与で母ラットに影響のある濃度 1,147 mg/kg/day を妊娠 6-15 日に与え、妊娠 8、12、16、20 日目に体重増加、各器官の重量（胸腺、脾臓、副腎など）を測定している。その結果、各妊娠日で体重増加の低下が認められ、特に 12 日目では対照群より増加が少なかった。妊娠後半では回復の兆しが見られた。仔の発達異常については、腎盂が肥大している以外に仔の身体上の奇形は見られなかった。Chernoff らは母ラットへの明らかな毒性が認められた濃度でも、胎児への毒性はあまりないとしている。

Brown-Woodman⁽²⁰⁾ は、in vitro での器官形成期におけるスチレンの影響を報告している。1.00 mmol/ml を添加した培養液で 40 時間胚を発生させると、発達指標とした crownrump の伸長が遅れるのが観察された。

Zaidi ら⁽²¹⁾ は妊娠中及び授乳中のスチレン曝露による影響について調べている。妊娠ラットに 200 mg/kg のスチレンを経口的に妊娠期間中与えた群、妊娠期間中と授乳期 3 週間与えた群、出産後 3 週間に与えた群の 3 群で検討している。いずれの群でも、母当たりの仔数と仔体重には影響は見られなかった。また妊娠期及び授乳期に曝露を受けた群の仔ラットでは、線条体タンパク質量や線条体ドーパミン受容体 (D2) 量に影響がみられた。スピロペリドール結合試験では、妊娠期-授乳期、授乳期のみに曝露をうけた群で、D2 数が増加していた。行動発達上での影響は、アンフェタミン誘導の活動性、アポモルフィン誘導性行動の亢進がみられ、スチレンがドーパミンに対して響を与えると報告している。

Khanna⁽²²⁾ によれば、栄養状態が胎児への毒性作用を左右すると考えている。経口投与で 100 mg/kg/day を妊娠 6 日から出産後 22 日の離乳の時期まで曝露し、同時に低タンパク質栄養（カゼイン 8% 飼料）あるいは標準タンパク質栄養の栄養による 2 群での観察を行っている。仔の体重増加、脳重量の低下は、低タンパク質栄養とスチレン曝露の両方の複合影響がある場合に起こり、スチレン曝露のみでは有意な低下は見られなかった。スチレン曝露と栄養状態との両方の影響がある場合に、毒性が顕著であると考えられると報告している。また身体的発達として毛並み、開眼、門歯萌出について、神経学的発達として驚愕反射、断崖回避反応、正向反射、アンフェタミン誘導運動量の増加について、低タンパク質栄養とスチレン曝露の複合影響があった仔でのみ遅れが見られた。低タンパク質栄養条件は胎盤を通過する栄養の減少を起し、それによって神経行動発達の発達指標の遅れが生じるが、スチレン曝露のみでは発達に対する遅れは生じないと考えられると報告している。また Khanna⁽²²⁾ は脳内伝達物質であるカテコールアミン、セロトニン受容体

数の測定も行っている。ドーパミン受容体数（線条体）、セロトニン受容体数（皮質）も低タンパク質栄養条件ラットで増加しているのが見られたが、標準タンパク質栄養では影響はなかった。また脳内生化学的に MAO、ATP 加水分解酵素（Na、K、ATPase）、コハク酸デヒドロゲナーゼの活性の減少もみられた。

以上のように、母動物へのスチレン曝露と胎仔期の神経毒性については、神経毒性のメカニズムやスチレンオキシドの役割なども不明の部分があり、まだ十分に因果関係が解明されていないが、神経系の発達期での有害化学物質曝露によって影響が生じる可能性は大きいと考えられる。動物を用いた神経行動学的実験も少ないので、ヒトでの疫学調査のみならず、これからも継続的な研究が必要と考えられる。

5. 次世代影響の評価で考慮すべき要因

次世代影響として神経行動毒性評価を行う際には、いくつか考慮すべき要因がある。まず第一に、発達毒性に関してヒトの疫学調査、特に個々の正確な曝露データを測定した調査報告が非常に少ないことがあげられる。例えば4. で述べたスチレンのヒトへの発達毒性影響に関する研究でも、1975 年から現在まで発表されている 7 編のうち、曝露レベルを測定したものは 3 偏しかない。また症例対照研究では化学物質の有害性は明らかにされるが、曝露レベル測定がなされていないため、用量-反応評価や曝露評価に用いるのは難しい。また産業現場などでの横断研究では、曝露レベル測定は行われていることが多いが、症例数が少ないため、欧州で行われているような multicenter study でない限り、必要なサンプル数が得られないという問題が残る。

第二に現在までのところ、多くの次世代影響評価では母親が曝露した場合の仔への影響のみを見ているが、父親の曝露による仔への影響も見必要があるという点である。

第三に動物での発達毒性の、ヒトへの外挿が必ずしも容易ではないという問題がある。その理由として、1) 動物での発達毒性の発現のメカニズムが多様であること、すなわち化学物質は母体、胎盤、胎児のいずれかあるいは全体に作用し、最終的に胎児に毒性を与えるが、投与した化学物質の量、投与時期、毒性の観察時期によってそれぞれの毒性の現れ方が異なる。さらに、2) 動物とヒトでは個体発生的にも系統発生的に差異があること、動物とヒトとの系統発生的差異については、胎盤構造の差異、子宮内での器官形成時期の差異などがあげられる。特に子宮内発生の差異は、ラットやマウスでは器官形成期が 1 週間前後なのに対して、ヒトでは 5~6 週間かかるため、化学物質による障害を修復する時間が齧歯類とは異なり、十分にあると考えられる。またラットとヒトでは出生児における成熟の程度が異なり、例えば神経行動毒性の場合、ラットやマウスでは脳の組織形成は出生初期に行われるのに対し、ヒトでは長い胎生後期にも行われる。これらのことから考えて、動物での実験データとヒトへ外挿する際には、その系統発生的差異について十分に考慮すべきであろう。また、3) ヒトでの発達毒性の疫学調査が難しいので、動物実験で

得られたデータに基づいてヒトでの証明が得られにくいことも理由としてあげられる。ヒトでの発達毒性の調査が難しいのは、ヒトの先天異常の症例は、頻度が非常に稀であり、異常の原因が複雑で多因子遺伝によるものも多いことから理解できよう。また、ヒトは実験動物と異なり遺伝的に均一でなく、また様々な環境下に存在する。このため、ヒトでは多くの交絡要因を考慮に入れる必要があり、動物実験データをヒトに当てはめる時には十分な注意が必要である。

6. まとめと今後の研究（提案）

これまで内分泌攪乱作用が疑われている有機溶剤スチレンや重金属鉛について、動物実験で次世代の発達神経毒性および、妊娠中の曝露での胎盤から胎仔移行率などの研究を行ってきた。一般に内分泌攪乱物質の生体に及ぼす影響は、「きわめて微量でも生体へ影響を及ぼすこと」、「障害がしばしば不可逆的変化であること」、「（常識的な中毒学の dose-response に必ずしも一致しないものの）体内蓄積量に応じて多彩な病態をとること」、「神経発達の異常や催奇形性など次世代影響が大きい」などの特徴がある。PCB や水銀などの例を見ても大人（成獣）では毒性が発現しない低用量で、次世代あるいは幼若動物で顕在化することが多いが、特に慢性曝露の場合に、最も微量でも感受性が高く影響がでやすいのは発達成長の遅延および機能の低下と異常である。しかし、現在世界各国で日常的に大量に使われている多くの化学物質（たとえばわが国で生産量が最も多いトルエンやキシレンですら）、このような内分泌攪乱作用を念頭においた生殖毒性や次世代影響に関する系統的な研究はほとんどなされてこなかった。しかも、内分泌攪乱物質の神経機能や行動に及ぼす影響の程度やメカニズムも、一部を除いていまだほとんど不明である。早急に研究体制を整えることが望まれる。

有機溶剤スチレンなどの職業性曝露では女性労働者では、無月経、性周期の乱れ、受精率の減少といった生殖毒性が指摘されている。これらの毒性は生殖器官への直接的な作用も疑われるが、同時に視床下部-脳下垂体における神経内分泌への影響とその結果生じる血漿プロラクチンなど性ホルモンの動態と関連も示唆される。しかし多くの化学物質で職業性高濃度曝露での生殖毒性と神経内分泌との関係はほとんど検討されていない。一方、このような神経毒性の検討では基本的な問題として、実験動物を用いて、次世代の動物の学習行動を検討する場合、「母（腹）による litter 効果」を除外するために、曝露濃度すなわち dose ごとに腹の数を 20 匹以上が要請されるなど実験施設の整備が重要である。また仔の成長に応じて曝露影響が検出しやすい鋭敏なテストバッテリーの開発など、多くの課題が残されている。

具体的な実験の提案としては、まず（1）発達の初期から、成長後までそれぞれの時期に対応した鋭敏な神経影響や学習障害の検出手法の開発を行う。ついで、（2）個々の内分泌攪乱物質を妊娠ラットに曝露し、生殖毒性の検討とともに、次世代の神経発達／行動障

害の多様性の検討、(3) 発達神経障害をひき起こすメカニズム、特に内分泌攪乱を念頭において、母および胎仔の神経内分泌の関連を検討する。具体的にはドーパミン、プロラクチン、卵胞刺激ホルモン、エストロゲン、プロゲステロンなどの動態と、生殖毒性、児の生後神経反射の発達や、自発行動、学習障害などを検討し、発生初期の神経内分泌の役割の解明を行う。同時に中枢神経系の細胞分化と関係の深いセロトニン、ドーパミン、ノルアドレナリン、アセチルコリンなどの動態を調べる。

対象の優先順位としては、EU や北ヨーロッパで生殖毒性の分類 1B とされている、すなわち人の生殖への影響を示すデータはあるが限定的であり、かつ1種の動物のデータがあるもの、または人の症例報告があり、同時に代謝が人と同じ2種以上の動物のデータがある、スチレン、2-エトキシエタノール、2-メトキシエタノール、ヘキサン、テトラクロロエチレン、塩化メチレン、トルエンなどから開始する。ついでグルタルアルデヒド、ホルムアルデヒドなど変異原性や催奇形性が疑われているが、生殖毒性の検討が行われていない物質について検討を行う。同時に有機塩素系農薬や、ビスフェノールAなどの内分泌攪乱作用が強く疑われる化学物質で、順次生殖毒性とともに本稿で述べたような神経行動毒性について検討していく。

Reference

1. National research council, Toxicity testing: strategies to determine needs and priorities, National Academy of Science, Washington, DC., 1984.
2. R. Kishi, et al., Placental transfer and tissue distribution of ¹⁴C-styrene: an autoradiographic study in mice. *Br.J.Ind.Med.*, 1989. 46: p. 376-383.
3. R. Kishi, et al., Effect of prenatal exposure to styrene on the neurobehavioral development, activity, motor coordination, and learning behavior of rats. *Neurotoxicol.Teratol.*, 1995. 17: p. 121-130.
4. R. Kishi, et al., Neurochemical effects in rats following gestational exposure to styrene. *Toxicol.letters*, 1992. 63: p. 141-146.
5. T. Nakajima, et al., Sex-, age- and pregnancy-induced changes in the metabolism of toluene and trichloroethylene in rat liver in relation to the regulation of cytochrome P450IIE1 and P450IIC11 content. *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics*, 1992. 261(3): p. 869-874.
6. P.C. Holmberg, Central nervous system defects in two children of mothers exposed to chemicals in the reinforced plastics industry: chance or causal relation. *Scand. J. Work Environ. Health*, 1977. 3: p. 212-214.
7. G. Ahlborg, T. Bjerkedal, and J. Egenaes, Delivery outcome among women employed in the plastics industry in Sweden and Norway. *Am.J.Ind.Med.*, 1987. 12: p. 507-517.
8. G. Lemaster, et al., Reproductive outcomes of pregnant workers employed at 36 reinforced plastics companies II. lowered birth weight. *J.Occup.Med.*, 1989. 31: p. 115-120.
9. K. Hemminki, E. Pranssila, and H. Vainio, Spontaneous abortion among female chemical workers in Finland. *Int.Arch.Occup.Environ.Health*, 1980. 45: p. 123-126.

10. H. Harkonen and P.C. Holmberg, Obstetric histories of women occupationally exposed to styrene. *Scan.J.Work.Environ.Health*, 1982. 8: p. 74-77.
11. P.C. Holmberg, et al., Oral clefts and organic solvent exposure during pregnancy. *Int. Arch.Occup.Environ.Health*, 1982. 50: p. 371-376.
12. G.K. Lemasters, A. Hagen, and S. Samuels, Reproductive outcomes in women exposed to solvents in 36 reinforced plastics compaines. *J.Occu.Med.*, 1985. 27: p. 490-494.
13. N.A. Brown, Reproductive and developmental toxicity of styrene. *Rep. Toxicol.*, 1991. 5: p. 3-29.
14. N. Ragule, The probrem of the embryotropic action of styrene. *Gig.Sanit.*, 1974: p. 85-86.
15. H. Vainio, K. Hemminki, and E. Elovaara, Toxicity of styrene and styrene oxide on chick embryos. *Toxicology*, 1978. 8: p. 319-325.
16. F.J. Murray, et al., Teratologic evaluation of styrene given to rats and rabbits by inhalation or by gavage. *Toxicology*, 1978. 11: p. 335-343.
17. J.T.J. Kankaanpaa, et al., The effects of maternally inhaled styrene on embryonal and fetal development in mice and Chinese hamsters. *Acta.Pharmacol.Toxicol.*, 1980. 47: p. 127-129.
18. R.P. Beliles, et al., Chronic toxicity and three-generation reproduction study of styrene monomer in the drinking water of rats. *Fundament.Applied.Toxicol.*, 1985. 5: p. 855-868.
19. N. Chernoff, et al., Effects of chemically induced maternal toxicity on prenatal development in the rat. *Teratology*, 1990. 42: p. 651-658.
20. P.D.C. Brown-Woodman, et al., In vitro assessment of individual and interactive effects of aromatic hydrocarbons on embryonic development of

the rats. *Reproductive Toxicology*, 1994. 8: p. 121-135.

21. N.F. Zaidi, et al., Effects of gestational and neonatal styrene exposure on 'dopamine receptors. *Neurobehav.Toxicol.Teratol.*, 1985. 7: p. 23-28.
22. V.K. Khanna, et al., Increased neurobehavioral toxicity of styrene in protein malnourished rat. *Neurotoxicol.Teratol.*, 1991. 13: p. 153-159.
23. H. Harkonen, et al., Congenital malformations,mortality and styrene exposure. *Am.Acad.Md.(Singapore)*, 1984. 13: p. 404-407.
24. M.L. Lindbohm, K. Hemminki, and P. Kyyronen, Spontaneous abortions among women employed in the plastics industry. *Am.J.Ind.Med.*, 1985. 8: p. 579-586.
25. A.D. McDonald, et al., Prematurity and work in pregnancy. *Br.J.Ind.Med.*, 1988. 45: p. 56-62.
26. H. Taskinen, et al., Spontaneous abortions and congenital malformations among the wives of men occupationally exposed to organic solvents. *Scand.J.Work.Environ.Health*, 1989. 15: p. 345-352.
27. M.L. Lindbohm, et al., Spontaneous abortions among women exposed to organic solvents. *Am.J.Ind.Med.*, 1990. 17: p. 449-463.
28. Y. Katakura, et al., Effects of prenatal exposure to styrene on neurochemical levels in rat brain. *Toxicol.letters*, 1999.

表1 神経行動毒性評価の手法

1. 形態的影響
 - ・神経系の病理学的/組織学的変化
 - ・脳の重量/体積（サイズ）の変化
 - ・障害を示唆するバイオマーカー
2. 機能的影響
 - 1) 神経生理学的
 - 神経伝導速度、誘発電位、脳波などの変化
 - 2) 神経生化学的
 - 神経伝達物質量及び活性の変化
 - 3) 行動学的
 - ・行動発達試験
 - ① 運動協調性
 - ② 感覚機能
 - ・行動機能試験
 - ① 自発運動量
 - ② 情動性
 - ③ 不安行動、性行動
 - ④ 学習、記憶

表2 発達神経行動毒性評価の手法

1. テストバッテリーの選択法
 - 1) 既に神経発達毒性学的にデータがあるとき
 - 2) 動物実験で神経化学や神経解剖学、行動学的データがあるとき
 - 3) それらのデータが全くないとき
2. テスト項目
 - 1) 仔動物の発育
 - 2) 生理運動機能の発達
 - 神経反射
 - 神経筋機能
 - 感覚
 - 3) 行動機能
 - 自発運動量
 - 情動性
 - 学習能力
 - 記憶能力
 - 4) 性成熟
3. 観察期間
 - 出生直後から性成熟年齢まで継続
4. 投与（曝露）濃度
 - 3段階
 - 最高投与量：胎生期死亡や奇形が現れない最大量

表3 発達神経行動毒性評価項目（具体例）

1. 仔動物の発育	体重・開眼・歯牙萌出など
2. 生理運動機能の発達	
1) 聴覚機能	聴覚性 Prayer 反射、驚愕反射
2) 視覚機能	視覚性置き直し反応、瞳孔反射、光に対する反応
3) 嗅覚機能	嗅覚性指向反応、嗅覚反射
4) 触覚・痛覚（脊髄レベル）	疼痛反応、角張反射、耳介反射、同側屈曲反射
5) 平衡機能	正向反射、自由落下反射
6) 神経筋機能	背地走性、歩行、棒渡り、牽引力、握力、置き直し反応 ビボティング移動、回転棒試験（ロータロッド）
7) その他	把握反射、断崖回避反応 （神経毒性評価一般に準じる）
3. 行動機能	
4. 性成熟	陰開口、精巣下降など

表4 妊娠 7-21 日のスチレン曝露による生殖毒性

styrene (ppm)	maternal wt. gain during exposure (g)	length of gestation (day)	number of live- born offspring
0	48.1	21.1	9.4
50	45.0	22.0	9.5
300	39.1	21.0	9.4

All values expressed as mean $\pm$ SD.

表5 スチレン曝露母ラットから出生した仔の
出生後の体重変化

styrene (ppm)	1-day old (g)	21-day old (g)	77-day old (g)
0	6.1	46.9	304.5
50	(5-6)	(38-42)	(265-275)
300	5.6	40.1*	273.3

* : $p < 0.01$, calculated between controls and groups exposed to 300 ppm styrene.

All values at 0, 300 ppm expressed as mean $\pm$ SD.

Values at 50 ppm expressed as range.

表6 スチレン曝露母ラットから出生した仔の発達

styrene (ppm)	incisor eruption (day)		eye opening (day)	auditory startle reflex (day)	righting reflex (day)
	upper	lower			
0	9.2	8.1	15.0	11.9	14.3
50	(9-10)	(8-9)	(15-16)	(12-13)	(15-16)
300	9.9**	9.4**	15.8**	13.2*	16.1**

* : $p < 0.01$, calculated between controls and groups exposed to 300 ppm styrene.

** : $p < 0.05$, calculated between controls and groups exposed to 300 ppm styrene.

All values at 0, 300 ppm expressed as mean $\pm$ SD.

Values at 50 ppm expressed as range.

表7 スチレン曝露母ラットから出生した仔の神経筋機能
(ロータロッドテスト)

styrene (ppm)	30 days old			60 days old		
	8 RPM	12 RPM	16 RPM	8 RPM	12 RPM	16 RPM
0	80.2	111.3	112.4	113.8	115.6	114.3
50	(48-61)	(72-83)	(101-112)	(97-105)	(98-105)	(80-99)
300	47.6*	88.9*	89.5*	89.4*	97.7*	86.5*

* : $p < 0.05$, calculated between controls and groups exposed to 300 ppm styrene.

All values at 0, 300 ppm expressed as mean.

Values at 50 ppm expressed as range.

表 8 スチレン曝露母ラットから出生した仔の情動性
(オープンフィールドテスト)

styrene (ppm)	30-31 days of age		60-61 days of age	
	ambulation	rearing	ambulation	rearing
0	46.2	5.6	42.0	5.6
50	(51-63)	(8-11)	(48-49)	(7-8)
300	76.4*	11.6*	65.7**	20.4*

* : $p < 0.01$, calculated between controls and groups exposed to 300 ppm styrene.

** : $p < 0.05$, calculated between controls and groups exposed to 300 ppm styrene.

All values at 0, 300 ppm expressed as mean $\pm$ SD.

Values at 50 ppm expressed as range.

表 9 スチレン曝露母ラットから出生した仔の活動性

styrene (ppm)	exploratory first 1h activity	total 24h activity	dark phase activity	light phase activity
0	3512	36133	22157	13979
50	(3173-5273)	(35930-42483)	(23435-24670)	(12490-17810)
300	5080	42833*	27506*	15325

* : $p < 0.05$, calculated between controls and groups exposed to 300 ppm styrene.

All values at 0, 300 ppm expressed as mean.

Values at 50 ppm expressed as range.

表 10 スチレン曝露母ラットから出生した仔のオペラント学習
(GRF)

styrene (ppm)	session			
	1	2	3	4
0	43.8	92.0	150.7	134.6
50	(2-18)	(6-58)	(43-82)	(92-101)
300	28.7	44.1	68.2*	85.8

* : $p < 0.01$, calculated between controls and groups exposed to 300 ppm styrene.

All values at 0, 300 ppm expressed as mean.

Values at 50 ppm expressed as range.

表 11 スチレン曝露母ラットから出生した仔の脳の病理
組織学的及び生化学的变化

	control	50 ppm	300 ppm
5-HA	1.76	1.60	1.27*
5HIAA	2.93	2.30	1.72*
DP	2.69	2.75	2.35**
DOPAC	0.60	0.63	0.54
HVA	1.08	1.19	0.91*
NA	1.08	1.01	0.93
protein	14.71	15.84	14.90
brain weight	169.3	179.9	164.3

* : significantly different from control group at $p < 0.05$.

** : significantly different from control group at $p < 0.1$.

表12 ラット肝臓のトルエン代謝活性に対する性、年齢、妊娠の影響

	BA 生成量 (nmol/mg protein/min)
Toluene, 0.20 mM	
Male, 3 weeks	1.72±0.16
Male, 18 weeks	1.56±0.27
Female, 3 weeks	1.76±0.35
Female, 18 weeks	0.88±0.17 ⁺ *
Female, pregnant (day 10)	0.72±0.05
Female, pregnant (day 21)	0.55±0.08 ⁺⁺
Toluene, 5.0 mM	
Male, 3 weeks	2.79±0.28
Male, 18 weeks	10.94±1.88
Female, 3 weeks	2.92±0.51
Female, 18 weeks	2.60±0.44 [*]
Female, pregnant (day 10)	2.33±0.31
Female, pregnant (day 21)	2.08±0.13 ⁺⁺

*: Significantly different (P<0.05) from male rats of 18 weeks of age.

+ : Significantly different (P<0.05) from female rats of 3 weeks of age.

++ : Significantly different (P<0.05) from female rats of 18 weeks of age.

表13 スチレンのヒトへの生殖毒性(1)

literature (country)	year	industry	source of data	exposure		number of exposed / control	reproductive effects
				level	period		
Holmberg (Finland)	1977	reinforced plastic factory	interview Finnish registry (1976-1977)	200 mg/m ³		2 / 43 (case report)	↑:anencephalic, hydrocephaly
Hemminki (Finland)	1980	chemical workers	Finnish registry interview	(-)	(-)	6 cases	↑:spontaneous abortion (RR=1.5-2.5, p<0.01)
Holmberg (Finland)	1982	reinforced plastic factory	Finnish registry (1977-1980)			14 / 388	↑:oral cleft
Harkonen (Finland)	1982	laminator workers	interview (1979-1980)	66 ppm	10 yrs	67 / 67	NE:spontaneous abortion (the number of births)
Harkonen ⁽²³⁾ (Finland)	1984	laminator workers					↑:malformation NE:menstrual disturbances
Lindbohm ⁽²⁴⁾ (Finland)	1985	reinforced plastic factory	health service	(-)		4 / 17	NE:spontaneous abortion
Lamasters (USA)	1985	reinforced plastic factory	questioners	< 30 ppm 82 ppm		62 / 1535	NE:menstrual cycle
Ahlborg (Sweden)	1987	plastic factory	interview (1980-1983)	(-)		43 / 86	↓:birth weight NE:stillbirth, postnatal death (OR=0.8, 0.4-1.6)
McDonald ⁽²⁵⁾ (Canada)	1988	rubber plastics factory	interview hospital registry			76	↑:spontaneous abortion (RR=1.6, 1.0-2.4)
Taskinen ⁽²⁶⁾ (Finland)	1989	chemical industry (paternal exp.)	Finnish registry biomonitoring			37 / 66 17 / 36	NE:spontaneous abortion (OR=1.3, 0.8-2.1) NE:spontaneous abortion (OR=0.7, 0.4-1.5)

表 1 3 スチレンのヒトへの生殖毒性 (2)

literature (country)	year	industry	source of data	exposure		number of exposed / control	reproductive effects
				level	period		
Lemaster (USA)	1989	reinforced plastics factory	interview (1974-1981)	< 30 ppm 82 ppm		1050 / 485	↑ : 4 % less fetal body weight (95%CI: -7.7-0.6, p=0.08) NE: infant body weight
Lindbohm ⁽²⁷⁾ (Finland)	1990	chemical industry	interview monitoring	5.7 nmol/l			NE: spontaneous abortion (RR=0.3, 0.1-1.0)

NE: no adverse effects

表 1 4 スチレンの動物への生殖毒性 (1)

literature (country)	year	route	species	exposure		reproductive effects	neurobehavioral effects	neurochemical effects
				level	period			
Ragule (USSR)	1974	inhal.	rat	0-50 mg/m ³ (0-11.8 ppm)		↑:preimplantation death (not statistical) ↑:embryo mortality (11.8 ppm)	(-)	(-)
Vainio (Finland)	1977	incubation	chick	2.5 mg/kg	0-9 days	↑:malformation (7%)	(-)	(-)
Murray (USA)	1978	inhal.	rat	300-600 ppm/7h	6-15	↓:MBW gain, food consumption	(-)	(-)
		gavage	rat	180-300 mg/kg/day	8-15	NE:FBW, number of live fetuss, malformation		
		inhal.	rabbit	300-600 ppm/7h	8-18	NE:FBW, number of live fetuss, malformation		
Kankkasa (Finland)	1980	inhal.	mouse	250 ppm/8h	8-18	↑:resorbing fetus (no litter basis) ↑:malformation (no maternal toxicological data)	(-)	(-)
		inhal.	hamster	300-1000 ppm/6h	6-18	↑:resorbing fetus (no litter basis) NE:malformation (no maternal toxicological data)		
Beliles (USA)	1985	water	rat	0-250 ppm	throughout life time	↓:postnatal survival or growth (F2, F3) NE:malformation	(-)	(-)
Zaidi (India)	1985	gavage	rat	200 mg/kg	0-21 lactation period	NE:number of pups, FBW	↑:amphetamine-induced motor activity ↑:apomorphine-induced stereotypy	↑:number of dopamine receptor NE:affinity of dopamine receptor
Chernoff (USA)	1990	gavage	rat	1147 mg/kg/day	8-15	↓:MBW, anomalies (enlarged renal plexis) NE:resorption, fetal death	(-)	(-)
Khanna (India)	1991	oral	rat	100 mg/kg (low and normal protein)	8-PND22	↓:FBW, brain weight ↓:eye opening, Pinna detachment, fur growth, cliff avoidance, incisor eruption	↓:righting reflex, motor activity	↓:dopamine receptor level, 5HT receptor level ↓:monoamine oxidase, Ha ⁺ , K ⁺ -ATP ase, succinic dehydrogenase

表14 スチレンの動物への生殖毒性(2)

literature (country)	year	route	species	exposure		reproductive effects	neurobehavioral effects	neurochemical effects
				level	period			
Kishi and 1995	1992	inhal.	rat	0-300 ppm/8h	7-21	↓:FBW, PBW NE:MBW, length of gestation, number of offsprings, brain weight	↓:eye opening, incisor, auditory, righting reflex, pivoting, bar holding, rotarod, CRF (learning) ↑:open field, spontaneous activity (300ppm)	↓:5HT, 5HIAA DP, HVA NE:protein content
Brown- Woodman (Australia)	1994	In vitro	rat	1.00 mmol/ml	40h	↓:crownrump length	(-)	(-)
Katakura (M) (Japan)	1999	inhal.	rat	0-300 ppm/6h	8-21	↓:food intake, MBW, Gsp, brain weight (pc) ↑:neonatal death	↓:incisor, eye opening (pc), air righting reflex (pc, ac)	0 day ↓:5HT, HVA (pc, ac) 21st day ↓:5HIAA (cortex, hypo, 300 ppm), 5HIAA/5HT (hypo, 50 and 300 ppm) ↑:5HT (striatum, 50ppm), DA (300ppm)

(-): not studied, NE: no adverse effects

MBW: maternal body weight, FBW: fetal body weight, PBW: pups body weight, 5HIAA: 5-hydroxyindoleacetic acid, DP: dopamine, HVA: homovanillic acid,

5HT: 5-hydroxytryptamine

pc: pair feeding control, ac: ad lib feeding control

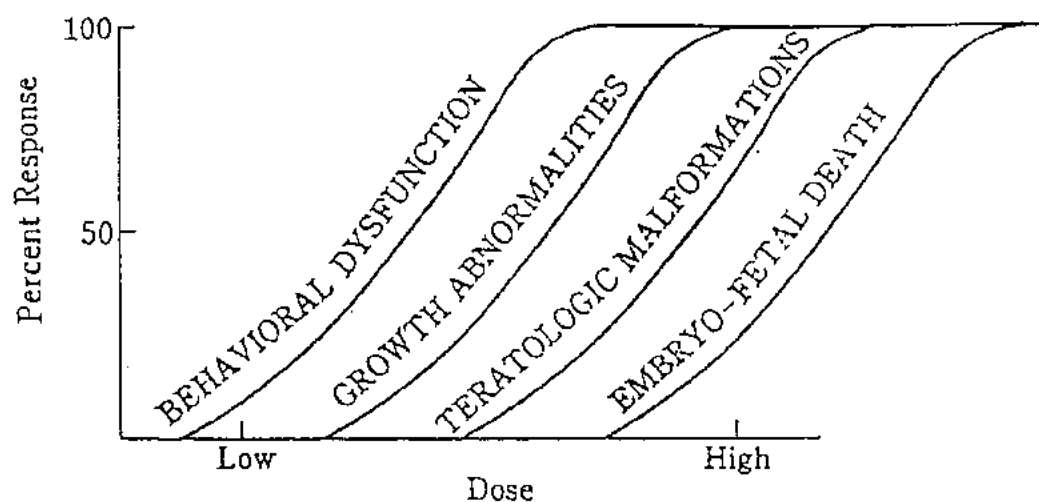


図1 化学物質の用量と各種の継世代的毒性発現の関係

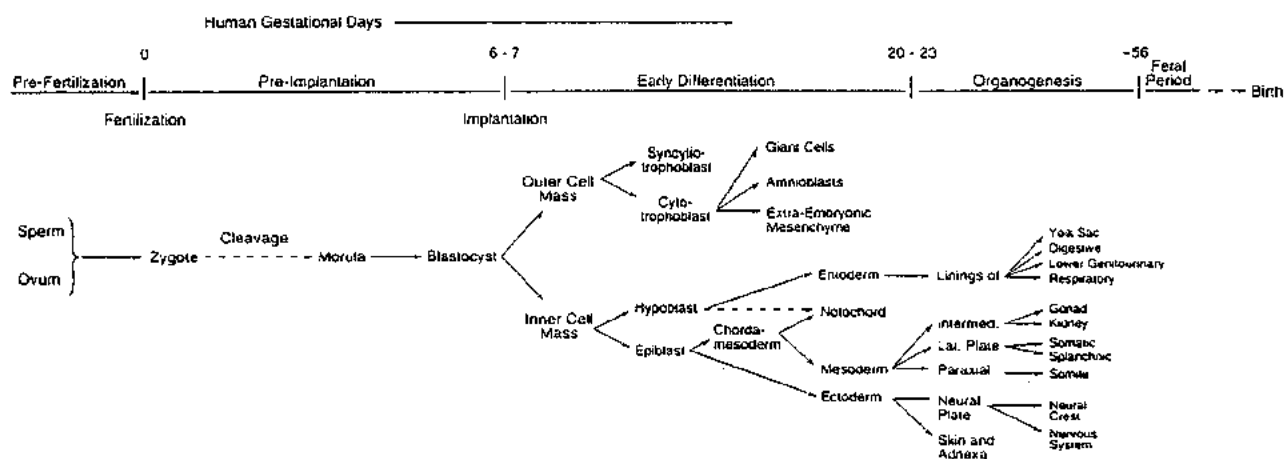


図2 ヒトの初期発生での器官形成

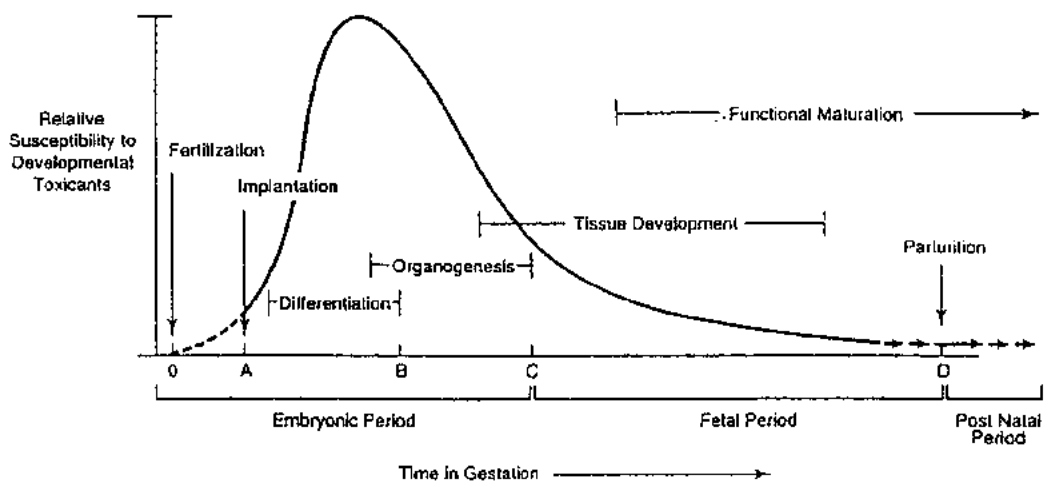


図3 発達毒性の感受性時期

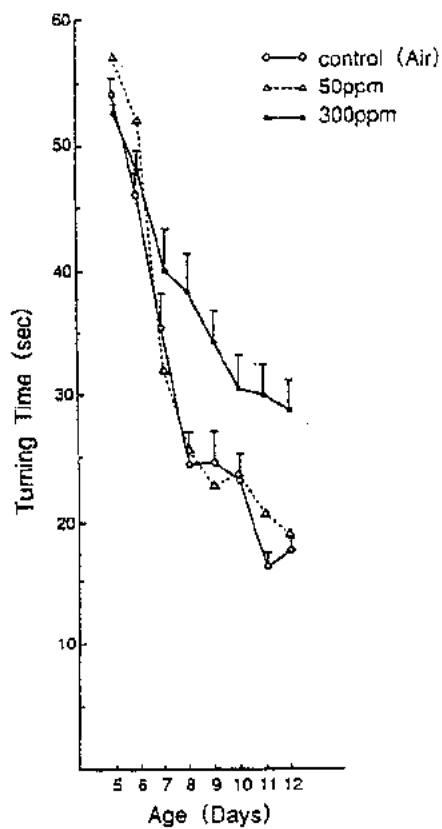


図4 出生5-12日目の仔の平均ビボッティング時間

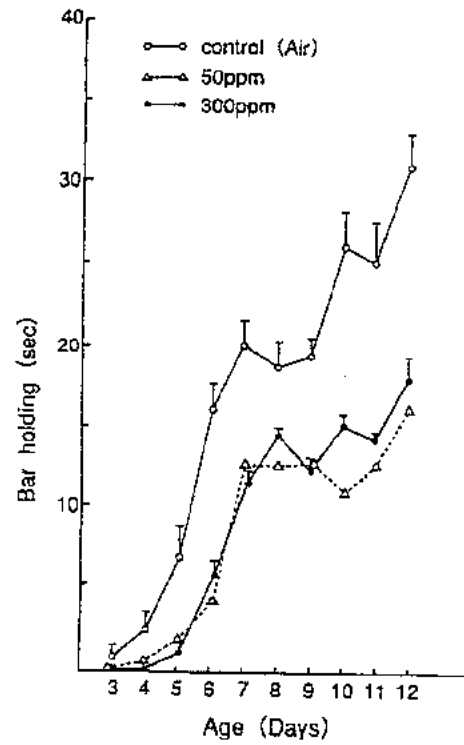


図5 出生3-12日目の仔の平均棒把握時間

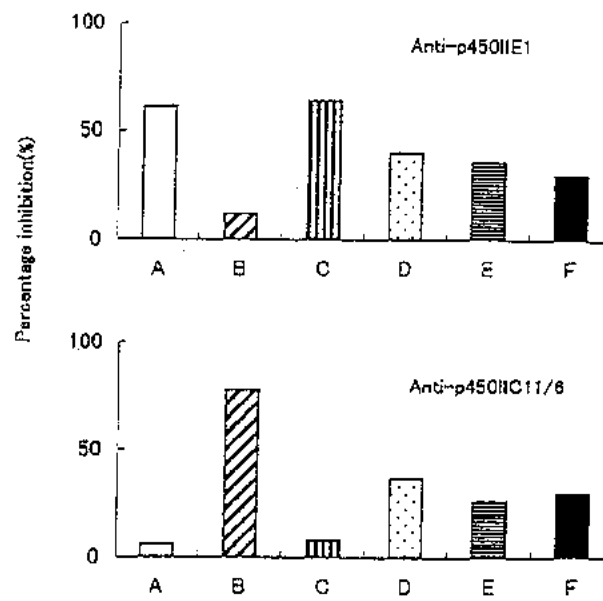


図6 モノクローナル抗体によるトルエン代謝活性阻害

6. 魚類の生殖と性ステロイドホルモン

(内分泌攪乱化学物質の生殖への影響を解析する研究モデル)

岡崎国立共同研究機構・基礎生物学研究所・長濱嘉孝

I. はじめに

内分泌攪乱物質（環境ホルモン）は、ヒトを含むいろいろな動物の生体内の正常なホルモン作用を攪乱する物質であり、生殖系、免疫系、脳神経に影響を与えることが指摘されている。なかでも心配されているのが生殖への影響であり、ヒトでも男性における精子数の減少、女性における子宮内膜症の増加などが内分泌攪乱物質によるものではないかと考えられている。野生動物に関しても、鳥類にみられる生殖行動の異常、雄ワニでのペニスの矮小化、コイにおける雌雄同体化、巻貝でのインボセックス等、影響を受けていると考えられる生物種も広範に及んでいる。したがって、内分泌攪乱化学物質のスクリーニングが緊急に必要であり、そのための効果的な方法論の確立が各方面から強く期待されている。一方で、内分泌攪乱化学物質がヒトや野生動物に対して与える影響、さらにはその仕組みについても明らかにすることが大切なことである。しかし、野生動物は言うに及ばず最も研究が多くなされているヒトにおいてさえも、この問題を解決するために活用できる基礎的知見はきわめて少ないというのが現状である。内分泌攪乱化学物質の影響を明らかにするためには、まず「何が正常か」を知る必要があることは言うまでもないことである。

ここでは魚類を取り上げる。この生物群では、内分泌攪乱化学物質の影響を調べた先駆的な報告がイギリスやアメリカでなされてきたが、日本でも多摩川において見出された雌雄異体のコイを始めとして、いろいろな例が報告されている。また、最近にみつかったスウェーデンの例では、産業廃棄物処理場の近くに位置するある湖に生息するPerchの約70%に生殖腺を持たない個体が出現したとの報告もさなれており、その影響は益々深刻となってきている。魚類の生殖系にみられるこのような異常の原因としてある種の内分泌攪乱化学物質が疑われているが、スウェーデンの例を含め本当のところは皆目明らかにされてはいない。これは生殖現象が複雑で、いろいろな内因的、外因的要因が絡んでいるからであり、ある生殖系の異常を見て、直ぐにその発生原因を指摘することは困難なのである。内分泌攪乱化学物質の問題で忘れてならないことの一つは、その効果（影響）が生物の個体発生時期の違いで大きく異なることである。影響が不可逆的であったり、可逆的であったり、また影響濃度も異なるのである。

我々の研究室ではこれまで、サケ科魚類、ウナギ、ティラピア、メダカ、キンギョ、さらには性転換魚のオキナワベニハゼ、ハワイ産ベラなどを実験材料として、魚類の生殖、特に生殖腺の機能の調節に果たす性ステロイドホルモンの役割に関して分子、細胞レベルの研究を行ってきた。ここでは、これらの研究のうちで特に内分泌攪乱化学物質

の研究に有益な基礎的知見を提供すると考えられる研究成果について概説する。さらに、これらの知見から考えて内分泌攪乱化学物質の影響について直ぐに調べてみる必要があると思われる実験（特に、内分泌攪乱化学物質の性分化機構への影響）をいくつか挙げてみる。これらは内分泌攪乱化学物質の作用機構を明らかにするためのごく初歩的なスクリーニング実験と考えられるものであり、これらの予備的実験から得られる結果をもとに、次年度以降にはさらに本格的な細胞、分子レベルの研究プランを構築し、実行できるものと確信している。

Ⅱ．性決定と生殖腺の性分化

魚類でも多くの種で性は性染色体の組み合わせで決定され则认为られている。哺乳類と同様に XX は雌、XY は雄である。ヒトで発見された性決定遺伝子（精巢決定遺伝子）は、魚類を含む哺乳類以外の生物ではまだ見つかっていない。しかし、魚類でも性決定遺伝子の作用にしたがって生殖腺の性分化が起こると认为されているが、この遺伝子の下流に性ステロイドホルモンが重要な役割を果たすことがティラピアを用いた我々の最近の研究から明らかになってきた。我々が生殖腺の性分化の研究にティラピアを用いるのにはいくつか理由がある。性分化の研究では孵化した直後の個体が実験の対象となるので性ホルモン量などを測定するのはきわめて困難であり、したがって性ステロイドホルモンを産生する細胞を電子顕微鏡で観察するか、後述するステロイドホルモン代謝酵素の cDNA を用いた *in situ* hybridization、あるいはそれらの特異的抗体を用いた免疫細胞化学により性ステロイドホルモンの局在、産生量を推測する確かな方法が不可欠となる。ティラピアではこのステロイドホルモン産生細胞が非常に大きいので、生殖細胞や他の体細胞と明確に区別できる。この特徴は性分化における性ステロイドホルモンの役割を調べるには非常に有益である。また、後述するように遺伝的に全雌、全雄が作出されており、性決定・分化の研究には格好な材料となる。さらに、産卵周期は約 2 週間であるが、生殖孔の第二性徴の発達、生殖行動などにより卵成熟・排卵日を前日には正確に知ることができるので、生殖周期のホルモン制御機構の解析もし易い。人工授精が容易であり、胚は遠心管（80 ml）の中でエアレーションを施すことで孵化まで育てることができる（通常、この魚では雌が胚を口中で育てる）。また、飼育が容易で上手に育てると孵化後 3 - 4 ヶ月で次世代を得ることができる。

生殖腺の性分化が起こる前に性ホルモン処理することにより性転換を起こすことができる

未分化生殖腺を性ステロイドホルモン処理することにより、遺伝的性を転換させることができる。しかし、このホルモン処理は孵化後の短期間のみに限られる。

〈実験〉： 内分泌攪乱化学物質が性ステロイドホルモンと同様に孵化直後の未分化生殖腺に作用して性転換を起こさせることができるか？

ティラピアでは全雌、全雄個体が得られる

ティラピアではY Yの超雄個体が得られており、この個体と通常のX X雌個体を交配することにより全雌個体群を得ることができる。

〈実験〉： 全雌、全雄を用いることにより、性ステロイドホルモンや種々の内分泌攪乱化学物質の生殖腺や脳の性分化の影響をより正確に解析する。

生殖腺の性分化は孵化後23-25日に起こる

ティラピアでは卵巢と精巢への生殖腺の性分化は形態的には孵化後23-25日に起こる。この生殖腺の性分化は卵巢腔と輸精管の形成の開始によって明らかとなる。

性的未分化生殖腺を試験管内で培養して卵巢をつくらせる

孵化直後のティラピア未分化生殖腺を体外に取り出し、器官培養することができる。この器官培養系は、試験管の中で性的未分化生殖腺に性分化を起こさせ、卵巢と精巢を形成させることができる唯一の実験系である。

〈実験〉： 全雌、全雄個体の未分化生殖腺を生体外に取り出し、性ステロイドホルモンや内分泌攪乱化学物質の影響を試験管の中で詳しく調べる。このことにより、これらのホルモンや物質の直接的影響を明らかにすることが可能となる。

卵巢の形成にエストロゲンが不可欠である

遺伝的雌個体（X X）での卵巢の形成は、生殖腺で生成されるエストロゲンの作用でおこる。遺伝的雌個体に孵化後2週間までに芳香化酵素（テストステロンとエストロゲンに転換させる酵素）阻害剤（フェドロゾール等）を処理することによりエストロゲンの合成を阻害すると卵巢は形成されずに精巢が形成される。しかし、この阻害剤の処理が性分化期やそれ以後になされた場合には効果がみられず、したがって性転換は起こらない。この実験結果からも、ティラピアでは孵化後20日頃までは生殖腺は卵巢にも精巢にも性分化できることが明らかである。一方、それ以後は性ステロイドホルモンに反応して性転換を起こすことはできない。

〈実験〉： 生殖腺の性分化が起こる孵化20以降に性ステロイドホルモンを処理しても性転換が起こらないのは何故か？

遺伝的雄個体（XY）での精巢の形成は、生殖腺でエストロゲンが生成されないことにより自動的に起こる？

エストロゲン受容体（ α 型、 β 型）遺伝子は遺伝的雌の未分化生殖腺ですでに発現している。

〈実験〉： 内分泌攪乱化学物質はこれらの受容体に結合するのか？ α 型、 β 型に対しての結合特性は同じなのか、あるいは異なるのか？ 性的未分化生殖腺の器官培養系にエストロゲンを添加し、これにより新しく発現してくる遺伝子をcDNAサブトラクション法により単離し、全塩基配列を決定する。さらに、In situ hybridizationにより当該遺伝子の発現細胞を決定する。

Vasa遺伝子は生殖細胞のみに発現する

始原生殖細胞（卵原細胞や精原細胞のもととなる細胞）は生殖腺原基に移行するのはティラピアでは孵化後3日である。この時の始原生殖細胞ですでにVasa遺伝子が発現しており、その発現は他のすべての体細胞ではみられない。即ち、Vasa遺伝子は生殖細胞のみで発現している。このVasaタンパク質を魚類の種を越えて検出することができる特異抗体を世界に先駆け作成することに成功した。

〈実験〉： 内分泌攪乱化学物質等で処理した親から産まれた胚や稚魚の始原生殖細胞の移動パターンやVasa抗体に対する反応を調べることにより、親に与えられた種々物質の影響が次世代、あるいは次次世代の生殖細胞に与える影響を解析することができる。また、同様な解析を汚染されている河川で生息する魚類の始原生殖細胞について実施することにより内分泌攪乱化学物質が始原生殖細胞に与える影響を調べることができる。

Vasa遺伝子を視覚化する

GFPで標識したVasa遺伝子をメダカ受精卵に微小注射により遺伝子導入することにより、生きたまま胚体における移動中の始原生殖細胞や稚魚や成体での生殖腺中の生殖細胞を外から観察するトランスジェニック系の作出に成功した。

〈実験〉： Vasa遺伝子をGFPで標識したトランスジェニックメダカを性ステロイドホルモンや種々の内分泌攪乱化学物質を含む飼育水で育て、正常魚と処理個体群との間の始原生殖細胞の移動や生殖細胞の分化、発生、成長、成熟の状態を比較する。このような実験から、内分泌攪乱化学物質のVasa遺伝子の発現に対する影響を明らかにすることができるばかりでなく、これらの物質が始原生殖細胞や生殖細胞（卵原細胞、卵母細胞、卵、精原細胞、精母細胞、精細胞、精子）に与える影響を同一個体で経時的に詳しく解析することができる。

性ステロイドホルモン代謝酵素の発現は性特異的である

エストロゲンの合成に必要な芳香化酵素を含むすべての性ステロイドホルモン代謝酵素遺伝子、タンパク質の発現が、卵巣の形成の10日以上も前に遺伝的雌個体の未分化生殖腺で発現している。一方、遺伝的雄では精巣が形成されて後にアンドロゲン生成が活発となる。

Ⅲ. 配偶子形成

生殖腺の中で生殖原細胞（卵原細胞、精原細胞）から配偶子（卵、精子）がつくられる過程を配偶子形成と呼ぶ。脊椎動物における配偶子形成の制御には、生殖腺刺激ホルモン（gonadotropin、GTH）（下垂体）-性ステロイドホルモン（生殖腺）系が重要な役割を果たす。哺乳類から魚類まで、2種類のGTH（濾胞刺激ホルモン、FSH；黄体形成ホルモン、LH）が下垂体から分泌され、配偶子形成ばかりではなく、種々の生殖活動を制御する。しかし多くの場合、このGTHは生殖細胞に直接的に働くのではなく、生殖腺にある体細胞に作用する。この結果、体細胞でつくられる性ステロイドホルモン（アンドロゲン、エストロゲン、プロゲステロン）が直接的、間接的に配偶子形成のいろいろな過程を制御する。

脊椎動物でこれまでに報告されている生殖系への内分泌攪乱化学物質の影響はこの配偶子形成の過程に悪影響を与える例が多い。また、内分泌攪乱化学物質の作用が性ステロイドホルモン、特にエストロゲン、との関連で問題にされる。したがって、内分泌攪乱化学物質の影響を調べるにあたりまず必要となるのは、正常な個体での性ステロイドホルモンによる配偶子形成の制御機構に関する細胞、分子、遺伝子での詳しい情報である。しかし、脊椎動物における配偶子形成のホルモン制御機構が分子、遺伝子レベルで詳しく調べられている生物種はきわめて少なく、一部の実験モデル動物についての研究に限定される。したがって、ある生物種の生殖系への内分泌攪乱化学物質の影響を解析するためには、このところから調査、研究を開始する必要がある。

我々はこの十年余りの間、主に魚類を材料にして配偶子形成のホルモン制御機構を細胞、分子レベルで詳しく研究してきた。特に、配偶子形成のそれぞれの過程を制御する性ステロイドホルモンを単離し、生化学的に同定するとともに、それらステロイドの生殖腺体細胞での生成の機構、生殖細胞での作用の機構を分子、遺伝子レベルで研究してきた。ここでは、精子形成、精子成熟、卵形成、および卵成熟の機構に絞り、我々の魚類を用いた研究成果を項目ごとに要点のみ記述するとともに、それらを基盤として考えられる実験プランについても触れる。

1. 精子形成

脊椎動物の精子形成は生殖腺の中で精原細胞が体細胞群（主にセルトリ細胞やライディ

ッヒ細胞)の助けをかりながら、精母細胞、精細胞を経て精子に分化する過程である。精原細胞より精子ができるまでの期間は、マウスでは約35日、ヒトでは約64日である。精原細胞は分化段階の違いによりいくつかに分けられる。哺乳類では、A型精原細胞、B型精原細胞が区別され、AとBの中間型が存在する種もある。A型精原細胞は分裂して、一部はA型として残り(幹細胞)、他方はB型精原細胞となる。一般にB型精原細胞はA型精原細胞よりやや小型で、その数も多い。このB型精原細胞はすべて分裂して第一次精母細胞となる。第一次精母細胞へ分化する前の精原細胞での分裂回数は種によって決まっており、イモリでは7回、ウナギでは10回とされる。精細胞までの精子形成過程では、ほぼ通常の細胞の形態を保っているが、精細胞から精子になるところで、著しい形態の変化が起こる。この過程は、とくに精子変態と呼ばれている。哺乳類の精子形成は精細管の中で進行する。一方、魚類や両生類では1個の精原細胞から生じた精母細胞、精細胞、精子が、1個のシストと呼ばれる袋状の構造に包まれている。

ウナギの精巣は脊椎動物における精子形成の研究の優れたモデルになる

養殖ウナギ雄の精巣にみられる生殖細胞はA型精原細胞のみである。また、体細胞(ライディッシュ細胞、セルトリ細胞)も不活性である。養殖ウナギ雄の生殖腺が未成熟な状態にあるのは、下垂体に生殖腺刺激ホルモン産生細胞がきわめて少なく、生殖腺刺激ホルモンが分泌されていないためである。このような状態にある養殖ウナギ雄にヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(HCG)を一回腹腔内注射することで3週間以内に精巣に精子が見られるようになる。したがって、HCGはA型精原細胞をB型精原細胞、第1精母細胞、第2精母細胞、精細胞を経て精子まで精子形成過程のすべてを誘起させることができる。

試験管の中での精子形成のすべての過程が誘導できる

養殖ウナギの精巣片(1mm)を取り出し、無血清培地で器官培養すると少なくとも一ヶ月間は正常な状態で維持することができ、この期間はA型精原細胞のままで維持される。この器官培養系にHCGを添加すると、個体に注射した場合と同様に約3週間で精子が出現する。以下に述べる11-ケトテストステロンの場合と共に、上記のHCGを用いた実験はA型精原細胞から精子までの精子形成の全過程を試験管の中で起こさせた世界で最初の例である。

ウナギの精子形成誘起ホルモンは11-ケトテストステロンである

HCGの精子形成誘起作用は直接ではなく、精巣での性ステロイドホルモンの合成を介すると考えられたので、精巣をHCGとともに器官培養することで培養液中に放出された性ステロイドホルモンを薄相クロマトグラフィーや高速液体クロマトグラフィー(HPLC)などの生化学的手法により20の分画に集めた。次に、これら20の分画のそれぞれを別々に精巣の器官培養系に添加し、精原細胞の体細胞分裂の誘起能を指標

にして精子形成誘起ホルモンの単離・同定を行った。その結果、これらの分画のうちの一分画のみが精原細胞に体細胞分裂を起こさせる活性をもっていた。この分画に含まれる性ステロイドホルモンが 11-ケトテストステロンであることを質量分析計、HPLC などにより決定した。これらの結果より、ウナギの精子形成誘起ホルモンは 11-ケトテストステロンと同定されたが、これは動物界で精子形成誘起ホルモンが単離・同定された最初である。

11-ケトテストステロンは試験管の中の精巣にも精子をつくらせる

11-ケトテストステロンをHCGを含まない器官培養系に添加し、その中でA型精原細胞のみをもつ精巣片を約3週間培養すると精子が観察されるようになる。このことから、11-ケトテストステロンは単独で精原細胞に働いて体細胞分裂を起こさせ、精母細胞、精細胞を経て精子まで分化させる作用をもつことがわかる。

HCG投与により 11-ケトテストステロンの生成が急激に高まる

養殖ウナギにHCGを一回注射すると直ぐに精巣で 11-ケトテストステロンが生成され、注射後6時間までに血中の 11-ケトテストステロン量が急激に上昇を始める。この時でもテストステロンの血中量は低いままである。この時HCGはライディッチ細胞の膜受容体に結合して後、細胞内のサイクリックAMP量を介して11 β -水酸化酵素や11 β -水酸基脱水素酵素（テストステロンを 11-ケトテストステロンに転換する酵素）遺伝子に働きかけ、それらの転写活性を促進し、さらには翻訳活性をも増加させることにより 11-ケトテストステロンの生産を急激に高める。

11-ケトテストステロンはセルトリ細胞に働く

生殖腺刺激ホルモンの働きのもとにライディッチ細胞でつくられた 11-ケトテストステロンは直接的には精原細胞には働かない。このことはA型精原細胞のみを取り出し 11-ケトテストステロンとともに細胞培養しても精子形成が起こらないことから明らかになった。そこでHCGや 11-ケトテストステロンを働かせた精巣で新規に発現してくる遺伝子を cDNA subtraction 法を用いて単離し、それがアクチビン β B サブユニットであることを始めて示した。さらに、in situ hybridization 法を用いてこの遺伝子が発現する細胞は精巣の精細管の中にある体細胞のセルトリ細胞であることが判明した。したがって、生殖腺刺激ホルモンの働きでライディッチ細胞でつくられた 11-ケトテストステロンはセルトリ細胞に働いてアクチビン β B サブユニット遺伝子の転写を促進し、その発現を上昇させるわけである。

2種類の 11-ケトテストステロン受容体がセルトリ細胞で発現している

11-ケトテストステロンが作用するセルトリ細胞には 11-ケトテストステロン受容体が局在する筈である。そこでウナギの精巣から 11-ケトテストステロン受容体遺伝子を

クローニングすることを試み、ごく最近2種類の11-ケトテストステロン遺伝子を単離し、それらの全塩基配列を決定した。これら2種類の11-ケトテストステロン受容体のアミノ酸配列はDNA結合配列とリガンド結合配列とで高い類似性を示したが、他のドメインでの配列の類似性はきわめて低い。しかし、これらのcDNAを哺乳類のCOS細胞に発現させ、種々のリガンドを用いて転写活性を調べたが両者の間で顕著な違いは認められなかった。これら11-ケトテストステロン受容体の局在細胞セルトリ細胞であることはin situ hybridizationで確認された。

〔実験〕：アクチビンβB サブユニット遺伝子の5'上流域に11-ケトテストステロン受容体が結合する配列の存在を調べる。

11-ケトテストステロンはセルトリ細胞に働いてアクチビンBをつくらせる

セルトリ細胞で11-ケトテストステロンの働きでアクチビンβB サブユニット遺伝子の発現が急激に上昇することがわかったが、その結果つくられる物質がどのようなものであるかを生物学的検定法を用いて調べた。この検定には、細胞培養条件下で哺乳類のフレンド細胞を赤血球に分化させることを指標とするEDF活性測定法を用いた。その結果、アクチビンβB サブユニット遺伝子の発現によってセルトリ細胞で新しくつくられるタンパク質は成長因子の一種であるアクチビンBであることが明らかになった。

アクチビンBは精原細胞の増殖を促進する

アクチビンBの精子形成誘起作用を調べるために、哺乳類のCHO細胞にウナギのアクチビンβB サブユニット遺伝子を遺伝子導入し、培養液中に分泌されたアクチビンBを多量に集め、フォリスタチンカラムを用いたHPLCにより精製した。精製したウナギのリコンビナント・アクチビンBを器官培養系に添加し、A型精原細胞のみからなる精巣片を培養すると、精原細胞の頻繁な体細胞分裂が誘起されたが減数分裂への移行は観察されず、したがって精原細胞から精母細胞への移行も認められなかった。これらの結果から、HCGや11-ケトテストステロンはそれぞれ単独で精子形成の全過程を誘導させることができるが、一方それらの働きでつくられるアクチビンBは精原細胞の増殖は起こすが、精子形成のそれ以後の過程は誘起しないことがわかる。

〔実験〕：生殖腺刺激ホルモンや11-ケトテストステロンの働きでつくられると考えられる減数分裂誘起物質は何か？

精原細胞のアクチビンB受容体が局在する

上に述べたように、アクチビンBはA型精原細胞に働いて細胞増殖を起こす。したがって、精原細胞にアクチビンB受容体が局在する筈である。そこでウナギの精巣から2種類のアクチビンB受容体遺伝子（アクチビンBI型受容体、アクチビンBII型受容体）

をクローニングした。これらの2種類の受容体遺伝子はA型精原細胞にすでに局在していることが *in situ* hybridization 法により明らかになった。また、アクチビンB受容体に連結する精原細胞内の情報伝達系に関わる遺伝子として *Smad* 遺伝子を単離し、その全塩基配列を決定した。

〔実験〕：アクチビンBの作用機構におけるこれら2種類のアクチビンB受容体の機能を調べる。さらに、細胞内情報伝達因子としての *Smad* 遺伝子の機能についても解析する必要がある。

精原細胞の増殖はCDK/サイクリン複合体の働きで進行する

A型精原細胞での細胞増殖の仕組みについての解析を行うために、まずウナギの精巣から種々の細胞分裂制御因子遺伝子をクローニングした。単離し全塩基配列を決定した遺伝子は、*cdc2*、*cdk2*、*cdk4*、サイクリンA1、A2、B1、B2、D、E1、E2などである。ホルモンやアクチビンBを処理する前の精原細胞では細胞分裂に関わる遺伝子、タンパク質ともにほとんど発現していない。精原細胞をHCG、11-ケトテストステロン、あるいはアクチビンBのどれかで刺激すると、まず3日以内に *cdk2*、*cdk4*、サイクリンD、E1、E2などの遺伝子やタンパク質が発現し、次いで *cdc2* やサイクリンA2などの遺伝子、タンパク質が発現してくる。したがって、アクチビンBによる刺激がこれら遺伝子の発現、タンパク質への翻訳を制御することによりA型精原細胞の増殖が起こるものと推察される。

〔実験〕：アクチビンBによる細胞分裂関連遺伝子の転写調節機構を調べる必要がある。

サイクリンA1は減数分裂の進行に関与する？

HCGや11-ケトテストステロンで処理してから発現する細胞分裂制御関連因子の中で、注目すべきはサイクリンA1である。サイクリンA1はHCGや11-ケトテストステロン処理後の精巣で減数分裂を開始した精母細胞ではじめて発現する。アクチビンBを処理した精巣では決して発現しない。サイクリンA1が複合体を構成するのは *cdc2* であることも明らかになった。この結果から、精原細胞の減数分裂への移行には *cdc2* / サイクリンA1複合体が重要な役割を果たしているものと推察される。

〔実験〕：サイクリンA1遺伝子の転写制御をさかのぼって解析することにより、減数分裂誘起物質の実体を明らかにできる可能性がある。

2. 精子の成熟

脊椎動物の精子の成熟にアンドロゲンなどの性ステロイドホルモンが関わることで以

前から推察されてきたが詳細な機構は未だ明らかではない。最近、ヒトと含む哺乳類や魚類などで内分泌攪乱化学物質の影響と考えられる精子の受精能や運動能の低下など、精子の成熟過程が何らかの影響で異常となっていると推察される。

我々はサケ科魚類やウナギを用いて精子の運動能の獲得に果たすホルモンの役割、特に生殖腺刺激ホルモンと性ステロイドホルモンについて明らかにしてきたのでその概略について述べる。

17 α ,20 β -DP は精子に運動能を賦与する

サケ科魚類やウナギの精巣中にある精子にはまだ運動能が備わっていない。したがって、精子は卵に到達するための運動能を備えていないわけで、その意味では受精能ももっていないといえる。この精子に運動能を獲得させるためには、精子形成の場合と同様に下垂体から分泌される生殖腺刺激ホルモンが重要な役割を果たす。後述する卵成熟の場合程ではないが、精子の成熟期には下垂体からLH系生殖腺刺激ホルモンが分泌される。しかしこの場合にも、生殖腺刺激ホルモンの作用は直接的ではなく、精巣の体細胞に働いて性ステロイドホルモンの生成を促進することにより精子の成熟を誘起する。この精子の成熟に関わる性ホルモンをサケとウナギの精巣から単離し、17 α ,20 β -ジヒドロキシ-4 プレグネン 3-オン (17 α ,20 β -DP) と同定した。このホルモンはプロゲステロン系のステロイドであり、後述するように多くの魚類の卵成熟誘起ホルモンとしても働く重要なホルモンである。なお、魚類では哺乳類などとは異なり、黄体ホルモン (プロゲステロン) は 17 α ,20 β -DP のための前駆体として卵巣や精巣でつくられるが、分泌され血管を介して生体内を循環することはない。

17 α ,20 β -DP は精子でつくられる

17 α ,20 β -DP は成熟期の精巣でのみ生成される。前駆体の 17 α -ヒドロキシプロゲステロンはライディッヒ細胞でつくられると考えられているが、この前駆体を 17 α ,20 β -DP に転換させるステロイドホルモン代謝酵素である 20 β -水酸基脱水素酵素 (20 β -HSD) は精子膜に局在することが判明している。

17 α ,20 β -DP は輸精管に働く

精子でつくられた 17 α ,20 β -DP は輸精管に働いてのここのpHを7.5から8.5程度まで上昇させる。輸精管に移行した精子は、このpHの上昇が刺激となって細胞内のサイクリックAMP量が約2-3倍程高くなる。このことで精子は運動能を獲得するのである。

3. 卵形成

哺乳類とは異なり、それ以外の脊椎動物では卵形成は卵細胞質での卵黄の蓄積によって特徴付けられる。脊椎動物では卵黄の前駆体となるビテロゲニンは肝臓でエストロゲン

の作用のもとに合成される。内分泌攪乱化学物質の良く知られた作用機構の一つがエストロゲン受容体を介したものである。この卵黄形成の過程に内分泌攪乱化学物質が影響を及ぼす可能性は高い。実際に雌や雄の血中のビテロゲニン量を測定することで内分泌攪乱化学物質のスクリーニングを行う方法が開発されている。

卵生脊椎動物でエストロゲンは肝臓に働いて卵黄前駆体の合成を促進する

哺乳類以外の全ての脊椎動物において、卵に卵黄を蓄積させるホルモンは、生殖腺刺激ホルモンの働きで卵胞（1つの卵とそれを取り囲む2層の体細胞層、莢膜細胞層と顆粒膜細胞層）でつくられるエストロゲン（エストラジオール- 17β ）である。哺乳類と魚類（サケ科魚類）の卵胞におけるエストラジオール- 17β の生成は莢膜細胞と顆粒膜細胞との相互作用で起こる。LHは莢膜細胞に働いて前駆体のテストステロンの合成を促進し、またFSHは顆粒膜細胞に働いて芳香化酵素（テストステロンをエストラジオール- 17β に転換するステロイドホルモン代謝酵素）遺伝子の発現を促進し、莢膜細胞から送られてきたテストステロンをエストラジオール- 17β に転換させる（2生殖腺刺激ホルモン・2細胞型モデル）。

SF1は芳香化酵素遺伝子の重要な転写制御因子である

芳香化酵素（P450arom）はアンドロゲンをエストロゲンに転換させる重要な酵素である。我々はゲルシフトアッセイ法等の分子生物学的手法を用いてこの酵素遺伝子の発現を制御する転写制御因子としてSF1（Ad4BP）を同定した。P450arom遺伝子の5'上流域にはSF1結合配列が二つ存在し、これらの配列にSF1が結合することによりP450arom遺伝子発現の約70%が制御されていると考えられる（現在、引き続き残りの約30%のP450arom遺伝子の発現を制御する転写制御機構を調べている）。卵形成期の卵胞におけるSF1遺伝子の発現パターンはP450arom遺伝子の発現パターンと酷似しており、このことからSF1がこの酵素遺伝子の発現を制御していることがわかる。

P450aromの遺伝子、タンパク質、活性ともに卵形成期の終期の卵胞で急激に減少する。ごく最近のティラピア卵胞を用いて行った研究により、P450arom遺伝子の発現低下に密接に関係するSF1遺伝子発現の減少が生殖腺刺激ホルモン（LH系）により誘起されることがはじめて明らかにされた。これはSF1の活性が生殖腺刺激ホルモンにより転写レベルで制御されることを示した脊椎動物で最初の例と考えられる。

FSH/FSH受容体は卵形成に、LH/LH受容体は卵成熟に関わる

2種類（LHとFSH）の生殖腺刺激ホルモン受容体をアマゴとティラピアの卵巣からクローニングし、それらの全塩基配列を決定した。このうちFSH受容体遺伝子は卵形成期の卵胞で強く発現しており、卵成熟期には減少する。しかし、排卵後に卵巣から

卵が排出された後には再び遺伝子の発現が急激に上昇する。一方、LH受容体遺伝子の発現は卵形成期に低く、卵成熟期に急激に上昇する。これらの結果は、FSH/FSH受容体は卵形成（卵黄形成）に、またLH/LH受容体は卵成熟の制御に関わることを示している。

エストロゲンは肝臓に働いてエストロゲン受容体を介してビテロゲニン遺伝子の転写を促進する

エストロゲンは肝臓に働いてエストロゲン受容体を介してビテロゲニン遺伝子の発現を調節する。ティラピアの肝臓には2種類のエストロゲン受容体（ α 型と β 型）がいずれも発現しているが、エストロゲンの投与により発現が高まるのは α 型の方である。

4. 卵成熟

卵巣にはいろいろな発達段階の卵母細胞が存在するが、そのほとんどは第1減数分裂前期の状態にあり、染色体はまだ $2n$ の状態で、勿論受精能はない。産卵期になると、ホルモン刺激で減数分裂が再開され、第1極体の放出を経て、第2減数分裂中期に達してはじめて卵は受精可能となる。卵成熟とは、このように第1減数分裂前期の未成熟卵がホルモン刺激を受けて受精可能になることをいう。このように卵成熟は卵を受精可能にさせる生物の生殖にとって非常に重要な過程であるにもかかわらず、卵成熟のホルモン制御機構についての研究はそれ程多くはない。したがって、以下に述べる我々が行ってきた魚類を用いての研究がこの分野ではもっとも進んでいるといえる。そのようなわけで、卵成熟における内分泌攪乱化学物質の影響はこれまでまったく調べられていないのである。

脊椎動物における卵成熟誘起の共通の引き金は、下垂体から一過性に多量に分泌されるLH系GTH（魚類ではGTH-II）である。しかし、いずれの生物種でもLHは直接に卵母細胞に作用するのではなく、それを取り囲んで存在する濾胞組織での卵成熟誘起ホルモン（maturation-inducing hormone, MIH）の働きを介すると考えられている。この卵成熟誘起ホルモンが脊椎動物で単離、同定されているのは魚類が唯一である。

魚類の卵成熟誘起ホルモンは $17\alpha,20\beta$ -DP

我々は卵成熟期のアマゴ（サケ科魚類）の卵胞から濾胞組織を大量に取り出し、それらをサケの生殖腺刺激ホルモンとともに培養して集めた培養液から生化学的手法により卵成熟誘起ホルモンを脊椎動物ではじめて単離し、 $17\alpha,20\beta$ -DPと同定した。このようにして $17\alpha,20\beta$ -DP はサケ科魚類の卵成熟誘起ホルモンとして最初に同定されたが、今では多くの魚類の共通した卵成熟誘起ホルモンであると考えられている。

$17\alpha,20\beta$ -DP は莢膜細胞と顆粒膜細胞の相互作用でつくられる

$17\alpha,20\beta$ -DP は卵形成期の卵胞ではつくられなく、成熟期の卵胞でのみLHの働き

でつくられる。LHによる $17\alpha, 20\beta$ -DP の生成にはエストロゲンの場合と同様に莖膜細胞と顆粒膜細胞の2種類の体細胞が関与する(2細胞型モデル)。莖膜細胞で前駆体の 17α ヒドロキシプロゲステロンがつくられて、これが顆粒膜細胞で $17\alpha, 20\beta$ -DP に転換される。顆粒膜細胞に局在して 17α ヒドロキシプロゲステロンを $17\alpha, 20\beta$ -DP に転換させるステロイド代謝酵素は 20β -HSD である。 20β -HSD 遺伝子の発現は卵成熟期のごく限られた時期の卵胞の顆粒膜細胞で起こり、LHによって転写制御を受けている。、卵成熟期の顆粒膜細胞におけるLHによる 20β -HSD 遺伝子の転写制御機構についてゲルシフトアッセイ法などにより解析している。

17 $\alpha, 20\beta$ -DP は新規の膜受容体を介して卵成熟を誘起する

$17\alpha, 20\beta$ -DP はステロイドホルモンでありながら細胞膜上に局在する膜受容体に結合して作用を発揮する。我々はこの数年 $17\alpha, 20\beta$ -DP の膜受容体の化学的実体を明らかにすべくいろいろなアプローチを駆使して研究を進めている。しかし、この膜受容体のリガンド親和性が低いために生化学的に精製することがきわめて困難であり、これまでのところ化学的実体を明らかにすることには成功していない。最近 $17\alpha, 20\beta$ -DP やプロゲステロン(カエルの卵成熟誘起ホルモンと考えられている)などの卵成熟誘起ホルモンばかりではなく、脳細胞などに作用するエストロゲンやグルココーチコイドなどのステロイドホルモンも膜受容体と結合することで作用を発揮することが示唆されており、ゲノム発現を介さないステロイドホルモンの新規の作用機構として国際的に多くの研究者が競って研究している。

卵成熟誘起ホルモンは卵内に卵成熟促進因子(MPF)をつくらせる

$17\alpha, 20\beta$ -DP-膜受容体に連結する卵細胞内情報伝達因子として抑制性Gタンパク質-アデニル酸・シクラーゼ系が新しく同定された。 $17\alpha, 20\beta$ -DP が膜受容体に結合すると抑制性のG-タンパク質/アデニル酸・シクラーゼ系が活性化され、その結果として卵内のサイクリックAMP量が減少し、この刺激が卵成熟のトリガーとなり、卵成熟促進因子(Maturation-promoting factor, MPF)が形成される。

MPFは生物種に普遍的なM期促進因子である

MPFは $17\alpha, 20\beta$ -DP の刺激で新しく卵細胞質内につくられ、卵を成熟させる物質であるが、我々と他の研究グループの研究からMPFはあわせて、すべての体細胞の細胞分裂(体細胞分裂)のG2期からM期への移行を促進する因子でもあることが明らかになり、MPFは細胞周期の調節にとって不可欠な細胞質因子であることが判明した。したがって、最近MPFはMeta phase-promoting factor (MPF)とも呼ばれるようになっている。

卵成熟はサイクリンBの合成から始まる

魚類のMPFはcdc2キナーゼとサイクリンBの複合体である。卵黄形成を完了した未成熟卵ではMPFはまだ形成されてはいなく、卵細胞質中には35kDaのcdc2キナーゼが存在するのみである。一方、サイクリンBに関してはそのmRNAが翻訳可能な状態ですでに未成熟卵の細胞質に存在する。しかし、サイクリンBタンパク質は未成熟卵中には決して認められない。すなわち、卵黄を完了した十分に大型な卵でも、卵成熟誘起ホルモンが作用するまではサイクリンBはそのmRNAからの翻訳が抑制されているためにタンパク質としては存在していないのである。

MPFはcdc2キナーゼの161番目のスレオニンがリン酸化されて活性化される

17 α ,20 β -DPが作用するとサイクリンB mRNAの翻訳が急速にはじまり、そのタンパク質がつくられる。このタンパク質がつくられると未成熟卵中にすでに存在するcdc2キナーゼと直ちに複合体を形成する。この複合体はすでに細胞質中に存在するスレオニンキナーゼ(MO15、サイクリンH)によりcdc2の161番目のスレオニンがリン酸化される。このリン酸化によりcdc2キナーゼのセリンキナーゼ活性が出現し、この作用でサイクリンBの94番目のセリンがリン酸化され、活性型MPFが形成される。

サイクリンBの合成はmRNAのポリアデニレーションにより始まる

17 α ,20 β -DPの刺激でサイクリンB mRNAの翻訳がはじまるが、この過程は17 α ,20 β -DPがサイクリンB mRNAのポリアデニレーションを誘起することによりもたらされることが最近の我々の研究より明らかになった。この時、17 α ,20 β -DPは卵細胞質にすでに存在する未同定のリン酸化酵素を活性化し、この酵素の作用でリン酸化されるCytoplasmic polyadenylation element (CPE)がサイクリンB mRNAのCPE配列に結合することによりサイクリンB mRNAのポリアデニル化が進行し、その結果サイクリンBの翻訳が起こり、タンパク質がつくられる。

5. まとめ

以上述べたように、性ステロイドホルモンは生殖腺の諸々の活動にきわめて重要な役割を果たす。これまで魚類では、卵巣の性分化、精子形成、精子成熟、卵形成、卵成熟を誘起させる性ステロイドホルモンが単離され、同定されてきた。そのほとんどは脊椎動物ではじめて同定されたものである。さらに、それらのステロイド性制御因子が生殖腺刺激ホルモン、LHとFSH、の働きで生殖腺の体細胞で生成される分子機構、さらにはそれらが生殖細胞に作用する機構について、そのほぼ大筋が細胞、分子レベルで明らかにされたといえる。すでに、魚類の性分化や配偶子形成に不可欠であると考えられる100を超える遺伝子が我々の研究室でクローニングされた。これらの遺伝子あるいはタンパク質のうち一つでも内分泌攪乱化学物質の影響を受けると正常な生殖機構が進行なくなると推察され、結果として性の異常、性転換、配偶子形成の異常などが起

こり、長期的には種の減少につながると危惧されるのである。

生物に対する内分泌攪乱化学物質の影響あるいは作用機構を調べる上で重要なことは、個体発生との関連を重要視する必要があることである。生殖腺の構築や配偶子形成は、遺伝子が発生プログラムに沿って正しく発現し、翻訳され、タンパク質がつくられる結果として起こるのである。内分泌攪乱化学物質がこのような遺伝子カスケードのどの段階で作用するのかを一つずつ詳細に調べる必要がある。このためには器官、細胞培養系の解析が不可欠である。また、分子生物学的手法が強力なツールとなることは言うまでもない。トランスジェニック作成技術もすでにティラピア、メダカ、ゼブラフィッシュを含む数種の魚類で確立され、頻繁に利用されている。遺伝子ノックアウトの技術もメダカを用いて日本で精力的に開発が進められている。したがって、魚類は内分泌攪乱化学物質の実験モデルとしてきわめて有益である。特に、前述したティラピアは当該研究を推進するにあたって多くの利点があり、内分泌攪乱化学物質の作用機構を研究するための非常に優れた脊椎動物を代表する実験モデルとなると確信する。これまでに魚類で蓄積されてきた生殖のホルモン制御機構に関する細胞、分子レベルの基礎的知見が、今後の内分泌攪乱化学物質の研究に大きく貢献することが期待される。

7. 内分泌攪乱化学物質等の環境因子の試験動物モデルとしてのメダカ

名古屋大学生物分子応答研究センター

尾里 建二郎

要約

内分泌攪乱化学物質などの環境因子の試験モデルとして用いられている、メダカ、ファットヘッド・ミノー、ゼブラフィッシュの3種を対象に、その有用性について調査を行った。調査は文献、動物学的特性、研究基盤の整備を中心としておこなった。メダカは化学物質だけでなく放射線や発がん物質など、さまざまな環境因子の研究に有効であると評価される。とくに生殖関連の試験には高いポテンシャルをもつ。ただ、これらの研究の多くが国外で行われていることおよび試験法の開発では遅れていることを指摘しておきたい。研究基盤においても今後の整備が必要である。

ファットヘッド・ミノーでは化学物質の標準試験法の開発が最も進んでいる。さまざまな試験法に有効であるが、世代時間が長いことから継代を必要とする実験には難点がある。

ゼブラフィッシュはさまざまな試験法に有効であるが、前二者と比べると環境因子の研究では実績が少ない。熱帯性であることから低温下での試験は不可能である。また成長の過程で性転換が起こることから生殖に関連した試験には向いていない。ただ、ゼブラフィッシュは基礎生物学の分野で突出した実績と強固な研究基盤を有する。

これらの調査結果を踏まえて、メダカにおける試験法の開発、そのための基盤整備および総合的な環境科学の創生について提言を行った。

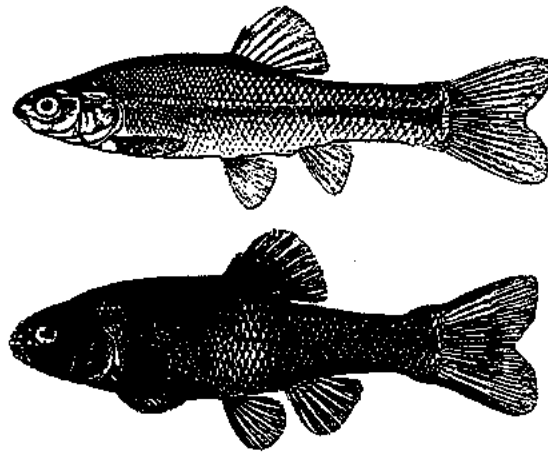
1.はじめに

内分泌攪乱化学物質問題において魚類を用いた研究の必要性が1998年環境庁「外因性内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について一環境ホルモン戦略計画 SPEED '98-」、1998年10月「魚類における試験法に関する OECD 専門家会議」等において述べられている。特に「OECD 専門家会議」は、いくつかの試験法をニジマス、ゼブラフィッシュ、ファットヘッド・ミノー、グッピーなどを用いて確立することを提案している。

しかし、内分泌攪乱化学物質が問題化してから日が浅いこともあって、これら試験法について比較して検討することはほとんど行われていない。

本調査は、これらの魚類のなかで小型実験魚類であるメダカ、ファットヘッド・ミノー、ゼブラフィッシュの内分泌攪乱化学物質などの環境因子の研究における位置づけを 1) 文献、 2) 実験動物としての特性、 3) 研究基盤の整備、なについて行ったものである。さらにわが国では、メダカは自然ばかりでなく社会や文化的な観点から特別の存在であることから、とくに詳しい記載を行った。最後に今回の調査を踏まえていくつかの提言を試みた。

最後に、ファットヘッド・ミノーについてはわが国ではほとんど知られていないので次頁に写真を載せておいた。



Female (top) and male (bottom) fathead minnow, *Pimephales promelas*.
The male is illustrated in breeding condition with rostral tubercles.
Illustrations by Joseph Tomelleri (with permission).

ファットヘッド・ミノー

2. 文献調査

三種の小型魚類を用いた環境因子の影響に関する研究について過去30年間に発表された論文数について調査を行った。用いたデータベースは次の通りである。

メダカ：インターネット Medakafish Homepage

ファットヘッド・ミノー：文献データベース Medline

ゼブラフィッシュ：文献データベース Medline

ここで用いたデータベースについて述べておくと、Medakafish Homepage には100%近い文献が収録されていると思われる。これに対し Medline の文献収録数は70%程度だと思われるので、ファットヘッド・ミノーとゼブラフィッシュの調査に関してはやや少な目の値が出ていることを注意しておきたい。またメダカについては国内と国外にわけて考察した。

1) 総論文数

これは生物学、医学、環境科学などのすべての分野についての論文数である（表1、図1-グラフ1）。

i) メダカ（表1-1）

70年代と80年代は120程度であるが90年代は400に増加している。

ii) ファットヘッド・ミノー (表1-2)

70年代が20、80～90年代が各50～60程度である。

iii) ゼブラフィッシュ (表1-3)

70年代～80年代は30～120程度であるが90年代になって1、200と爆発的に増加していることが注目されている。このゼブラフィッシュの増加は発生学、神経生物学、ゲノム生物学の分野での進展による。

2) 環境因子研究論文数

次に化学物質、発がん物質、放射線などの環境因子についての論文数を調べた (表1、図1-グラフ2)。

i) メダカ (表1-1)

過去30年間の環境因子についての総論文数は180 (全体の28.6%) である。メダカは環境因子の研究に比較的良く用いられてきたことがわかる。70年代～80年代は放射線や発がん物質の研究が多い。90年代は101編で80年代の約2倍に増加しているが、大部分は化学物質の影響に関するものである。

表 1-1 過去 30 年間に於けるメダカを用いた環境因子研究

		環境因子総論文数			化学物質		発がん		放射線	
年代	総論文数	総数	国内	国外	国内	国外	国内	国外	国内	国外
1991-1999	3 9 7	101	24	77	16	65	2	12	6	0
1981-1990	1 1 7	53	33	20	11	3	10	12	15	2
1971-1980	1 1 5	26	22	4	2	4	6	0	14	0
合計	6 2 9	180	79	101	29	72	18	24	35	2

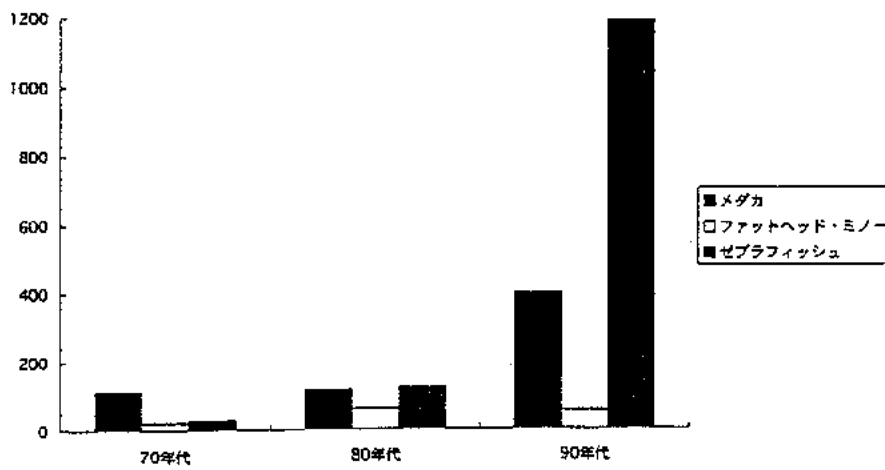
表 1-2 過去 30 年間に於けるファットヘッド・ミノーを用いた環境因子研究

年代	総論文数	環境因子総論文数	化学物質	発がん	放射線
1991-1999	5 4	4 6	4 6	0	0
1981-1990	6 1	4 5	4 1	3	1
1971-1980	2 2	1 4	1 4	0	1
合計	1 3 7	1 0 5	1 0 1	3	2

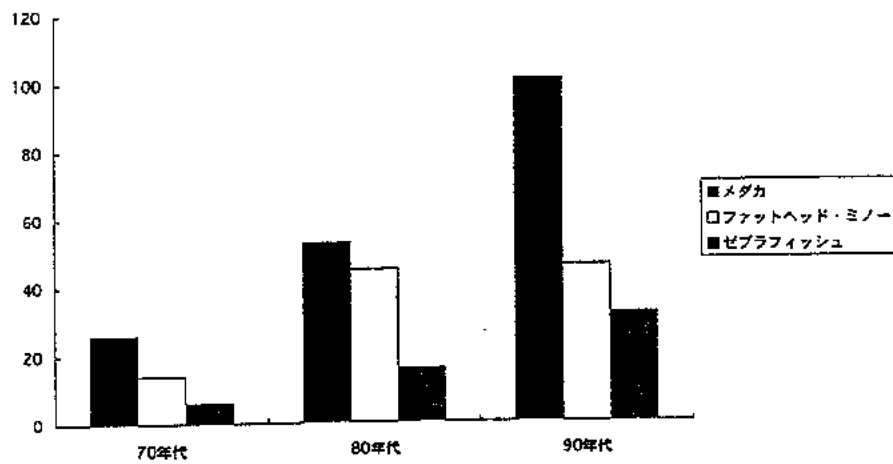
表 1-3 過去 30 年間に於けるゼブラフィッシュを用いた環境因子研究

年代	総論文数	環境因子総論文数	化学物質	発がん	放射線
1991-1999	1 1 8 6	3 2	3 1	0	1
1981-1990	1 2 2	1 6	1 6	0	0
1971-1980	3 0	6	6	0	0
合計	1 3 3 8	5 4	5 3	0	1

グラフ1 総論文数



グラフ2 環境因子総論文数



グラフ3 メダカ環境因子総論文数（国内・国外別）

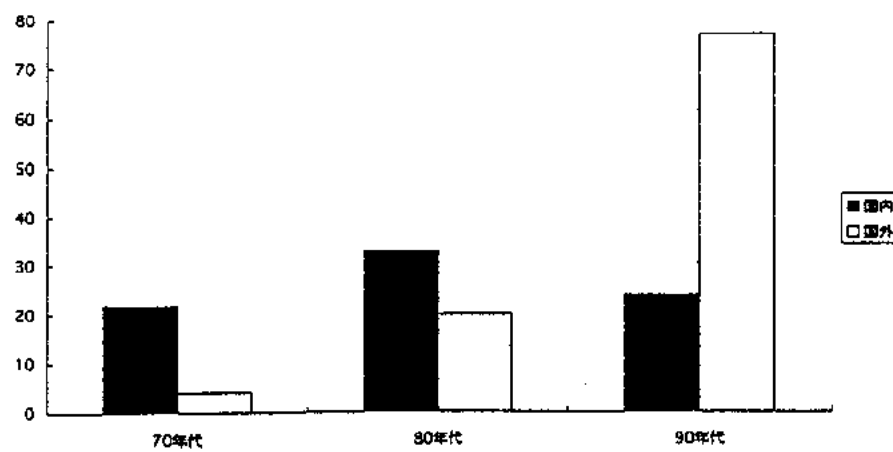


図1. 小型魚類三種についての論文数の調査

ii) ファットヘッド・ミノー (表1-2)

過去30年の環境因子関係の総論文数は105である(全体の76.8%)。その中で、化学物質関係が101と大部分を占める。発がんや放射線関係の論文はほとんどない。このことからファットヘッド・ミノーは専ら化学物質の影響に関する研究に用いられてきたと言える。80年代～90年代は70年代の3倍に増加しており、ファットヘッド・ミノーが環境因子研究の分野で重要な存在になっていることを窺わせる。

iii) ゼブラフィッシュ (表1-3)

過去30年間の環境因子関係の論文数は54(全体の4%)と全体の割合からすれば少ない。ほとんど化学物質関連である。90年代にはそれでも増加が見られる。発がんや放射線に関するものはほとんどない。

iv) メダカ環境因子論文数の国内・国外別の比較

メダカが国際的にどのような位置にあるかを知るために、環境因子論文数を国内における研究によるものと国外における研究によるものとに区別して調べた(表1-3、図-1 グラフ3)。70年代～80年代までは国内のほうが多い。ところが、90年代になると国外の論文数は環境因子総論文数で国内の3倍(国内24:国外77)、化学物質関係では4倍(国内16:国外65)になっている。メダカを用いた研究は国外でのものが圧倒的に多いのである。

3) 掲載雑誌の種類

文献については数の他に掲載雑誌の種類を調べた。

i) メダカ

論文の掲載紙の論文数は次の 61 誌である。他と比べて圧倒的に多い。これはメダカを用いた研究の巾の広さを示すもので、その中には発がんや放射線関係も含まれる。

Aquat Toxicol

Arch Toxicol

Arch Environ Contam Toxicol

Biol Bull

Bull Environ Contam & Toxicol

Bull Nippon Veterinary & Zootechnical College

Cancer Res

Carcinogenesis

Chem Med

Chem Pharmacol Bull

Chemisphre

Comp Biochem Physiol C. Comp Pharmacol

Comp Pharmacol & Toxicol

Dev Comp Immunol

Dis Aquat Organ

Ecotoxicol
 Ecotoxicol Environ
 Ecotoxicol & Environ Safety
 Environ Contam Toxicol
 Environ Health Perspect
 Environ Res
 Environ Toxicol & Chem
 Environ Toxicol & Water Quality
 Eur J Cancer
 Exp Gerontol
 Exp Mol Pathol
 Exp Toxicol Pathol
 Folia Morphol
 Food Chem Toxicol
 In Vivo
 Int J Rad Biol Relat Stud Phys Chem Med
 J Appl Toxicol
 J Comp Pathol
 J Environ Sci (China)
 J. Natl Cancer Inst
 J Rad Res

J Toxicol Environ Health
J Toxicol Sci
Jpn J Cancer Res
Jpn J Exp Med
Jpn J Health & Human Ecology
Jpn J Toxicol & Environ Health
Lab Anim Sci
Laboratorye Zhirotnye
Mut Res
Neurotoxicol
Nippon Eisei Gakkaishi
Photochem Photobiol
Proc Natl Acad Sci
Rad Res
Rev Aquat Sci
Science
Sci Total Environ
Sino Zoologica
Teratology
Toxicol
Toxicol Appl Pharmacol

Toxicol Lett

Toxicol Pathol

Toxicol Sci

Water Res

ii) ファットヘッド・ミノー

論文の掲載誌の数は23誌である。しかし、大多数は3～4誌（*印）に集中している。

*Arch Environ Contam Toxicol

Biomed Environ Sci

Bull Environ Contam & Toxicol

Chem Res Toxicol

*Chemosphere

Comp Biochem Physiol A

Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol

*Ecotoxicol & Environ Safety

*Environ Health Perspect

Environ Res

Fund Appl Toxicol

J Appl Toxicol

J Toxicol Environ Health

J Water Pollut Control Fed

Mut Res

Natl Cancer inst Monogr

Neurotoxicol

Neurotoxicol Teratol

Rad Res

Regul Toxicol Pharmacol

Sci Total Environ

Toxicol Appl Pharmacol

Xenobiotica

iii) ゼブラフィッシュ

論文の掲載誌の数は12誌である。メダカ、ファットヘッド・ミノーと比べると少ないのが目立っている。

Arch Environ Contam Toxicol

Bull Environ Contam & Toxicol

Chemosphre

Ecotoxicol & Environ Safety

Environ Health Perspect

Environ Res

Fundam Appl Toxicol

J Exp Zool

Pharmacol Toxicol

Sci Total Environ

Toxicol Appl Pharmacol

Xenobiotica

4) まとめ

i) 生物学、医学、環境科学などを含む分野での論文の数はゼブラフィッシュが圧倒的である。環境因子関係ではメダカとファットヘッド・ミノーが多い。

ii) メダカは70年代の放射線、80年代の発がん、90年代の化学物質と、その時代の要請に合わせて、広い範囲の環境因子研究に用いられてきた。このことは論文掲載誌の種類の高さからもいえる。この意味でメダカは環境因子研究の実験動物としてはオール・ラウンダーといえる。1990年代のメダカを用いた化学物質環境因子の研究はその8割が国外で行われている。これはわが国における今後の環境因子研究のあり方を考える上で重要となろう。

iii) ファットヘッド・ミノーは専ら化学物質の影響の研究に集中的に用いられてきた。このことは論文の掲載数が3～4誌に集中していることから裏付けられるはずである。ファットヘッド・ミノーは化学物質の環境因子研究の専

用種の鯉がある。米国にはファットヘッド・ミノーについての豊富な研究の蓄積がある。

iv) ゼブラフィッシュは発生、脳神経などの基礎生物学分野で群を抜いている。環境因子についての研究は現在多くはないが、この研究の蓄積は環境因子の研究にも将来大きな力となるはずである。環境因子関連の分野での革新的な手法がゼブラフィッシュから生まれることも充分あり得ると考えられる。

3. 動物学的特性

表2-1はメダカ、ファットヘッド・ミノー、ゼブラフィッシュの動物学的特性についてまとめたものである。ただ、ファットヘッド・ミノーについてはわが国ではほとんど研究されておらず、短期間の調査で資料も充分に入手でなかったもので、いくつかの項目が空欄となっていることを断っておきたい。

1) 成長

体長についてはメダカとゼブラフィッシュは3～4 cmであるので、多数個体を必要とする実験では便利である。ファットヘッド・ミノーは5 cmとやや大きく、動物の維持管理にスペース等の問題があるかも知れない。しかし、この体長の大きさは組織を取り出して分析するなどの研究では有利であろう。

世代時間は遺伝学的研究には短いほうが便利である。メダカとゼブラフィッシュは2～3ヶ月と短く、ファットヘッド・ミノーは4～6ヶ月と長い。環境因子の影響を何世代にも渡って、観察するような実験にはファットヘッド・ミノーはやや不向きである。

寿命は室内の飼育条件下でいずれの魚種も2年程度である。実験のための飼育や系統の保存では、この寿命を考慮して次世代を育成しなければならない。

2) 発生

i) 産卵周期、産卵数、卵の大きさ、卵の透明度、孵化日数などは発生学的研究に適しているかどうかの示標になる。これらの点でメダカ、ファットヘッド・

表 2 - 1 動物学的特性

	メダカ	ゼブラフィッシュ	ファットフェッドミノー
学名	<i>Oryzias latipes</i>	<i>Brachydanio rerio</i>	<i>Pimephales promelas</i>
成長			
体長	3 c m	4 c m	5 c m
世代時間 (性成熟)	2 ～ 3 ヶ月	2 ～ 3 ヶ月	4 ～ 6 ヶ月
寿命	2 年	2 年	2 年
発生			
産卵周期	毎日	週 2 回	週 1 回
産卵数	20 ～ 30/回	200 ～ 300/回	200 ～ 1,000/回
卵の大きさ	1 m m	1 m m	1 m m
卵の透明度	高い	高い	
卵膜の固さ	硬い	柔らかい	
胚操作の容易さ	やや難しい	容易	
孵化日数	7 ～ 1 0 日	2 ～ 3 日	5 日
性決定			
雌雄性	雌雄異体	雌性先熟	
性染色体	XY	不明	不明
室内飼育温度	2 6 C	2 6 C	2 5 C
野外生息温度	0 ～ 4 0 C	2 0 ～ 3 0 C	0 ～ 4 0 C
染色体			
染色体数	4 8	5 0	
ゲノムサイズ	8 0 0 Mb	1600 Mb	
地域集団	あり		

ミノー、ゼブラフィッシュは非常に優れた実験動物であることは明らかである。

メダカでは卵膜が硬いこと、卵黄の流動性が大きいことなどから胚操作にやや困難な点がある。しかし、いずれの魚種も環境因子の胚の発生や成長に対する影響を研究する好適な材料として用いられている。

3) 性決定

i) 雌雄性

魚類の性は雌雄同体から雌雄異体まで多様性に富んでいる。雌雄同体の中には卵巢と精巢が同一個体にあるものや、成長の早い時期に卵巢（雌性先熟）または精巢（雄性先熟）が形成され、後に反対の性に転換するものがある。雌性先熟と雄性先熟の魚種では成長の過程で性転換が自然に起こるのである。雌雄異体では最初に決定された性が変わることは生涯を通じて起こらない。メダカは雌雄異体である。ゼブラフィッシュは雌性先熟と言われている。このようにゼブラフィッシュでは全ての個体で先に卵巢ができて、やがて半数の個体で卵巢が精巢に転換して雄になる。ファットヘッド・ミノーの性決定については資料がないので不明である。内分泌攪乱化学物質の生殖機能への影響の研究では雌雄異体のメダカが適していることは明らかである。ゼブラフィッシュでは自然の条件でも性の動揺が起こるからである。ドイツのある研究者はメダカを実験に用いる理由にこの点をあげている。

ii) 性染色体

メダカでは XY 染色体によって性決定が行われる。この点でメダカはヒトを含む哺乳動物と同じである。これを基礎にしてメダカでは性の決定や分化について豊富な研究が蓄積されてきた。内分泌攪乱化学物質の影響が生殖機能障害として現れるケースでは、メダカが好適な研究材料と考えられている理由の一つはここにある。最近、メダカでは DNA マーカーを用いて Y 染色体が同定できるようになった。ファットヘッド・ミノーやゼブラフィッシュでは性染色体は明らかにされていない。

4) 野外生息温度と室内飼育温度

メダカは日本、ファットヘッド・ミノーは北米が原産地であって、温帯性である。ゼブラフィッシュはインド原産で熱帯性である。メダカとファットヘッド・ミノーは野外では 0℃～40℃の広い温度域で生息している。ゼブラフィッシュは 20℃以下の温度域では生存できない。室内の実験条件下ではいずれも 25～26℃で飼育されている。いずれの魚種でも実験室での環境因子の研究はこの温度条件で行われているが、実験室での結果が野外で生息する動物にどの程度あてはめることができるかの検討が必要であろう。魚類のような変温動物での環境因子の研究には、この点でマウスなどの恒温動物にはない問題が生じる。

5) 染色体

i) 染色体数

メダカは48、ゼブラフィッシュは50である。ファットヘッド・ミノーについての文献が得られなかった。

ii) ゲノムサイズ

メダカは約800Mbで、これはゼブラフィッシュの1/2、ヒトやマウスなど哺乳動物の1/5である。メダカがゲノムプロジェクトには有利であると言われている理由である。個々の遺伝子について見てもメダカの遺伝子はサイズが小さくなっている。

6) 地域集団

メダカでは北日本集団、南日本集団、東韓集団、中国・西韓集団など少なくとも4つの遺伝的に異なる地域集団が知られている。これらは環境因子の影響と地理的変異の関係を研究するのに良い材料である。環境因子に対する感受性は地域集団ごとに異なるかも知れないからである。ゼブラフィッシュ、ファットヘッド・ミノーにこのような地域集団があるかどうかは確かではない。

7) まとめ

i) メダカは発生や成長などにおいて実験動物として優れた特性をもっている。

また、雌雄異体であること、性染色体が明らかであることから、生殖機能の研

究にも絶好の材料である。野生で生息するメダカの研究では生息温度域の広さや地域集団の存在を考慮しなければならない。

ii) ファットヘッド・ミノーは発生や成長については、前二者と同等である。しかし、性成熟までの期間が4～6ヶ月と長く、世代の継続を必要とする遺伝的研究には不利になる。サイズがやや大きいことは、維持、管理に手間がかかる不利はあるが、臓器などを採取するような研究では大きいことが有利となるう。

iii) ゼブラフィッシュは発生や成長について多くの点でメダカと同等である。成長の過程で性転換が起こるので、生殖関係の試験には向いていない。また、生息温度の関係から低温での試験は出来ない。

4. 研究基盤の整備

研究の現状を把握し、将来の展開を見定めるために、研究基盤の整備状況を調査した。その結果、メダカ、ファットヘッド・ミノー、ゼブラフィッシュは研究基盤についてそれぞれ独自のものをもっていることが明らかになった。

1) 系統動物

メダカの系統については巻末に別刷りを添付したので参照していただきたい。

i) 地域集団

前に述べたように、メダカにはいくつかの地域集団があることが知られている。この研究のために日本、韓国、中国の各地から採集されたメダカが約100系統、東京大学と新潟大学で保存されている。これらの系統は地域の在来メダカの環境保全を考えるとときに重要な資料となろう。

ii) 近交系

遺伝的に厳密な研究を行うためには近交系動物が必要である。これは数十代にわたる姉妹交配によって作られる。メダカでは放射線総合医学研究所の田口らによって作られたものが約10系統ある。この中には生殖の研究に用いられる系統もいくつか含まれているが、これについては後に詳しく述べる。ファットヘッド・ミノーやゼブラフィッシュではこのような近交系は作られていない。

表 2-2 研究基盤の整備

	メダカ	ゼブラフィッシュ	ファットヘッド・ミノー
系統動物			
地域野生集団	100 系統		
近交系	10 系統	なし	なし
自然突然変異	100 系統	少数	
人工（誘発）突然変異	50 系統	1,000 系統	
生殖研究用系統	5 系統		
系統保存体制	貧弱・分散的	国際センター建設予定	
培養細胞株	多数	少数	少数
トランスジェニック技術	あり	あり	なし
核移植技術	あり	なし	なし
ゲノム研究			
遺伝子地図	500 マーカー	4000 マーカー	なし
ゲノムプロジェクト	なし	指定種として進行中	なし
性判別DNAマーカー	あり	なし	なし
データベース	あり	あり	
環境因子検査の標準化			
政府・大学によるもの	なし	なし	試験法の標準化
企業によるもの	試験法の標準化	なし	水質検査キット

iii) 自然突然変異系統

町の金魚屋さんで市販されているメダカは、黄～赤色をしている。これはヒメダカと呼ばれ黒色素細胞を欠いている突然変異である。これは江戸時代から観賞用に売られていたと云われる。現在、研究に最も多く利用されているのはこの品種である。脊椎動物におけるメンデルの法則はヒメダカの体色の研究によって初めて確認された。1930年には二つの形態形成突然変異が発見され、その一つは現在も名古屋大学で保存されている。1940年代に名古屋大学の山本は体色の突然変異シロメダカを名古屋近郊で採取した。性の研究で有名な d-rR 系統はヒメダカとシロメダカの交配によって作られたものである。1960～90年代にかけて名古屋大学の富田は約100系統の突然変異を収集した。これらの系統は名古屋大学に保存されている。d-rR や名古屋大学における系統保存については後で述べる。自然突然変異についての報告はファットヘッド・ミノーではほとんど無く、ゼブラフィッシュでは少数あるだけである。

iv) 人工（誘発）突然変異系統

放射線や化学物質によって突然変異を誘発することはショウジョウバエなどで広く行われていた。1990年代の半ばに、ドイツのノーベル賞受賞者ニスライン・ホルハートはショウジョウバエで用いられていた飽和突然変異法をゼブラフィッシュに応用して突然変異を大量に誘発することに成功した。さらにこの手法は欧米の多くの研究室で用いられ、今日ではゼブラフィッシュの突然変異

は 1000 越えると数に達していると言われている。これが 1990 年代にゼブラフィッシュ研究が大きな成功を収めた要因になっている。メダカは放射線総合医学研究所、東京大学などで行われているが、数は 50 系統ほどである。

iv) 生殖研究用系統

メダカには生殖の研究に好適な系統が近交系も含めて開発されている。

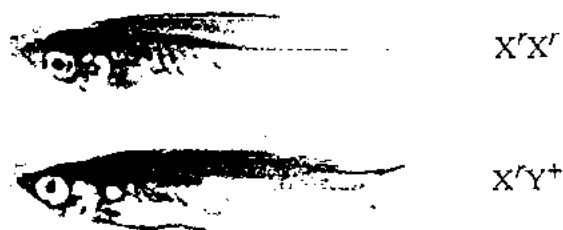
a) d-rR (シロアカメダカまたは Yamamoto 系統)。

この系統は 1950 年に名古屋大学の山本によって二つの自然突然変異シロメダカとヒメダカを交配して開発されたものである。この系統では黄色素細胞の遺伝子 R が Y 染色体の上にある。雄は XY 型で体色が赤く、雌は XX 型で体色が白色であることからシロアカメダカと呼ばれている (図 2)。このようにこの系統では体色によって遺伝的性を知ることが出来る。山本はこの系統を用いて雄性ホルモン (アンドロゲン) 処理による雌から雄への転換、雌性ホルモン (エストロゲン) 処理による雄から雌への転換を誘導し、脊椎動物における性転換を初めて実験的に証明した。それ以来 d-rR 系統は魚類の性の決定、分化、転換などの研究に好んで用いられて来た。魚類を内分泌攪乱化学物質で処理すると雄の精巣の中に卵様構造見られるとか、雌への転換が起こるとかの研究は山本の研究を基礎にしている。d-rR 系統は国外でも知られており、わが国で内分泌攪乱化学物質の問題が表面化する数年前から、ドレスデン大学 (独)、国立農業科学研究所 (仏)、サウスカロライナ医科大学 (米)、UMS 海洋科学

研究所（米）、ハイデルベルグ大学動物学研究所（独）などの欧米の研究室から名古屋大学に分譲依頼が寄せられている。メダカを用いた内分泌攪乱化学物質の生殖機能の障害については欧米の研究室から論文がいくつか発表されているが、いずれも一般に市販されているメダカを用いている。これらのメダカでは遺伝的な性が明らかでないために、結果の信頼性に問題を残している。わが国では住友テクノスが d-rR 系統を用いて内分泌攪乱化学物質の試験法の開発を行っている。ただ、d-rR にもいくつかの問題がある。一つは赤い体色の発現が見られる発生段階が比較的遅いこと、従って遺伝的雌雄の判定もその時点では出来ないことである。また X 染色体と Y 染色体の間の交差率が 0.3%程度あるので、それだけの誤差は見込まねばならないことである。



シロアカメダカ
(d-rR, Yamamoto strain)



突然変異シロメダカ (雌 $X'X'$; 雄 $X'Y'$; 1946年
弥富にて発見) とヒメダカ (雌 X^+X^+ ; 雄 X^+Y^+)
と交配して1953年に系統化される。組換え率 0.3%。
(Yamamoto, T., 1953)

図2. 山本時男と d-rR 系統

(上) 名古屋大学におけるメダカ研究の創始者山本時男、(下) 彼が 1950 年に作った d-rR 系統。遺伝的雌雄を体色で判別できるので (雌は白、雄は赤) シロアカメダカとも呼ばれる。山本はこの系統を性ホルモンで処理することによって、性転換を脊椎動物で初めて実証した。この系統は内分泌攪乱化学物質の実験モデルとして国内外で使用されている。

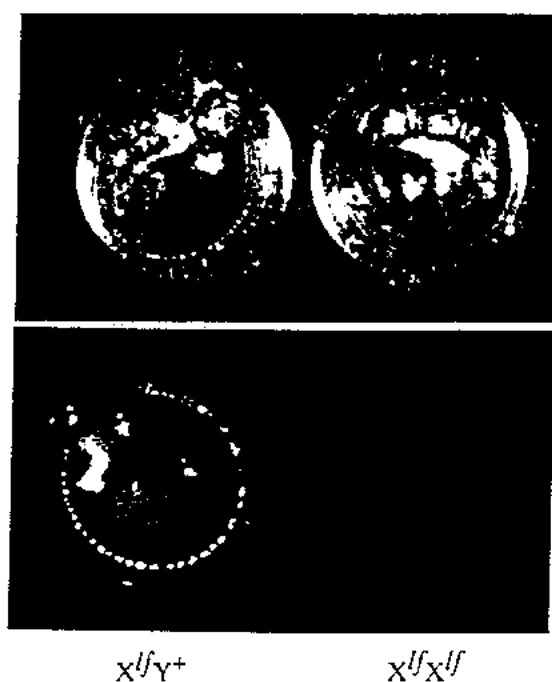
b) FLF と Qurt

魚類の色素細胞の一つに白色素細胞がある。顕微鏡で見ると、この細胞は体表に白い点として散在していることがわかる。この白色素細胞を欠いている突然変異が lf (leucophore free) の名前で名古屋大学に保存されている。FLF はこの lf と野生型を交配して最近名古屋大学で作製されたものである。これと類似の系統は東京大学においても作製され Qurt と命名されている。これらの系統では Y 染色体の上に白色素細胞の遺伝子がある。そのために X Y 型の雄では体表に白色素細胞のスポットが多数見られるが、X X 型の雌ではこのスポットはない。これを利用して雌雄の遺伝的性を判定するのである。FLF という名称は female leucophore free (雌に白色素細胞が無い) からつけられたものである。この系統の利点は、白色素細胞が受精後 3 日の胚の発生段階で見られるので、遺伝的雌雄の判定が発生の早期に可能なことである (図 3)。ただ、これらの系統の欠点は X 染色体と Y 染色体の間の交差率が 3~4% と高いので、この割合で雌雄の判定に誤差が出ることである。FLF 系統は内分泌攪乱化学物質の研究に使用できることが名古屋大学の研究で明らかにされた (図 3)。

c) Hd-rR

d-rR 系統の近交系で、放射線医学総合研究所で開発されたものである。しかし、自然に生息している動物は遺伝的には多様な雑系であるから、環境因子の研究に遺伝的に均一な系統が適しているかどうかは議論のわかれる所である。

FLFメダカ (5日胚)



1997年に生物分子応答研究センターで作られた、
雌に白色素細胞が存在しないことから、FLF
(female leucophore free)と命名された。組換え率3%。

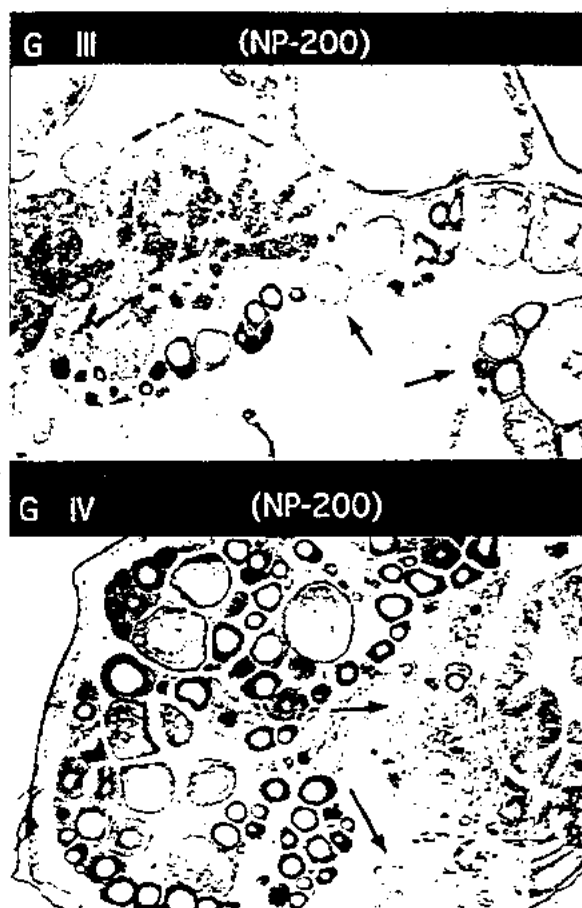


図3. FLF 系統メダカ

名古屋大学生物分子応答研究センター淡水魚類系統保存実験施設で保存されている突然変異の系統を交配して作製された。(左) この系統では3日胚で遺伝的雌雄の判別が出来る。5日胚の可視光(上)および蛍光(下)像。雄(左側)では背中に白色素細胞の白いスポットの列が見えるが、雌では見えない。雄のスポットの列は黄色い蛍光を発する。(右) FLFメダカを用いた内分泌攪乱化学物質の試験。孵化直後から成魚まで p-ノニルフェノール 200 μ g/l を加えた飼育水で処理した。精巣の中に多数の卵様構造が見られる。

研究者によっては出来るだけ自然のものに近い雑系で実験すべきだと云う意見もある。

d) Hd-rR コンジェニック系統

近交系 HNI の雄をベースにしてこれに Hd-rR の雌を繰り返し戻し交配することによって作製されたコンジェニック系統である。新潟大学の酒泉らによって作られた。この系統では Y 染色体上の雄決定因子およびその近傍 (HNI の DNA) 以外はすべて Hd-rR 由来の染色体に置き換えられている。このように Y 染色体上で、雄決定因子とそれ以外のところでは染色体構成に系統差ができる。その差を利用して雄決定遺伝子の探索をしようという研究がわが国において開始されている。

e) 現在開発中の系統

e-1) d-rR-FLF 系統

d-rR と FLF は体色によって遺伝的性を判別できる系統である。しかし、この二つの系統にはそれぞれに長所と短所がある。d-rR では遺伝的性の判別の誤差は少ないが、判別ができる時期が比較的遅い。FLF では遺伝的性の判別は比較的早い段階で出来るが、判別誤差が大きい。現在この二つの系統を利用して、それぞれの長所を兼ね備えた系統の開発が名古屋大学の若松によって行われている。1～2 年以内に開発される予定である。

e-2) シースルー・メダカ (See-through medaka, 透明メダカ) 系統

メダカやゼブラフィッシュでは、胚の時期に体の透明度が高いことから、発生や成長について観察や実験をする時に、体の内部を直接見ることが出来る。しかし、これらの魚種でも成長するに従って体表が多数の色素細胞に覆われるようになるので、透明度は次第に失われていく。そこで名古屋大学の若松は、系統保存されている多数の色素細胞突然変異を利用して、成魚でも比較的透明で内部臓器の観察が可能なメダカを開発している。これは交配を繰り返し行って作製するのであるが、現在最後の段階に入っている。今後、どのような臓器が外部から観察できるのかなどの検討を行っていく予定である。この系統が開発できれば、化学物質の影響を生きたままの成体で体外から直接調べることができる。またトランスジェニック法によって化学物質に反応して発色する遺伝子を組み込むことが出来れば、生きた個体のバイオモニターとして利用することができる。

ファットヘッド・ミノーとゼブラフィッシュには生殖研究用を目的として開発された系統は存在しない。

2) 系統保存体制

動物を用いる実験において系統動物は重要な研究基盤である。メダカについては、地域集団、近交系、突然変異など多数の系統が保存されてきた。地域集団は国内のものが東京大学と新潟大学、東南アジアのものが信州大学、近交系

が放射線総合医学研究所、自然突然変異が名古屋大学で保存されている。詳細は添付した資料を参照していただきたい（巻末添付別刷）。系統保存の一つの例を名古屋大学について述べる。多くの系統が1960年代から富田によって集められたもので、現在までに約30～40年にわたって保存されてきた（図4、巻末1）。1981年淡水魚類系統保存実験施設が名古屋大学に設立され、現在この施設で100系統を保存し、国内外の研究機関に分譲を行っている（巻末2-3）。

しかし、その名古屋大学の施設にしても、大学の通常の一講座が教育・研究の傍ら運営しているのであって制度として保証されているわけではない。系統の保存や分譲の業務は一つの事業であって、教育・研究とは別の性格のものである。このような状況では系統保存は研究者個人の言ってみればボランティア精神に頼りながら辛うじて行われているのである。このことは他の大学や研究所も同じで、予算、人員、施設ともに極めて貧しいことが巻末の資料からうかがえる。このようにメダカの系統保存体制は小規模のものが分散的にあるだけで、研究者の個人的な献身がなくなれば、消滅する運命にある。

ゼブラフィッシュでは約1000 m²の規模の国際系統保存センターがオレゴン大学に2000年夏に完成予定である（巻末4）。設立目的として、1）動物の保存、2）情報センター、3）動物の病気の管理、などが謳われている。このセンターの設立資金はNIH（国立健康研究所）から支出され、オレゴン大学の学長が運営委員会の長になることになっている。規模、資金の出所、運営



図 4. 名古屋大学におけるメダカの系統保存 名古屋大学生物分子応答研究センター淡水魚類系統保存実験施設では 100 系統の自然突然変異を保存している。(上) その多くは 1960 年代に富田英夫により蒐集されたものである(写真は自然 1978 年 8 月号から)。(下) 現在の野外圃場における保存風景。

体制のいずれをとっても本格的な施設を作ろうとする意欲がうかがわれる。フ
アットヘッド・ミノーについては資料が入手できなかった。

3) 培養細胞株

わが国では1980年代にメダカを用いた発がんや放射線の研究、90年代
には、胚幹細胞やキメラ形成などの研究が盛んに行われてきた。これらの研究
を通じてメダカの培養細胞株が多数確立された。これらの細胞株は東京大学、
放射線総合医学研究所、名古屋大学などに保存されている。

4) トランスジェニック魚類

魚類で最初の本格的なトランスジェニック法はメダカで確立されたものであ
る（巻末5）。その後ゼブラフィッシュでも盛んに研究されるようになった。
トランスジェニック法は卵に遺伝子をマイクロインジェクション法によって注
入することの他（図5上）、現在ではエレクトロポレーションやパーティクル・
ガンによる方法も開発されている。図5下に示すものは、メダカのペプチド鎖
伸長因子遺伝子のプロモーター（EF-1 α -A）にクラゲの発光タンパク質遺伝子
（GFP）を結合した遺伝子を導入した系統である。ここでは胚と成魚での発現
を示してあるが、初期胚では全身で、中期胚では頭部で、成魚では外部から見
ると眼のレンズと皮膚に発現がみられる。これを解剖して調べるとほとんど全
ての内臓で発現が見られる。この GFP トランスジェニック・メダカは京都大学
の木下らにより開発されたものである。現在、二系統の GFP（発光）トランス

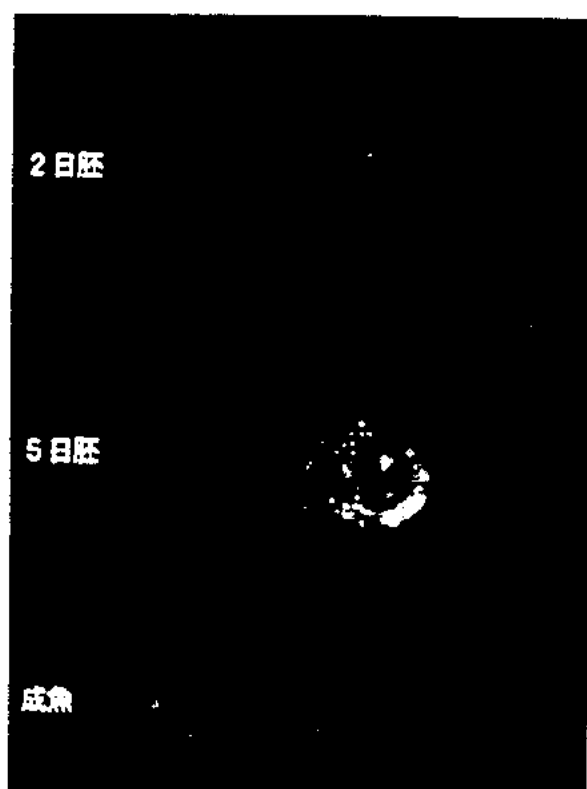
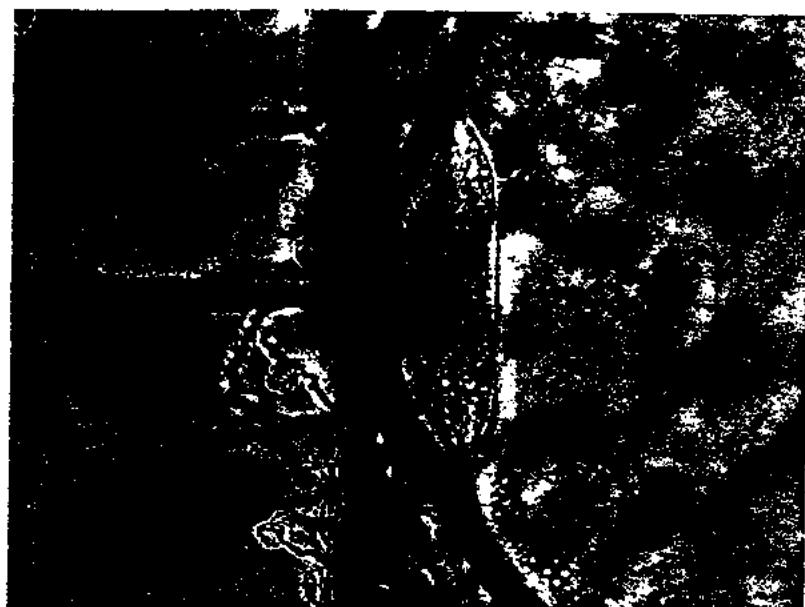


図5. トランスジェニック・メダカの作製

(上) メダカの1細胞期の細胞質にマイクロインジェクションによって遺伝子を注入する。(下) クラゲの緑色発光タンパク質 (GFP) 遺伝子を導入したもの。2日胚では全身で、5日胚では頭部とレンズで、成魚ではレンズ、皮膚で、また解剖してみると内臓で緑色の蛍光が見られる。この GFP メダカはすでに系統化されている。

ジェニック・メダカが名古屋大学で保存されている。トランスジェニック動物の研究はゼブラフィッシュでも盛んに行われている。

水生動物で化学物質に応答して発現する遺伝子を導入したトランスジェニック動物を作るという発想は以前からある。化学物質に対する応答遺伝子を動物に導入して、その発現を GFP 遺伝子などのレポーター遺伝子で可視化するのである。このような形質転換動物を作製して水生環境における化学物質の動態をモニターすることが出来る。そのような試みの一つが1992年に京都大学の豊原らによってメダカを用いてなされた(図6)。魚類の体色は脳下垂体から分泌される黒色素細胞凝集ホルモン(MCH)によって明るくなる。この図にあるのは、サケのMCH遺伝子をウイルスのプロモーターCMVに結合した遺伝子をメダカに導入したトランスジェニック・メダカである。このトランスジェニック・メダカではMCHの過剰発現によって体色が明るくなっているのが見られる。CMVのプロモーターの代わりに化学物質応答因子のものを利用すれば、体色の明暗によって環境因子をモニターすることが出来るわけである。

今のところこの研究は実現してはいないが、同様の研究がメダカやゼブラフィッシュを用いて行われている。内分泌攪乱化学物質に応答するビテロジェニン遺伝子のプロモーターに GFP などのレポーター遺伝子を結合した遺伝子を用いてトランスジェニック・メダカを作る研究が米国で行われている。

最近、化学物質の毒性試験にトランスジェニック・メダカを用いる研究が米国で注目されている(図7、巻末6)。これまでの毒性試験では、マウスやラットが用いられてきたが、動物愛護運動が強くなっていること、標準的な試験

AAAS MEETING
▶ **BIOENGINEERING**

Fishing for Toxic Chemicals

Many toxicologists can remember being dogged at some point by people opposed to chemical tests on animals. But when Richard Winn, a toxicologist at the University of Georgia, Athens, asked one protester how she would feel if lab mice and rats were retired in favor of fish, she answered, he recalls, "that because fish don't have faces, she would be much more comfortable." If other animal activists feel the same way, then Winn has moved a step closer to



Guinea pigs with gills? Medaka fish could supplant rodents as the animal of choice for tox labs.

図7. トランスジェニック・メダカを用いた化学物質試験法の開発

この種の試験には、これまではトランスジェニック・マウスが用いられてきた。動物愛護や費用などの問題から、トランスジェニック・メダカを用いた実験系の開発が米国で始まっている。鰭をもったモルモット？メダカは毒性研究でマウス等の代わりになるか？米国ジョージア大学 R. Winn らによる研究 (Science 283 775-776, 1999)

で2年の期間と100万ドルの費用がかかることが、メダカが注目される理由になっている。トランスジェニック・マウスをトランスジェニック・メダカで代替するわけである。この研究は PRISMO-10 (Tenth International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms, Virginia 1999) 究は PTISMO-10 も発表されている。このような方向での研究は発がん物質の試験について、以前から考えられていたのであるがいよいよ本格化しそうである。

5) 核移植

1997年のクローン・ヒツジの誕生は社会的にも大きな衝撃を与えたが、培養細胞の核移植は哺乳動物以外の動物にとっても強力な研究基盤となる。

i) より精巧なトランスジェニック動物の作製

これまでトランスジェニック動物の作製には卵へ遺伝子を導入する方法が用いられてきた。しかし、この方法では導入される遺伝子の数や染色体の部位を制御できないなど、いくつかの問題が生じていた。マウスでは相同組換えによって胚幹細胞 (ES 細胞) に遺伝子を導入し、その細胞から個体を作る方法が開発された (遺伝子ターゲティング)。この手法を用いると染色体上の特定の遺伝子を操作できることから、遺伝子機能を解析するための強力な武器として盛んに用いられている。しかし、マウス以外の動物では胚幹細胞の樹立が困難な

ために、この方法を応用することが出来なかった。クローン・ヒツジの研究は、ES細胞以外の培養細胞を用いても核移植の応用で精巧なトランスジェニック動物の作製が可能であることを示した。メダカを用いた核移植の研究が名古屋大学の若松らによって数年前から行われている。現在のところ胚細胞核を未受精卵に移植して胚細胞クローンを作製する段階まで進んでいる。今後は培養細胞の核移植による体細胞クローンの作製が期待されている（図8）。ゼブラフィッシュやファットヘッド・ミノーでは核移植の研究はほとんど行われていない。

ii) 系統動物や絶滅危惧種の保存への応用。

系統動物の保存は1) 生きたままの個体、2) 凍結精子、3) 凍結受精卵または胚、などによって行われている。この中で魚類で用いられているのは、1) と2) である。3) については魚類では卵黄の量が多いために成功していない。個体を生きたまま保存するのは小型魚類でも系統の数が増加すると困難になる。大型魚類ではさらに困難である。そこで精子凍結が一般に用いられているが、精子は半数体であるので、2倍体を得るためには倍数化の操作や交配が必要である。このため、元の系統の遺伝子構成を復元するにはメダカやゼブラフィッシュのような世代時間が短いものでも6ヶ月以上の期間を要する。そこで培養細胞を凍結保存しておき、その核を卵に移植する方法が考えられている。この方法では最初の世代ですでに2倍体の個体になっている。魚類では、世代時間が数年であるようなサケ・マスなどの系統保存には有効であろう。

胚細胞クローン法による系統保存

(ここでは黒い体色をもった純系を保存している例を示す)

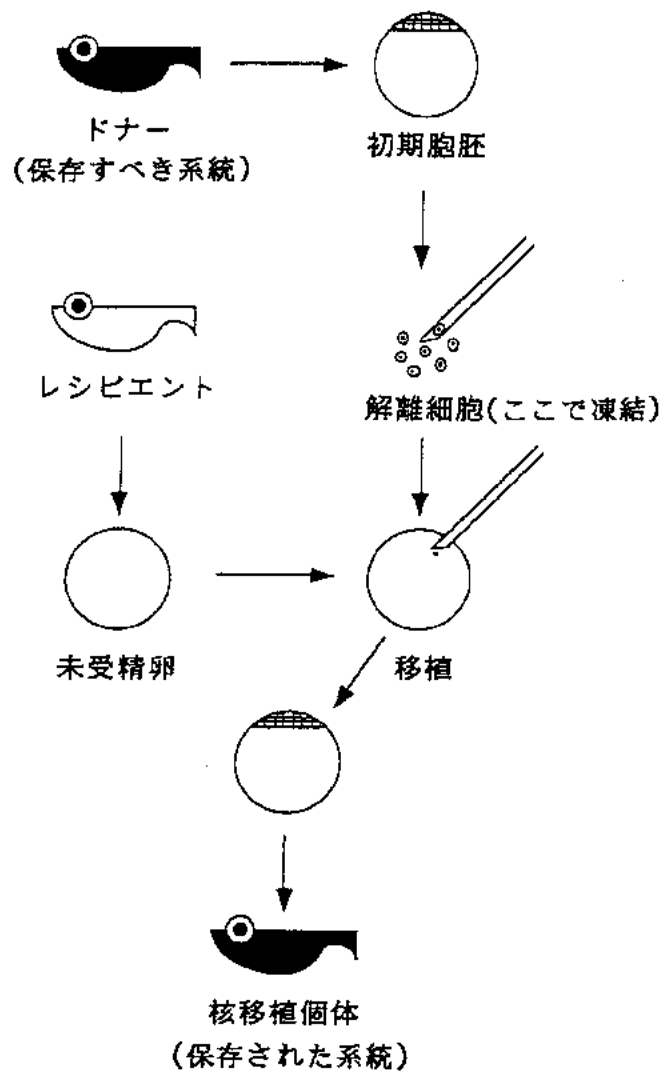


図 8. 胚細胞クローン・メダカの開発

(上) 最近話題になっているクローン法が系統保存技術としても有効であることを示している。(下) 野生型体色の胚細胞核をヒメダカに移植して作られた核移植個体(孵化直後)。

種の絶滅は基本的には生息環境の保全の問題である。メダカは絶滅危惧種とされているが広い分布域と個体数から考えて、このようなバイオテクノロジー的な手法が今すぐ必要になるとは考えられない。しかし、新潟のトキが数個体になるまでに減少した際には、細胞を凍結保存しておき近縁種卵への核移植によって復活させるという発想はあったはずである。

6) ゲノム研究

ゲノムプロジェクトの研究はある生物種のゲノムの全ての塩基配列を決定することを目指している。ヒトゲノムプロジェクトはやがて終了するが、これによって提供される生物・医学領域での研究基盤ははかり知れないものであることが明らかになってきた。現在、微生物や動植物で種を指定してゲノムプロジェクトの手法を応用しようとする動きが米国を中心に高まっている。この他に内分泌攪乱物質の観点から興味深いのは、メダカの性判別 DNA マーカーである。

i) 染色体物理地図

染色体物理地図は染色体の上に DNA マーカーを設定して作製される。ゲノム研究はこのマーカーを手がかりに行われるので、多数のマーカーをもった高密度物理地図が必要になる。この点で最も研究が進んでいるのはゼブラフィッシュである。メダカの遺伝子地図の作製はゼブラフィッシュと比べると大幅に遅れている。ファットヘッド・ミノーについては資料がない。

ii) ゲノムプロジェクト

最近、米国政府は特定の生物種についてゲノムプロジェクトを開始することを決定した。ゼブラフィッシュはこのような生物種の一つとして指定された。ゼブラフィッシュのゲノム研究は国家的なプロジェクトに組み込まれることによって、加速度的に進展することが期待される。次のような予算申請が NIH(国立衛生研究所) に対してなされている。3 年の予定で、年間 11 億円、総額 32 億円である。ゼブラフィッシュの研究基盤の強固さがうかがわれる数字である。

表 3. ゼブラフィッシュ・ゲノム研究予算要求書

項目	年当たり (万円)	期間 (年)	合計 (万円)
ESTs	19,800	3	59,400
系統保存	3,000	3	9,000
データベース	12,000	3	36,000
突然変異地図	4,000	3	12,000
染色体物理地図	16,800	3	50,400
塩基配列決定	54,000	3	162,000
合計	109,600	3	328,800

iii) 性判別 DNA マーカー

体色による遺伝的性の判別では d-rR 系統で 0.3%、FLF 系統では 4% の誤差がでる。新潟大学の松田、酒泉らは、Y 染色体上にある雄決定遺伝子に対して赤色素細胞や白色素細胞の遺伝子よりさらに近い所に位置する DNA マーカーを見い出した。これを用いれば遺伝的性の判別をより正確に行うことができる。図 9 は、このマーカーを用いて FLF メダカの遺伝的性を PCR によって調べたものである。PCR のバンドは白色素細胞を持った雄で 2 本、持たない雌で 1 本見られる。雄に余分に見られる 1 本のバンドが Y 染色体マーカーである。この実験では体色および第二性徴から判別された性と DNA マーカーによって判別した性が一致していることが分かる。この DNA マーカーを利用すると、X 染色体と Y 染色体の交差によって体色と性が一致していない個体でも、遺伝的性を正しく判断できる。このように性の判別に利用できる DNA マーカーはファットヘッド・ミノーやゼブラフィッシュには存在しない。

7) データベース

メダカでは名古屋大学の堀による Medakafish Homepage が、ゼブラフィッシュではオレゴン大学の Westerfield らによる The Fish Net がある（巻末別刷）。ファットヘッド・ミノーではメリーランド大学の Yonkos らによる Atlas of Fathead Minnow Normal Histology がある。

また英文誌 Fish Biology Journal MEDAKA が名古屋大学生物分子応答研究



図 9. DNA マーカーによる遺伝的雌雄の判定

雄ではバンドが 2 本、雌ではバンドが 1 本見られる (FLF 系統)。

センターで刊行されている（巻末資料7）。

8) 環境因子試験法の標準化

i) 政府・大学によるもの

化学物質に対する標準試験法についてはファットヘッド・ミノーで早くから開発が進んでいる。急性毒性試験（米国環境保護局、1993）、慢性毒性試験（米国環境保護局、1994）、稚魚成長試験（ASTM、1993）、全生涯試験（Benoit、1981）などである。内分泌攪乱化学物質についても米国環境保護局はファットヘッド・ミノーを用いて標準的な試験法を開発したと伝えられている。詳細についての資料はないが、雄個体でのビテロジェニンの測定を中心にしたものと言われている。メダカとゼブラフィッシュにはこのようなものはない。

ii) 企業によるもの

米国の Maringo Bioassay Laboratory という企業がファットヘッド・ミノーを用いた水質検査キットを開発中であるとしている。この会社はミジンコを用いた水質検査キットをすでに市販している（巻末資料）。メダカでは住友テクノスが d-rR 系統を用いて内分泌攪乱化学物質の試験法を開発している。

8) まとめ

i) わが国におけるメダカの研究は歴史的に 1900 年の初め頃までさかのぼる。ファットヘッド・ミノーやゼブラフィッシュと比べても最も長い研究の

歴史をもっている。それだけに系統動物など研究基盤の蓄積も豊富である。とくに生殖に関する研究の蓄積は内分泌攪乱化学物質の調査には絶好の研究基盤となろう。しかし、これらの研究基盤は、巧妙で精巧ではあるけれども個人の名人芸的な努力に負っているところが多い。いわば手工業的なレベルのものである。系統保存体制などに見られるように、予算、人員、施設を要するものについてはまことに貧弱である。この点でファットヘッド・ミノーやゼブラフィッシュと対照的である。

ii) ファットヘッド・ミノーについては、環境因子の研究に集中して研究基盤が形成されている。これによって、米国はファットヘッド・ミノーを基軸にして、環境因子研究の体制と各種の標準試験法を世界に先駆けて確立することができた。

iii) ゼブラフィッシュは実験動物として広く用いられるようになったのは、ごく最近、20年ほどのことである。ゼブラフィッシュは、大量突然変異の集積など、現代の分子生物学の手法を体系的かつ大規模に導入することによって、基礎生物学の分野で、確固たる研究基盤を短期間の間に整備することが出来た。

5. メダカの絶滅と生態学

動物の絶滅はその動物に特有の生息環境が維持されているかどうかに関わっている。メダカの学名は Oryzias latipes であるが、Oryzias には稲という意味が含まれている。英語では rice fish, 中国語では稻田魚と呼ばれている。これはメダカが水田地帯に生息していることを意味する。50年前の日本の典型的な田園風景とは畦道で囲まれた水田があり、用水路の小川があり、小さな森に囲まれた農家が散在し、近くには薪を取りに行く里山がある、と言ったものである。これがメダカが生息してきた環境である。メダカの減少については水質汚染や農業技術の近代化による水田とその周辺の環境の変化に原因が求められている。例えば「メダカが消えて見えるもの」（富山和子、日経夕刊、1999年3月9日）、「水田にメダカと子供の歓声戻せ」（小澤祥司、朝日、1999年3月16日）、「メダカを呼び戻そう 新しい農政」（朝日、社説、1999年4月21日）などの意見である。

NHK は「クローズアップ現代」の番組で「メダカの学校、もう見られない」（1999年3月29日）を同様な基調で放送した（巻末資料9）。しかし、これらの論調は必ずしも科学的に裏づけられているわけではない。先に述べた文献調査で気になるのはメダカの生態に関する研究論文がほとんど存在しないことである。これはメダカが余りにも身近すぎて研究対象としては平凡すぎるためなのか。不思議なことである。

メダカの減少と内分泌攪乱化学物質の関係については野外調査によるデータの報告がほとんど無い。これは今後の課題であろう。

6. 文化としてのメダカ

メダカはわが国において絶大な文化的背景をもっている。例えば朝日新聞では1985年から1999年の5月末までに210件のメダカについての記事が掲載されている。朝日一紙でこれだけであるから、他の主要紙と地方紙を合わせれば、その数は膨大な数になるはずである。その多くは、学校、地域や自治体、市民グループ（NGO）などによるメダカの飼育や保存をめぐる活動を伝えたものである。このような活動はインターネットを通じても大きく広がっている。メダカについてのホーム・ページはちょっと調べただけでも20程度にはなる。メダカの生命と成育、生息地域、環境保全、絶滅などについての多くの観察、調査、体験、提言などが含まれている。

メダカは学校教育においても最もよく使われている理科教材である。名古屋市の東山動物園にはメダカだけの「世界のメダカ館」がある。文化において国民的基盤をもっている点ではファットヘッド・ミノーやゼブラフィッシュはメダカとは比べるべくもない。

メダカの絶滅を考えるときに、学校、地域、自治体、市民グループ（NGO）の活動は保存への大きな力となるはずである。例えば1999年3月には「神奈川メダカサミット」が水族館、藤沢メダカの学校を作る会とそのPTA、県水産試験所、藤沢市、日本大学などの協力で開かれ、「メダカ宣言」も発表されている（巻末資料10）。これらの個人や団体の自主的な活動とどのように

関わっていくのか、大学や研究所などの教育研究機関や政府機関の今後の課題となろう。

表 4 日本におけるメダカの社会的文化的背景

	メダカ	ゼブラフィッシュ	ファットヘッド・ミノー
文化的背景	絶大		
専用水族館	名古屋市動物園		
理科教育教材	一般的		
学校・自治体・NGO による活動	活発		
絶滅問題	絶滅危惧種		

7. 総括—OECD 魚類専門家会議で提案された内分泌攪乱化学物質に対する試験法との関連において

OECD 魚類専門家会議は試験法として Tier1 (Screening) 1. 稚魚成長試験、2. 生殖腺復帰試験、3. 繁殖試験、4. d-rR メダカの性転換試験、Tier 2 (Testing) 1. 初期生活段階毒性試験、2. 繁殖試験、Tier 3 (Definitive test) 1. 全生涯試験を提案している。この提案にそって、メダカ、ファットヘッド・ミノー、ゼブラフィッシュの評価を試みたい。

1) メダカ

Tier 1 の 2 はメダカでは行われたことがない。これを除いて、全ての試験法について最も優れた材料である。とくに生殖に関連した試験法については他の追随を許さない。しかし、試験法の標準化では遅れている。またバイオテクノロジーを用いた新しい試験法の開発も期待される。

2) ファットヘッド・ミノー

ファットヘッド・ミノーは Tier 1 の 4 以外の全ての試験法について優れた材料である。世代時間が長いことから継代を必要とする試験には向いていない。試験法の標準化については一歩先んじている。

3) ゼブラフィッシュ

ゼブラフィッシュは 20C 以下の低温では生存できないこと、雌性先熟であることから、Tier 1 の 2 や Tier 1 の 4 の試験には向いていない。これを除くと全ての試験法について、優れた材料である。

4) 総括

今回の調査を OECD の提案との関連で評価すると上述のようになる。OECD はこの他にもさまざまな条件を考慮して標準試験法を設定すると思われる。しかし、わが国におけるメダカの位置を考えれば、OECD の結論がどのようなかに関わらず、メダカを用いた試験法について総合的に検討すべきではないかと思われる。

8. 提言—メダカをモデル動物とした試験法の開発、基盤整備および総合的な環境科学の推進、

今回の調査で、メダカが環境因子の研究に最も高いポテンシャルをもっていることが明らかになった。このことが国際的に評価されていることは、1990年代のメダカをモデルとする研究の8割が国外の研究者によって行われていることから明らかである。しかし、これらの研究は個々別々に行われており、標準的な試験法を開発するといった一つの目標に向けて全体を統合するような方向で行われているわけではない。個別に行われた研究には共通の基準がなく、相互に比較検討することが難しい。例えば、実験個体の成長一つを取ってみても、水槽の大きさ、個体密度、水温、餌の種類と与え方、水質、光などの条件に大きく左右される。これらのことについて異なった条件の下に行われた実験の間で、個体の成長を比較することは極めて難しい。また、化学物質に対する暴露実験にしても実験の条件が異なれば、比較は難しい。世界中から出てくる研究データを効率よく統合するためには、実験の基本的な条件について統一的な基準を作成することが必要である。このような基準の開発が急がなければならない。この点でファットヘッド・ミノーには学ぶ点が多い。

このような統一基準に基づいた試験法を開発するためには、中心的な役割を果たすセンターが必要である。そのようなセンターの形成には試験法の開発、情報や材料の収集と蓄積および提供などを行う強力な研究基盤が必要である。

メダカでそのようなセンターを形成できるのはわが国においては他にないことも自明である。ファットヘッド・ミノーやゼブラフィッシュについては、欧米諸国はいち早く世界に向けてのセンターを形成した。ゼブラフィッシュの国際系統保存センターは一つの例である。当然のことながら、このセンターはわが国に対しても開放されている。その意味では欧米諸国は自分の守備範囲では十分な責任を果たしていると言って良い。もし、わが国に早急な対応が取れなければ、メダカのセンターも欧米に設立される可能性も、欧米におけるメダカ研究の趨勢を考えれば、ないとは言えない。メダカの研究についてのわが国の責任と言ったことについては巻末にある岡田節人と石崎宏矩の発言を読んで頂きたい（巻末資料 11 と 12）。

メダカはわが国にとって自然であり、環境であり、文化である。この点ではファットヘッド・ミノーやゼブラフィッシュとは大きく異なる。今回の調査は試験動物としてのメダカに主眼がおかれているが、この他にもメダカについては生態学的あるいは文化的な視点が要求される。先に述べたメダカのセンターの形成には環境因子の試験法の開発だけではなく、総合的な視点が必要であろう。

この意味でメダカのセンターは政府、大学などの学術研究機関、産業界の他に広範な NGO 知恵を結集して、メダカの国に相応しい、世界の誇れるものでなければならない。

今回の調査をもとに次の行動計画を提案する。

1) 短期的目標

i) メダカを用いた化学物質などの環境因子研究の動向調査。

今回の調査は全体の状況を大まかに把握するレベルに留まっている。さらに踏みこんだ調査を行う必要がある。

ii) メダカを用いた試験法の標準化についての調査と研究

- ・研究者が個別に行っている研究を試験法の標準化の観点から整理、集約する。
- ・モデル系統の選択、飼育法の規格化、成長・性成熟における標準的パラメーターを設定する。

iii) 国際シンポジウムの開催。

海外でのメダカを用いた試験法の実状や試験法標準化の方法について議論するために、国際シンポジウムの早急な開催が必要である。

iv) 以上の事項を検討する研究班を発足させる。

2) 中期的計画

メダカを試験モデルとした環境因子研究の中心となるセンターを設置する。このセンターは当面次のようなことを行う。

i) 試験動物の保存と開発および提供

このような活動は現在、名古屋大学、東京大学、放射線医学総合研究所などの研究者によってボランティアに行われている。このような形態での活動はすでに限界に来ており、将来も存続できる見通しはない。環境分野におけるメダカ研究の地位は急速に高まっており、これに応えるためにも本格的な施設が必要である。

ii) 標準試験法の開発と実用化

これは教育や基礎研究を中心とする大学などでは困難な面も多い。目的を明確にして実用性に徹した研究機関が必要である。

iii) 生殖を軸とする基礎および試験法の研究

この分野はわが国の研究が最も得意とする分野で、世界の最先端に立つ研究の創生を目指すべきである。

3) 長期的計画

中期的計画にくわえて、メダカの生態の解明、絶滅、環境の復元などの研究の他、学校教育、社会教育や NGO 活動の支援を行い、博物館機能を有する、研究と文化を統合した総合センターを構想する。メダカに対する国民的関心に充分答えられる内容であることが必要である。

9 あとがき

この調査を終えるに当たって一言述べたい。私の専門はメダカの発生学や系統保存などであって、環境因子の研究には全くの素人である。たとえばファットヘッド・ミノーについては調査を始めるまで何も知らなかった。これらの点で今回の調査に何か問題がないかと心配である。

今回の調査で印象深かったのは、メダカの研究が国内におけるよりもむしろ国外で活発に行われていることである。これは驚きでもあったが、大変なことだと思った。またファットヘッド・ミノーでは研究を試験法の実用化へとまとめあげる志向がとても強く、これも印象的であった。一度、現場を見てみたいものである。

私が内分泌攪乱化学物質の問題に関心を持つようになったのはメダカの系統保存を行っていることによる。1995 年頃から d-rR 系統の分譲依頼が外国から相次いで寄せられた。始めは理由が良くわからなかったが、依頼者の手紙には内分泌攪乱化学物質の研究に用いる、とあった。国内でこの問題がさほど話題になっていなかった頃のことである。d-rR は山本時男によって 1950 年に作られた系統である。半世紀の年月を経て、このような形で再び脚光を浴びるなどと誰が予想したであろうか。この報告書を書いている最中にも、ダイオキシンの食品汚染が大問題になったベルギーの研究室からダイオキシンの研究に使いたいと分譲依頼が寄せられ、系統保存の重要性を改めて認識させられた。

私の力量や時間の不足から、一つ一つの文献に目を通すことが出来なかったことやその他にも不十分な点が多くあることは心残りである。またいつか改訂する時があればと思う。私にとって、今回の調査はメダカというものを新しい観点から見直す機会となった。このような機会を与えて頂いた環境庁環境保健部環境安全課および日本公衆衛生協会に深く感謝したい。

メダカに捧げた職人人生

元名大教授・富田英夫さん逝く

名古屋大学の教授だった富田英夫さんは、妻と2人の子供とで家族が揃った。遺伝学が専門。人生の大半をメダカの突然変異の研究に打ち込んだ。大学院生時代から収集、飼育をはじめたメダカは約100系統にもなり、世界の遺伝子研究に役立てられている。退官後も自宅でメダカと向き合う日々を送っていたが、一月、大腸がんのためになつた。六十六歳だった。



了、大学に帰った。大学構内に計約五百個のメダカを飼育し、交配を繰り返した。

放射線や化学物質など人工的には今のところできていない突然変異の系統もつけた。しかし、繁殖にはむづかしくなつた。退官後も二重系統を分けてほしいと、米、仏、独、シンガポールなど海外をめぐって依頼があった。

「真つ黒に口焼けて、妻と二人で作業服のおっさんが何をしているのかな」と、いつも思っていた。生物分子応答研究センター長北川泰雄教授とは、思ひ出を語る。

一九九四年に定年退職した。若松祐子助教授（こ）が、メダカを引き継いだ。大小様々なメダカが地面に並び、よく見るとつまずくほどだった。かめにはうべろもない。引き継ぎの日、富田さんがそらんじる系統名を必死でメモした。

突然変異研究 院生から飼育 100系統

「世界のメダカ型」が九三年十月に東京動物園に開設した際には、いろいろアドバイスした。その縁で、大学構内のかめから大木で突然変異系統が流されたから保存に協力してほしい、と飼育係の瀬川滋さん（ふ）に申し出たという。休色が通る、背骨が短いなど異色が多いのは、二十三年系統を最初譲り、退官時に目が退化したものなど貴重な六系統を贈った。

瀬川さんは飼育方や突然変異系統の増し方などを何度も聞きに行った。「聞かれれば答えるが、自分からは教えない。要するに職人。人に教えてやってもうより自分でやった方が納得する。小さな生き物が相手だから」。

昨秋暮れにがんとなつた。亡くなる二日前、若松さんに手紙が届いた。「生き魚類を保存する困難がはつきり（わ）かった。大学の方で保存し（てほしい）」。

中川区の自宅のベランダと庭に置いた水槽の位置を示す図が同封されていた。

病院に訪ねると、図をもとに、どこにどの突然変異系統がいるかを説明した。この日もメダカの話だけだった。

巻末1. メダカ系統保存についての富田英夫の業績
富田英夫の死去を追悼する新聞記事（朝日新聞愛知版、1998/3/16）

メダカ系統分譲に関する確約書

名古屋大学生物分子応答研究センター
純系動物開発研究分野
メダカ系統保存担当責任者
若松佑子殿

メダカ系統の分譲を受けるに当たり、別紙に記載された事項を遵守することを確約致します。

年 月 日

署名 印

氏 名	
所 属	
住 所	
T E L	
F A X	
分 譲 系 統 名	
個 体 数	

卷末2. メダカ分譲に関する確約書（和文）

名古屋大学生物分子応答研究センターの淡水魚類系統保存実験施設ではこの確約書に従って系統の分譲を行っている。

Laboratory of Freshwater Fish Stocks,
Bioscience Center, Nagoya University
Chikusa, Nagoya 464-8601, Japan
Tel.: 52-789-4294, Fax.: 52-789-5053
E-mail: wakamatu@bio.nagoya-u.ac.jp

May. , 1999

Dear Dr. :

You have requested the medaka strain of _____.
The strain was developed at Laboratory of Freshwater Fish Stocks, Bioscience Center,
Nagoya University. The laboratory will release it to you on the following conditions:

1. The strain is to be used for research purposes only.
2. The strain shall not be sold or used for commercial purposes, nor will it be distributed further to third parties outside your laboratory without writing permission of the laboratory.
3. The strain is provided as a service to the research community. It is provided without guarantee of fitness for a particular purpose or any other warranty.
4. Appropriate acknowledgement shall be expressed, when you present or publish papers of research performed using the strain provided by the laboratory. Receiving the reprint should be very much appreciated.

If you agree to these conditions, please fill out this form and return it to me. When I receive it, the strain will be sent to you.

Sincerely yours

Yuko Wakamatsu, Ph. D.

ACCEPTED:

Date _____
Name _____
Signature _____
Affiliation _____

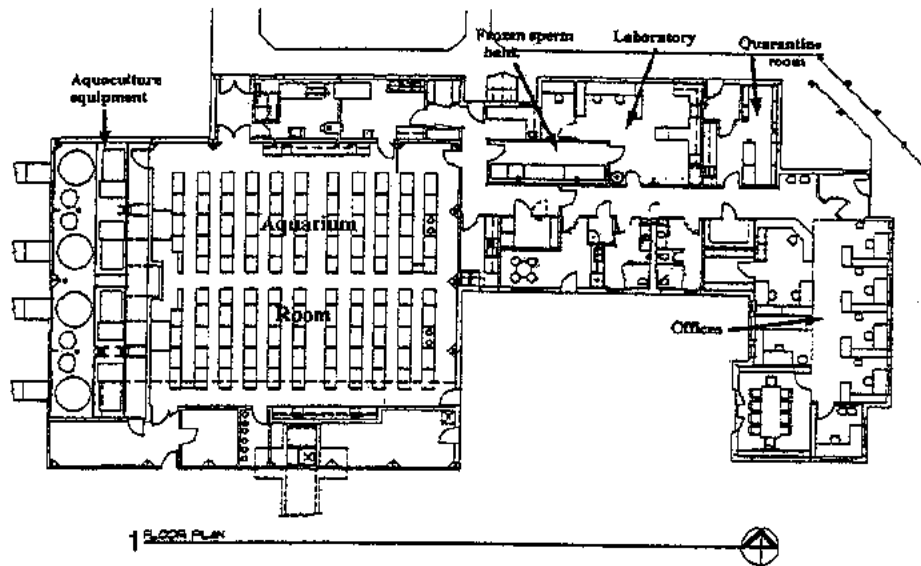
Address _____

巻末 3. 系統メダカ分譲に関する確約書（英文）

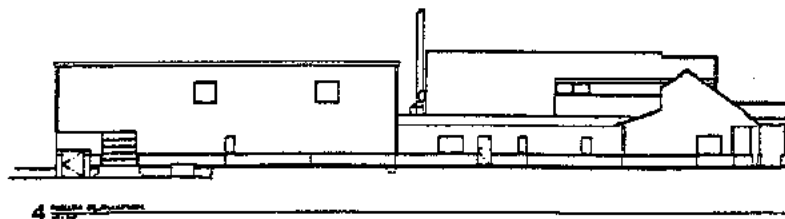
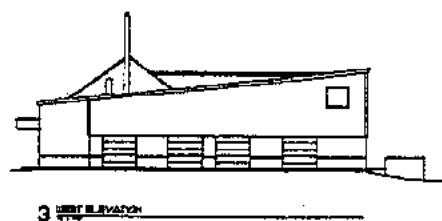
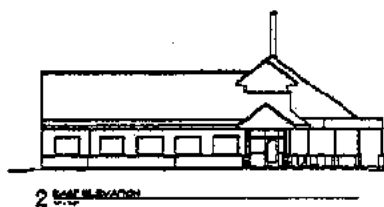
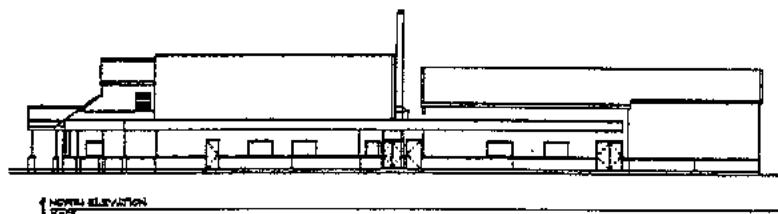
名古屋大学生物分子応答研究センター淡水魚類系統保存実験施設では、この確約書に従って国外研究機関に分譲を行っている。

the Zebrafish Stock Center

Construction plans



The Stock Center is planned as a free-standing building of approximately 10,000 square feet located on the University of Oregon campus. It includes an aquarium facility for live stocks, a quarantine room for receiving fish from outside laboratories, a frozen sperm bank, and a diagnostic and research laboratory. Construction is scheduled for completion by the summer of 2000.



巻末4. 国際ゼブラフィッシュ系統保存センター

2000年夏の完成を目指してオレゴン大学キャンパスに建設中である。運営責任者はオレゴン大学学長になっている。

トランスジェ
ニック動物

メダカの卵子にニワトリの遺伝子

魚では初の導入成功

メダカの卵子にニフトリの毒
伝子を注入し、受精後七日の胚
(はい)でその遺伝子を調べさせ
ることに、京大教養部生物学教

の遺伝子を導入して得られる「トランスジェニック動物」に於て成功したのは世界で初めて、ニトロリの遺伝子を注入した。この遺伝子は目の水晶体の

整の廳聖三一節助手たちのグル
ーが成功、このほど筑波大で
開かれた日本発生物学会で発
表した。受精卵に異なる生物

魚は受精卵の核が見えにくい
ため、これまで成功しなかつ
た。感服さんたちは日本であ
り研究を続けているメダカは滑面。
たんぱく質の一種、テルタ型ク
リスタリンをつくる感服さん。ク
リスタリンには数種類ありますが、
魚はテルタ型をもっていないの

巨大な見えない天体「重力レンズ」をプリンストン大などの研究者たちが見つけた、と発表された。

に五十倍光量増えたというのや
エーサー(液晶)が、実際に使
う時の星にもおなじやうな三つの
星のように見える。この三つの星は正
ばいりて、アイソトピー

天文著者トドウィン・ターナー氏を中心とするチームが、アリゾナ州のキッタピーク国立天文台の大口徑望遠鏡で三ニューメキシコ州の国立天文台の大口径望遠鏡を使い、この座の方向

これは、クエーサーの手前に巨大な質量を持つ天体があり、その巨大な重力によつて空間が曲がっているために、同じ星からの光が巨大天体の両側からう

「この原稿が書けたこと
なを証明してやるわ。」

三四四十三個の卵母細胞の核

とわがいて、尋ねさせたところ、百六十四個が七日目まで正常な発生を続けた。うち三十個について調べたところ、十個から注入した遺伝子のDNAが、テ

ルタ型クリスタリンが検出され
た。三〇%を超えて輸入超はマ
ウ・イン・デ・バ・ナ・ナ・ナ・ナ・

遺伝子が入った胚を切片にしてみると、遺伝子は胚全体にまんべんなく分布し、半分から三分の一の細胞の核に入っている。

だ。しかし、運動不足の発現は種
種によって異なり、脳、せき
臓、腸、心臓、筋肉、毛
髪、歯、皮膚、血
液、消化器は種々異なる。

ある動物の受精卵と別の動物の遺伝子を注入して得られる

ミントン博士たちが、マウスの

と人間の血液たんぱく質の連
すを注入し、胎児に変えて
のが最初。この胎児では外來
遺伝子が染色体の中に組み込
れ、働いていた。それ以来、

ニル、ショウジョウバエ、ウ
などでも成功した。

米國では、マウスにラットの成長ホルモンの遺伝子を注入し、

「スーパーマウス」をつくりだした。スーパーマウスは、ブタやヒツジに人間が成程ボールマンを入れて早く大々くませるという。選松子南選

巻末5. 世界で初めてのトランスジェニック魚類

世界で初めてのトランスジェニック魚類はメダカを用いて作製された。(朝日新聞1986/5/20夕刊)

guess, but Kirschvink speculates that changes in Earth's magnetic field twist the chains, perhaps forcing open ion channels that send signals to the brain.

Not everyone is convinced the scientists have uncovered the whole picture. "These cells appear to be involved in magneto-reception, but their role in behavior is still unclear," says John Phillips, a neuroethologist at Indiana University, Bloomington, who studies how light helps newts orient themselves in their surroundings. To tie the mechanism to behavior, researchers still must try to disrupt the cells and show an effect on navigation. The work could open the door to exploring an enduring biological mystery: whether, unwittingly, we use the traces of magnetite in our own bodies to make more sense of this bewildering world.

—MELISSA MERTL

AAAS MEETING

BIOENGINEERING

Fishing for Toxic Chemicals

Many toxicologists can remember being dogged at some point by people opposed to chemical tests on animals. But when Richard Winn, a toxicologist at the University of Georgia, Athens, asked one protester how she would feel if lab mice and rats were retired in favor of fish, she answered, he recalls, "that because fish don't have faces, she would be much more comfortable." If other animal activists feel the same way, then Winn has moved a step closer to



Guinea pigs with gills? Medaka fish could supplant rodents as the animal of choice for tox labs.

easing the disapproval that he and his colleagues often feel. At the meeting, he described a promising new line of fish for screening toxic chemicals.

To enhance their ability to detect the mutations that chemicals might cause, in the mid-1980s toxicologists began equipping lab mice with bacterial genes that can be pulled out and screened for damage. This is much easier than, say, screening the

entire mouse genome or waiting for tumors to develop. Now, Winn and his colleagues have introduced the same bacterial genes into fish, and they found in early tests that the transgenic fish are just as sensitive at picking up mutations as the modified rodents are.

Experts caution that more work will be needed before the fish find widespread use as guinea pigs. But if the research does pan out, the fish should help make toxicology testing cheaper as well as less politically sensitive than it is in rats or mice. A standard 2-year testing regimen on rats, for example, can cost \$1 million or more; nobody's done such an estimate for fish, but keeping a fish costs "pennies a year," compared to about 20 cents a day per rodent, Winn says.

Hoping to find an alternative, Winn turned to medaka, the small, Japanese, freshwater fish already used for toxicology tests. These fish had previously been modified so that they carry a foreign gene to detect mutagens, but this target is so small that it can pick up only certain small-scale chemical effects—those that alter a single A-T base pair.

In the first phase of its experiment, Winn's group took two bacterial genes, called *LacI* and *cII*, which are used in mice to detect mutations caused by chemicals, and spliced them into a bacterial virus. The researchers then injected this bacteriophage into medaka eggs, where it carried the new genes into the nucleus. The fish that developed, Winn found, carried the genes in all their cells and had a low rate of spontaneous mutations in those genes.

Winn's group next dumped a standard mutagen, *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU), into the fish tanks and, after waiting 1 to 16 hours, ground up the fish and retrieved the bacterial DNA for analysis. The researchers found that they could detect even slight genetic changes, charting a two- to threefold increase in mutations at low exposures to ENU.

Winn also described a transgenic medaka with a third gene called *LacZ*, which he says works well for detecting radiation-induced damage. Radiation tends to knock out or rearrange big chunks of DNA, and this gene is big enough—and its carrier, a circular piece of DNA called a plasmid, is sturdy enough—that there is sufficient DNA left for analysis after a radiation hit. In collaboration with University of Georgia colleagues who work at the site of the Chernobyl reactor accident and at nuclear waste dumps, Winn has begun exposing these fish to radiation-tainted sediments and looking for effects on the gene.

"I was really thrilled" to hear about Winn's progress, says toxicologist Barbara Shane of Louisiana State University in Baton Rouge, who studies cancer in mice. She and others are eager to begin tests on transgenic medaka. Winn cautions, however, that more

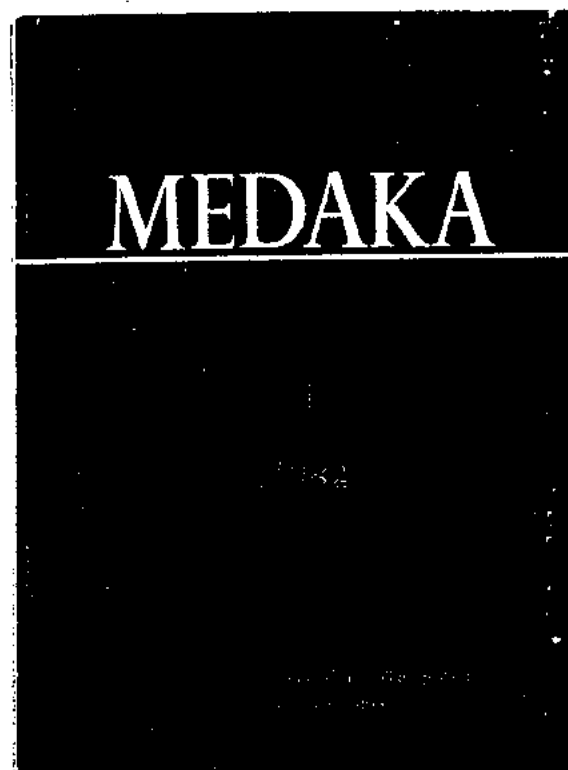
work is needed to prove that the fish give predictable results with many more chemicals. "We're still at an early stage, but it's time to talk about it," he says. —JOCELYN KAISER

AAAS MEETING

ANTHROPOLOGY

巻末 6. 化学物質毒性試験にトランスジェニック・メダカを用いる米国の研究

図 7 の全文 (Science 283, 775-777, 1995)



巻末 7. 雑誌 MEDAKA

1982年に創刊、現在10号まで出されている（現在の誌名は Fish Biology Journal MEDAKA）



MBL's EasyTox Test Kits

[◆ MBL Home](#)
 [◆ Aquaculture](#)
 [◆ Book Store](#)
 [◆ Lab Services](#)
 [◆ Products](#)
 [◆ Contact Us](#)

[MBL Site Navigator](#)

[Select Page](#)



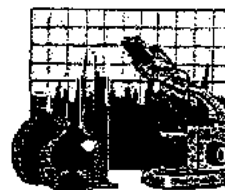
Special Offer for Internal Users - 20% OFF Our Products and Organisms - [Click Here for Details](#)

Introducing MBL's EasyTox Test Kits

- Inexpensive, do it yourself Acute WET Tests.
- Simple to use toxicity tests that utilize *Ceriodaphnia* as test organisms.
- EasyTox provides you with all the test organisms, procedures, and equipment required to perform a toxicity test.

Each *Ceriodaphnia* EasyTox Kit Contains:

Ceriodaphnia dubia neonates
 Exposure vessels
 Beaker
 Transfer pipettes
 Dilution and Control water
 Bench sheets for recording your data
Ceriodaphnia dubia food
 Free professional data interpretation and result calculations



Pricing:

Acute Screening* <i>Ceriodaphnia</i> EasyTox Test Kit	\$ 95.00
Acute Definitive* <i>Ceriodaphnia</i> EasyTox Test Kit	\$115.00

Additional Helpful Items:

Graduated Cylinder (250 ml)	\$ 17.00
Light Box	\$ 22.00
Magnifying Glass	\$ 10.00
Thermometer	\$ 12.00

Shipping:

Test kits are shipped using an overnight carrier.	\$ 30.00
Additional items require extra shipping charges.	-CALL-

For More Information or to Order: CALL 1-800-883-8384.

COMING SOON!

Pimephales promelas (fathead minnow) EasyTox Test Kits

*Screening tests measure a single concentration of a sample against a control. These tests are considered as pass/fail tests. They work well for detecting toxicity; however, they cannot determine the amount of toxicity in a sample. Definitive tests use multiple dilutions or concentrations of a sample, and can determine the amount of toxicity a sample contains by determining the lethal concentration (LC50 value).

MBL's EasyTox Test Kits are not intended for reporting purposes and permit compliance, but rather as a tool in evaluating the potential for toxic responses.

巻末 8. 米企業による環境毒物試験キット

この企業ではミジンコについてはすでに市販している。ファットヘッド・ミノーについては近日中に販売とある。



"Medaka : an
endangered
species now?"
NHK Close Up
"Gendai" March
1999 (In Jpn).

巻末9. “絶滅危惧種”メダカをめぐる動き

NHK クローズアップ現代「メダカの学校はもう見られない」

1993.3.29

メダカ宣言

今日、メダカを含めた多くの生物の生息環境は、すさまじい速さで破壊され続けています。

残念ながらメダカは絶滅危惧種としての指定を受ける事態となりました。

豊かで美しい日本の自然環境を21世紀の子どもたちに伝え、引き継ぐことは私たちの重大な責務です。

私たちメダカの保全と保護にたずさわるものは、いつの日かメダカが群れ泳ぐ水辺を取り戻すことを夢見て、共に手を取り合い、地域市民の理解と協力を得つつ、それぞれの活動に邁進することを誓い、宣言と致します。

1999年3月27日

神奈川のメダカ大集合 第1回メダカサミット



巻末10. 市民グループ(NGO)による活動

藤沢メダカの学校などによる第1回メダカサミットで出されたメダカ宣言

(1999.3.27)



メダカ

この日本で芽生えたものが大きく栄えてほしい

石 崎 宏 矩

名古屋大学理学部の裏に、草ぼうぼうの圃場が広がり、常滑焼の径 50 cm の水がめ 400 個がずらりと並ぶ。その中に、かの有名なメダカの突然変異の数々が飼われている。長髪短軀、真黒に日焼けした顔に鋭い眼光の異相の老人が、かめの間を往き来してメダカの世話に没頭しておられた姿は、今も鮮やかに眼底に残る。メダカの性転換の研究で有名な“メダカ博士”、山本時男名古屋大学名誉教授のありし日の姿であった。喉頭癌で亡くなられる寸前まで、術後ののどにさしこんだチューブへ、片時も離されなかった日本酒をチビリチビリと流し込み、おたりに酒気をただよわせつつ悠然とたたずまれる御姿は、まさに学問の鬼と呼ぶにふさわしいものであった。

山本門下に育たれた富田英夫博士（名大名誉教授）は、メダカの突然変異とりをライフワークとされた。自然発生突然変異を集めること 78 系統、その中には、背骨がジグザグに湾曲したもの、一見肺と見まがうスカスカの組織像を示す異常腎臓をもつもの、クルクル一方回りの遊泳をするもの、背ビレの位置に腹ビレをもつもの等々、発生学的に魅力あふれる変異の数々が含まれている。富田博士のたいへんな努力によって、その交配実験、系統保存が行なわれてきたのである。脊椎動物の突然変異ストックとして、まさに異色の存在である。

1980 年、中埜栄三名大名誉教授（当時理学部生物学科教授）のご尽力によって理学部附属淡水魚類系統保存実験施設が新設され、助教授 1、技官 1 のささやかな人員構成ながら、立派な独立の建物が新

築された。助教授に富田博士が就任され、メダカ研究のケルンが発足した。1993 年に至り、生物分子応答研究センター（名大全学機構）設立にあたって、その純系動物開発研究分野（分野とは部門相当の呼称）として生まれ変わった。教授 1、助教授 1、助手 1、技官 1 の準完全講座として発足し、初代教授には富田博士が就任された。翌年の停年退官に伴って、尾里建二郎教授、若松祐子助教授、依田欣哉助手が着任されて、この事実上のメダカ部門の新陣容が完成した。

そもそもわが国でのメダカを用いての生物学の研究論文の出現は、実に 1908 年の古きにさかのぼる。外山亀太郎、石川千代松、石原 誠ら先覚者たちのメダカ体色遺伝の研究に始まり、1921 年には倉田龍雄の著名な論文が発表された。ヒメダカ、シロメダカの限性遺伝の研究から、優性遺伝子 R が Y 染色体上にあると結論した先駆的な成果であった。その後多くの研究者たちが、メダカを使って遺伝、発生、生理等多岐にわたる研究を展開してきた。

現代に至って、前述の山本時男門下の活躍と共に故江上信雄博士（東京大学名誉教授）とその門下の活躍は特記に値する。江上博士はメダカを使うの放射線生物学、ほか多くの研究に業績をあげられた。その門下には多くの優秀が育たれ、多彩な成果を蓄積されつつある。現在のわが国におけるメダカ研究の広がり、実に大きい。

言うまでもなく、小型魚類は脊椎動物の遺伝生物学のモデル系としてきわめて多くの利点をもつ。るがえって欧米の動きをみると、最近のゼブラ

— 2 —

遺伝 1995 年 7 月号 (49 巻 7 号)

巻末 12. 日本におけるメダカ研究の重要性についてのアピール

わが国におけるメダカの研究史、名古屋大学における系統保存、ゼブラフィッシュの研究などに触れながら、わが国独自のメダカ研究を振興すべきことを説いている。（遺伝 1995 年 7 月号、石崎宏矩愛知淑徳大学教授、名古屋大学名誉教授）

フィッシュを使つての遺伝発生学の進展には目を見はるものがある。G. Streisinger がファージ遺伝学から脊椎動物の遺伝学をめざしてゼブラに転進し、mutagenesis (突然変異誘発) の基盤を確立したのが1980年ごろ、古いことではない。さらに、ショウジョウバエの発生過程に関与する遺伝子突然変異を網羅した業績で著名な C. Nüsslein-Volhard が、ゼブラの発生に関係する遺伝子をすべて突然変異として検出しようと足をふみ出してから、様相はがぜん熱気を帯びてきた (この辺のいきさつについては日本 仁博士の簡潔な紹介がある—蛋白質 核酸 酵素, 39, 2168 (1994))。彼女は研究の開始に先立つ3年間、自らゼブラの飼い方、飼育容器の開発に工夫をこらしたという。そして本番の研究に入るや、アッという間に1400系統の発生異常を与える突然変異を同定した。これは発生過程に関与する全遺伝子の95%に当たると算定されている。彼女の力により、Tübingen の Max-Planck Institute に3階建てのゼブラ研究所が、半官半民の財源で新設された。教授1、ポスドク十数人、つまり彼女の率いる1研究室だけでこの建物を占有し、8千個の飼育タンクを納めて、水の循環、濾過、消毒はすべて自動装置による。さらに彼女の弟子 W. Driever らはボストンの Massachusetts General Hospital で血液循環・造血系にかかわる突然変異のみに集中し、ヒト心臓病など疾病の遺伝学的背景に迫ろうとしている。これらの力強い歩みは当然全世界にインパクトを与え、今や脊椎動物の遺伝発生を志す研究者は、誰も構子もゼブラになびくといった風情にあるといっても過言ではあるまい。

今心が痛むのは、このゼブラの勢いの前に、せっかくの伝統をもつわが国のメダカの姿がかすみつつあるようにみえることである。メダカでの突然変異の蓄積、近交系の確立、遺伝子導入の先駆的研究、ES細胞 (胚性幹細胞; 多分化能をもつ) 株の樹立、東南アジアのメダカ進化等々、キラリと光る業績の数々は、いかに高く評価しても足りることはない。

また基礎生物学研究所の尽力でメダカ関連集会が繰り返し開かれている。しかしゼブラの勢いの前には、正直いって旗色が悪いのではないか。

ゼブラに向かう研究者を責める気はさらさらない。大河に沿うのはもとより科学の王道である。しかしわが国固有の芽から大河を作るほうがよほど楽しいし、価値ある国際貢献であろう。岡本博士は前出小論の中で、“コミュニティ効果”を説いておられる。“流れ”を作るのが日本人は下手である、という定評は、もうそろそろ振り捨てたいものである。豊富な実績をもつ日本のメダカが、世界のメダカに発展することを切に祈りたい。

最後に些細な協力のPRを一つ。『MEDAKA』と称するユニークな英文誌が、中埜博士の尽力で1982年に発刊された。私はメダカの研究とは無縁であったが、淡水魚類系統保存実験施設の名ばかりの施設長をつとめた機縁から、この雑誌の編集を未だに続けている (現名『The Fish Biology Journal MEDAKA』名大生物分子応答研究センター発行、年1回)。ユニークな情報発信として、いささかでもメダカ研究の興隆に役立てばと思っている。雑誌の入手希望者は尾里教授 (名古屋市千種区不老町、名古屋大学生物分子応答研究センター) に連絡されたい。論文を寄稿していただければさらに幸いである。ご参考までに1994年号 (60頁) の内容を下に列記しておく (題名は和文で略化)。

B. J. Catalone and R. A. Fluck, メダカ卵油滴の移動/古賀章彦・稲垣秀人・別所義隆・堀 寛, メダカアルビノと、チロシナーゼ遺伝子内トランスポゾン/石川裕二, メダカ側線系の神経分布/広瀬裕一・松本二郎, メダカ眼の色素細胞分化/武田洋幸・宮川輝美, ゼブラ胚細胞運命コミットメント/成瀬 清・酒泉 満・嶋 昭紘, 実験モデル系としてのメダカ/尾里建二郎, 基生研メダカセミナー記録/浜口 哲・酒泉 満, メダカシンボ記録/松山國臣, 名古屋動物園世界のメダカ館紹介

(いしざき ひろのり, 愛知淑徳大学 現代社会学部)

前門のゼブラ, 後門のフグ, そしてメダカはどこにゆく ——モデル魚類のホームページ紹介——

堀 寛

I. 前門のゼブラ, 後門のフグ

メダカは1世代が3カ月と比較的短く, 容易に受精卵が採取できるため, 実験室内でも飼いやすく, 脊椎動物の発生と遺伝の両方が研究できる便利な動物である。それにヒトからサカナまで脊椎動物のボディプランはすべてサカナで完成しており, 脳や循環器の形態形成をやるなら, サカナほど有利な系はない。またメダカは数少ない日本産のモデル動物として古くから研究され, たとえばヒメダカやシロメダカという体色の変異は江戸時代から知られているが, これを利用してメンデル遺伝が確認されたのは1920年代で, これは脊椎動物で最初である。さらにメダカはオス, メスの区別が肉眼でも容易であり, これと性染色体連鎖と体色変異を結びつけて開発された, いわゆるヤマモト・メダカは脊椎動物の性分化が性染色体だけでなく性ホルモンの支配下にあることを最初に巧妙に証明したことで有名である。また今日, 世間で話題にされることが多い内分泌攪乱物質 (いわゆる環境ホルモン) の影響についても, このヤマモト・メダカは, 遺伝と結びつけてみることでできる性分化検定系であるため, その面からも注目され, 多用されている。この点でもメダカはきわめて今日的なモデル生物である。

本稿で紹介するメダカのホームページ (図1, URLは文献2)は, ほかのホームページ同様, メダカ研究者が情報を交換したり, 新たに開発した遺伝子クローンやライブラリーを共用するための広場であるが, それだけでなく, メダカそのものの基礎的知識とこれまでの研究の蓄積を紹介することにもそのページがさかれている。こうして, ややもすれば国際的には評価される機会の少なかったメダカをインターネットで利用可能にするという役目ももっている。

しかしこのようなメダカにも最近, 強敵が登場し, その前途は多難(?)という人もいる。最初に紹介し

なければならないのはゼブラフィッシュ (以下ゼブラ) で, このサカナは脊椎動物の初期発生を解析するにはきわめて有用である。発生が早く, しかも卵が透明で, この利点を生かし, すでに多くの脳発生や循環器発生の変異株がドイツやアメリカで体系的に分離され, 染色体地図も構築されて, 逆遺伝学を進める体制が整っている。それらの情報を集めてホームページ化したのがTHE FISH NETTMである。

そして次の好敵手はフグである。もともとBrennerという人はトリプレット・コードの提唱で有名だが, その後, 線虫をモデル動物に利用することを提唱し, 現代線虫学を築いた人である。この人が今度はあの猛毒のトラフグ (*Fugu rubripes*) に注目した。動機はヒトゲノム計画である。猛烈な勢いで実行されているヒトのゲノム解析もデータの中味をみると膨大な反復配列や長いイントロン部分などが存在し, 容易に全体像を表わそうとはしない。そこで彼は脊椎動物で最もゲノムの小さいフグのゲノム解析をスタートさせた。目論見どおりすでにフグから膨大な遺伝子が分離され, YACやBACのクローンも市販されており, ヒト遺伝子のホモログ取りやヒトとフグの染色体上の相同部位を分離し, ゲノムの進化を解明するにはなくてはならないモデル生物になっている。その詳細はフグのWWWホームページ¹⁾に解説されている。まさにメダカにすればゼブラが前門のオオカミなら, フグは後門のトラである。一難が去る前に次の難がおそってきている絶対絶命の場面だが, 道がないわけではない。最近, 以下のような議論がメダカ研究者のなかでかわされたが, この中に禍い転じて福となるようなメダカの生き延びる道があるかもしれない。

II. そしてメダカはどこへゆく

(Aさんからのメール 98.4.17)

同じ建物のBさんからメダカは本当の二倍体なのかと

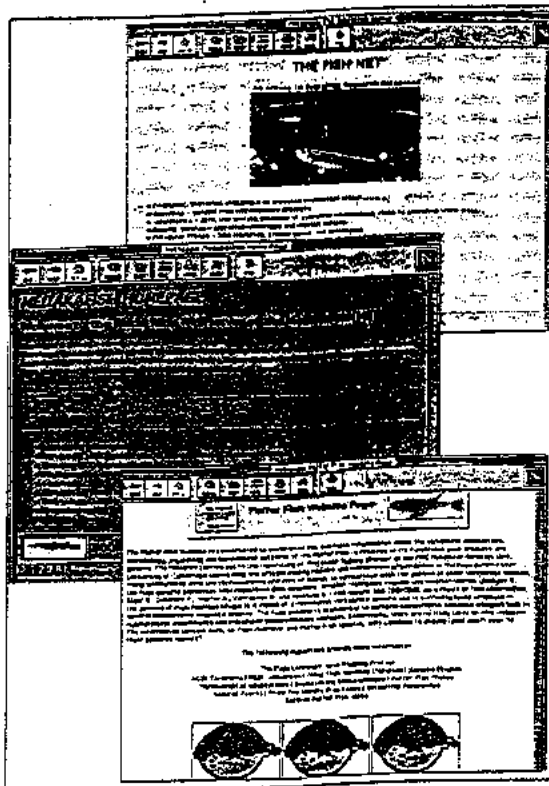


図1 上からゼブラ、メダカ、フグの各ホームページ

聞かれ、明確な返答ができず困っております。ご教示いただけないでしょうか？ この次第は彼が最近参加したキーストーンシンポジウム(Keystone Symposium on Vertebrate Development)で、ゼブラが偽四倍体(pseudotetraploid)だということが話題になっていたようで、もしメダカが本当に二倍体ならメダカにもゲノムプロジェクトなどで大いに役立つことがあるかもしれません。

(Cさん 98.4.17)

私はメダカが二倍体というのを頭から疑ったことがありませんでした。メダカは半数体では致死ですし、この点はゼブラも同じです。ですから両者とも原則的には二倍体でしょう。偽四倍体の“偽”が曲者ですが、その根拠の一つはゲノムあたりのDNA量ではありませんか。メダカのホームページによれば、メダカDNAは半数体あたり 0.7×10^9 塩基対で、これに対しコイ科のゼブラはメダカの2倍量のDNAです。またフグはそのゲノムが小さいことが知られていますが、フグはメダカの半分、ゼブラの1/4、ヒトゲノムのなんと1/10です。またフナには四倍体が知られ、単為発生する三倍体も

います。ですからゼブラが偽四倍体というのは、ひょっとすると可能性はあります。あやふやに答えてもいけないので専門家に聞いてみます。ゼブラの情報はどの程度の信頼性なのでしょうか？ 論文にすでになっているのでしょうか？

(Aさん 98.4.17)

早速のご返答ありがとうございます。ゼブラの件は人づてで不確かですが、なんでも *Hox* が A, A', B, B', C, C', D の7群存在し、その他の遺伝子もクローニングすると余分がとれてくるケースが多いようです。

(Dさん 98.4.18)

メダカでは補体B因子や、LMP2, LMP7は単一コピーという報告があります。またチロシナーゼの遺伝子も、単一コピーですから、やはりメダカは単純な二倍体と考えていいでしょう。参考までに付け加えておきますが、チロシナーゼ遺伝子の場合、メダカとヒトで比べるとエクソン部分の大きさはまったく変わらないのに、イントロン部分はメダカのほうが極端に小さくて遺伝子ゲノム全体では約1/10の大きさしかありません。メダカやフグのゲノムがヒトゲノムに比べて小さいのは、このようにイントロン部分の長さが短いことも重要です。

(Eさん, 98.4.18)

コイ、フナはそのDNA量がメダカなどの2倍あることはよく知られていて四倍体起源だといわれています。硬骨魚では染色体数50(前後)というのが一般的で、メダカのみならずコイ科でも50が基本のようです。ゼブラも約50ですが、二倍体フナには染色体数100のものもあります。ゼブラの染色体数は約50ということなので数からいえば“二倍体なのかなあ”と思ってしまいますが、DNA量はコイと同程度です。偽四倍体というのは二倍体化した四倍体という意味なのでしょうか？ その根拠を知りたいものです。メダカでは減数分裂時の2価染色体数は24ですし、アイソザイムやDNAマーカーの分離もふつうの挙動をしますので、二倍体であることを疑ったことはありません。

(Bさん 98.4.20)

この件はキーストーンシンポジウムでオレゴン大学のJ. Postlethwaitが発表していたことからです。Aさんのメールにあるように *Hox* が A, A', B, B', C, C', D

の7群存在し、その他の遺伝子もクローニングすると2つ、3つととれてくるケースが多いというのが根拠のようです。この3月にフライブルグで開かれたEMBOのコースでも、彼が同じ話をしていたとFさんがいっていました。一方、ゲノムサイズがゼブラの1/4であるフグでは、*Hox*はA, A', B, Cで、4セットは変わらないがDが欠けているということでした。メダカではまだそのようなデータがありませんが、*Hox*はクローニングしてみる価値があるかもしれません。

(Fさん 98.4.20)

倍数性については、PostlethwaitがEMBOで話したように、遺伝子ファミリーメンバーの総数を比較すると、哺乳類(ヒトとマウス)よりゼブラが多い例があることは確かなようです。

(Gさん 98.4.27)

ところで、ゼブラの偽四倍体のことですが、考えれば考えるほど重大な問題だと思えるようになりました。小島先生の『魚類細胞遺伝学』(水交社発行、緑書房販売、昭和58年)を勉強した範囲で、私なりにお答えを試みると以下ようになります。

① Gosline (1971) の分類によると、真骨魚類は低位群、中位群、高位群の3群に分けられる。ゼブラ(コイ目)は低位群に、メダカ(メダカ目)は中位群に、スズキ目、フグなどの現代型硬骨魚は高位群に、それぞれ属している。

② 低位群では染色体数は最小 $2n=22$ から最多 $2n=206$ にわたり、ばらつきが多い。 $2n=50$ (ゼブラなど)、48、100の3つのモードがみられる。ばらつきは、 $2n>50$ の方向に広がっている。このことから、コイ科やサケ科に典型的にみられるように、低位群では倍数性進化が起こっていることが示唆される。

③ 中位群では、最小 $2n=48$ (メダカなど)から最多 $2n=72$ で、 $2n=48$ が40%を占める。ばらつきは少なく、収斂の傾向がみられる。広がり低位群とは異なり、 $2n<48$ の方向である。

④ 高位群では、最小 $2n=16$ から最多 $2n=78$ 、モードは $2n=48$ が56%を占め、中位群よりさらに収斂している。

結論的にいうと、染色体からみて、低位群は中位群や高位群との間に大きなギャップがあります。低位群では、倍数化による種分化が起こっていることはかなり確実です。したがって、ゼブラが染色体数が50で、

~4nであることには、そんなに大きく驚くことはありません。最近のNature誌に、関連するMeyerの記事⁹⁾がでていましたが、ここではゼブラは2nだといっています。やはりいまは二倍体だが、これはかつての四倍体に変化したのでしょうか。

(Bさん, 98.4.24)

偽四倍体に関しゼブラを研究している人、数人と話したのですが、ゼブラの人たちの間では比較的前からうすうすとは気がついて噂にはなっていたようです。そのほかにもあります。私のノートに記載してあるのはen遺伝子で、哺乳動物ではen-1とen-2の2つの遺伝子ですが、ゼブラでは少なくともen-1~3と3つ遺伝子があります。またNIHのDawidの研究室でいわれ出していたことですが、ゼブラから遺伝子をクローニングすると必ず哺乳類やカエルに比べ1つは余計に取れてくるということです。これはDawidのところだけでなく他の研究室の結果も含めてのものです。たとえば思いつく範囲では、マウスの*Lim1*, *Lim5*がゼブラでは*lim1*, *lim5*, *lim6*、マウスの*Ldb1*, *Ldb2*がゼブラでは*ldb1*, *ldb2*, *ldb3*、マウスの*Isl1*, *Isl2*がゼブラでは*Isl1*, *Isl2*, *Isl3*です。サケ、マスでは*Isl1a*, *Isl1b*, *Isl2a*, *Isl2b*, *Isl3*です。そこで“すべてサカナはもしかしたら常に1つ余分に遺伝子をもっているのではないか”ということがその研究室では定説でした。しかしこれはサカナ一般のことではなく、また今回教えていただいた分類に従えば、低位群の魚にいえることではないかと考えられます。

(Cさん, 98.4.24)

こうしてみると発生学ではゼブラがものすごく進んでいて、とてもメダカが出る幕などなさそうにみえますが、メダカにも有利な点がまだ十分あるということでしょうか。まず遺伝学をやるのにゲノムサイズが半分というのは魅力です。フグはもっと単純といっても、実験室で発生や遺伝の実験はできない。それにメダカには近縁種が多くこれも有用です。何をさておき野外に手近に自然集団がまだ存在していることが、これからの可能性を秘めていますよね。

文 献

- 1) 江上信雄:メダカに学ぶ生物学, 中公新書 (1989)
- 2) MedakaFish Homepage: <http://biol1.bio.nagoya->

- u.ac.jp:8000/
 3) THE FISH NET: <http://zfsh.uoregon.edu/index.html>
 4) Puffer Fish Website: <http://fugu.hgmp.mrc.ac.uk/fugu/pf/pf.html>

- 5) Meyer, A.: *Nature*, 391, 225-228 (1998)

Hiroshi Hori, 名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻 (〒464-8602 名古屋市千種区不老町)

メダカの地域集団・近交系・突然変異系統

若松佑子・尾里建二郎

I. 実験生物としての特徴

メダカは大きさからいえば脊椎動物としては最小の部類に入る。サイズが2~3 cm, 性成熟まで3カ月, 卵は透明で通年産卵, 野生集団が日本のどこにでもいる, 近縁種がアジア地域に広く分布している, などのことから, 手軽で便利な実験動物として生物学のほとんどあらゆる分野で用いられてきた。最近ではゲノムサイズが哺乳動物の1/5であることも注目されている。

研究が高度化すれば系統動物が必要とされるのは自然の流れであって, メダカには魚類では類をみない多様な系統が開発され, 保存されてきた。それらは4つに大別できる。①日本産の野生の地域集団系統およびアジア地域に分布する近縁種系統は種分化の初期過程の研究には絶好の材料である。②突然変異系統はゼブラフィッシュで有名であるが, これらはほとんど誘発突然変異である。メダカの自然突然変異系統の集積はその点でユニークである。これらの自然突然変異はさまざまに組み合わされ, コンジュニック系統に発展するなど, より高度の研究に用いられる系統が作出されてきた。トランスポゾンなども自然突然変異の利点を巧みに利用して発見されたものである。③多くの近交系統が開発されてきたが, 魚類でこれだけ近交系があるのはメダカだけである。④トランスジュニック・メダカの系統化が始まっている。

次に現在保存されている系統の概略について述べるが, これは5つの研究機関からのメソに基づいてまとめたので, 記載についてはやや統一を欠いていること

をお断りしておきたい。

II. 系統保存の現状

1. 野生集団と突然変異を中心とした系統保存

A. 東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻

(1) 保存系統の種類・数量

●野生ストック

Oryzias latipes (各採集地 50 匹前後)

南日本集団: 東日本型 (21 地域), 山陰型 (7 地域), 瀬戸内型 (16 地域), 北九州型 (4 地域), 西南九州型 (3 地域), 琉球型 (3 地域)

北日本集団 (14 地域)

ハイブリッド集団 (5 地域)

東韓集団 (3 地域)

中国-西韓集団 (3 地域)

●突然変異系統 (各系統数十匹)

自然突然変異系統

- (a) *b* 遺伝子座: *b*, *B*⁺, *B*^{ca} (キャロライナメダカ), *b*⁺, *b*^d, *b*^{dm}, *b*^{dm}, *b*^{dm}, *b*^p
 (b) その他の遺伝子座: *i*, *i*⁺, *i*-3, *apt1*, *Da*, *gu*, *lf*, *pl*, *r*, *wl*
 (c) 多重劣性同型接合体: *b/b*; *gu/gu*; *lf/lf* (T3), *b/b*; *gu/gu*; *lf/lf*; *ib/ib*; *wl/wl* (T5), *b/b*; *gu/gu*; *pl/pl*; *r/r* (T4), *b/b*; *gu/gu*; *r/r*; *X^u/Y⁺* (Qurt), *b/b*; *X^u/Y⁺* (シロアカメダカ)

誘発突然変異系統

- (a) *b* 遺伝子座

発したもの8系統、ヒメダカの個体から出発したもの3系統がある(メダカホームページ参照)。野生型体色のHNI系統は標準系統として多くの研究室で用いられている。それぞれ、アイソザイムパターン、体型、繁殖力、放射線に対する感受性、脳の形態、行動(無重力下での遊泳など)などにおいて異なる。

●誘発突然変異メダカ

近交系ヒメダカHO4Cを出発材料として、雄成魚の放射線照射および化学物質処理による誘発突然変異が約30系統収集されている(メダカホームページ参照)。変異系統の収集は現在も続行中である。変異系統の大部分は形態形成と行動(遊泳)にかかわる劣性致死突然変異である。その詳細は近いうちに論文発表される予定である。すでに公表されたものは、脳軸が屈曲するものなどを合わせて4種ある²³⁾。系統は前述のようなペア飼育または、ヘテロ雄精子凍結保存により維持されている。

(2) 系統保存の組織、設備

近交系メダカは放射線医学総合研究所の支援と研究者1名および非常勤の研究支援者数名の努力により、個体の雄雌ペア交配飼育で維持されている。突然変異についてもペア飼育あるいは、ヘテロ雄精子凍結保存により維持されている。飼育場所は温度管理された人工照明下の屋内施設(約150 m²)と屋外の池(約150 m²)である。

(3) 系統の開発方法、保存方法、利用方法

保存方法：系統は前述のようなペア飼育あるいは、ヘテロ雄精子凍結保存により維持されている。

利用方法：正式な分譲サービスは組織制度として確立されていない。しかし、研究目的であるならば、国内外を問わず無償で分譲している。分譲のための用務すべては、研究者が自らの研究時間を削ってサービスしているため、受精卵の郵送という簡便な方式で配布している。突然変異についても既公表のものについては、同様にして分譲している。

(4) 分譲依頼方法

近交系メダカおよび誘発突然変異メダカ
連絡先：〒263-8555 千葉市稲毛区穴川4-9-1
放射線医学総合研究所生物影響研究部 石川裕二
Tel. 043-206-3085 FAX 043-255-6497
E-mail: ishikawa@nirs.go.jp
料金：無料。メダカホームページに情報あり。カタログなし。受精卵の郵送を原則としている。電話ではなくFAXによる依頼が望ましい。

3. 自然突然変異を中心にした系統保存：名古屋大学生物分子応答研究センター

(1) 系統保存の種類・数量

●自然突然変異系統

旧理学部淡水魚類系統保存実験施設からひき継いだ、100系統の日本メダカの自然突然変異を保存している。これらのなかには、約70年間にわたって維持されてきているものや、故山本時男博士によって1947年に作出され、性の決定機構の研究で世界的に有名になった、雌の体色が白く、雄が赤い“シロアカメダカ”といった系統もある。大半は故富田英夫博士によって、1960年代以降に野生集団や市販ヒメダカの交配の過程で見つめられたものである。すべて自然突然変異で、その内訳は、60%が体色に関するもの、30%が形態に関するもの、10%が行動に関するものである。ほとんどが劣性遺伝子の突然変異であるが、ホモ接合体で生存可能である(保存系統のリストは文献5とメダカホームページを参照)。

●トランスジェニック系統

京都大学木下政人博士によって作出された3種類のGFP導入メダカの系統化を行なっている(図1)。このような遺伝子導入メダカの系統化は先端技術による新しい遺伝子資源の保存として注目される。

(2) 系統保存の組織、設備

組織：教官1名、技官1名、非常勤職員1名。

設備：野外面積800 m²に1×5 m角タンク400個、屋内飼育室90 m²に自動飼育装置20台に500個の水槽を設置している。

(3) 系統の開発方法、保存方法、利用方法

保存方法：これらの系統はすべて、閉鎖集団として、1系統につき100~200個体が野外飼育場の2~3個の水

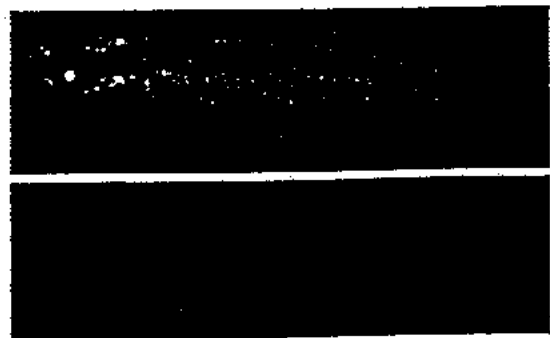


図1 メダカベータド鎖伸長因子1α-GFPを導入したF₁(上)とメダカβアクチン-GFPを導入したF₁(下)
(木下政人原図、投稿準備中)

槽に分けて飼育されている。近い将来、精子の凍結保存によっても保存する予定がある。一部の系統は室内の人工的な環境でも飼育されている。

(4) 分譲依頼方法

国内だけでなく海外からも、分譲の希望が多数寄せられている。すべて無償である。トランスジェニックについては現在準備中である。

問合せ・申込先：〒464-8601 名古屋市千種区不老町
名古屋大学生物分子応答研究センター純系動物開発
研究分野 若松祐子
Tel. 052-789-4294 FAX 052-789-5053

4. *O. latipes* 近縁種(アジア種)を中心にした系統保存：信州大学理学部生物科学科

(1) 保存系統の種類・数量

信州大学では故宇和統教授が東南アジアから精力的に収集した数多くの系統が保存されていたが、最近、これらの系統を研究対象とする研究者がなく、その維持が岐路に立たされている。保存している機関の研究者がこれらの系統を研究対象としているときはきほど問題を生じないが、研究者がおらず、また、いつそれらを材料とする研究者が現われるか明らかでないとき、その維持はボランティア活動となる。実験動物の系統は国内だけでなく世界中の研究者の財産でもある。それらの維持にあたってそれぞれの機関はなみなみならぬ努力を払っていることと思う。このように重要な系統保存を不安定なボランティアに依存するのではなく、組織的にこれにあたる必要があり、保存のための設備、予算および人員確保を国に働きかけていく必要がある。

● *O. latipes* 近縁種 (アジア種)

種名、産地(州名、国名、大まかな尾数)を記載。

- ① *O. melastigma*
Chidambaram, Tamil Nadu, India (15)
- ② *O. javanicus*
Tamaanroya, Sulawesi, Indonesia Singapore(>100)
- ③ *O. minutillus*
Bangkok, Thailand (>100)
Chiang Mai, Thailand (>150)
Chumphon, Thailand (>50)
Pak chong, Thailand (>30)
Rayong, Thailand (>50)
Chai Nat, Thailand (20)
Saraburi, Thailand (>20)
Ratchaburi, Thailand (>30)
- ④ *O. mukongensis*

Si Sa Ket, Thailand (>50)

- ⑤ *O. latipes*
Naa-ri, Korea
Yunghwa-ri, Korea
Tangam-ri, Korea (4)
Pojon-ri, Korea
Myongsan-ri, Korea
Hwajon-ri, Korea
- ⑥ *O. latipes sinensis*
Shanghai, China
Beijin, China
Kunming, China (2)
Dali, China
Nae-ri, Korea
Chodong-ri, Korea
- ⑦ *O. curvinotus*
Hong Kong (>20)
- ⑧ *O. luzonensis*
Solsona, Philippine (>60)
- ⑨ *O. celebensis*
Ujung Pandang, Sulawesi, Indonesia (>20)
- ⑩ *O. nigrimas*
Lake Poso, Sulawesi, Indonesia (>50)
- ⑪ *O. malanensis*
Lake Matano, Sulawesi, Indonesia (>20)
- ⑫ *O. marmoratus*
Lake Towuti, Sulawesi, Indonesia (>50)
- ⑬ *O. profundicola*
Timampuu, Lake Towuti, Sulawesi, Indonesia (10)

● 地方集団、スワメダカ(50)、その他、近交系、自然突然変異系統

(2) 系統保存の組織、設備

組織：教官3名、行Ⅱ職員1名(学務係と兼任)

設備：温室2(角7m²、冬季は加温しているが、不十分なため投げ込みヒーターを併用)、温室1(23m²、加温設備なし)、コンクリート水槽8個、プラスチック水槽128個。

(3) 分譲依頼方法

問合せ・申込先：〒390-0802 松本市旭3-1-1
信州大学理学部生物科学科 小野里垣
Tel. 0263-37-2497 FAX 0263-37-2560

III. 今後の展望

メダカの系統保存の現状がこのような形でまとめられたのは実はこれが初めてである。ここで明らかになったのは実に多様な系統が研究者個人の努力によって、

辛うじて保存されていることである。そこからみえてくるのは次のようなことである。① 系統保存のための予算、人員、施設が絶対的に貧困である。それらが充実されなければ、メダカの系統保存は近い将来消滅せざるをえない。② これまでの系統保存は収集したものは捨てないで保存するという精神によっている面が少なくない。これはこれで貴重であるが、保存できる規模に限界がある以上、今後は目標を明確に定めた系統保存が必要なのではないか、③ そのためには保存に携わっている研究機関の有機的な連携が実現される必要がある。

本稿のために各研究機関での系統保存についてメモをいただいた東京大学 菊 昭雄、島田敦子、新潟大学 篠原 満、放医研 川口 浩二、信州大学 小野里坦、高田啓介、柴田直樹の諸氏に感謝いたします。

文 献

- 1) Hyodo-Taguchi, Y.: *The Fish Biology J. Medaka*, 8, 11-14 (1996)
- 2) Ishikawa, Y., Hyodo-Taguchi, Y.: *The Fish Biology J. Medaka*, 7, 47-48 (1995)
- 3) Ishikawa, Y.: *Neurosci. Res.*, 24, 313-317 (1996)
- 4) 「Medakafish」ホームページ <http://biol1.bio.nagoya-u.ac.jp:8000/>
- 5) Tomita, H.: *The Fish Biology J. Medaka*, 4, 45-47 (1992)

そのほか系統に関する参考書: 江上信雄・山上健次郎・嶋 昭雄(編): *メダカの生物学*, 東京大学出版会 (1990); 岩松廣司: *メダカ学全書*, 大学教育出版 (1993)

Yuko Wakamatsu, Kenjiro Ozato, 名古屋大学生物分子応答研究センター純系動物開発研究分野 (〒464-8601 名古屋市千種区不老町)

お知らせ

(財)神奈川科学技術アカデミー 平成10年度 第III期 受講生募集

◆免疫・アレルギー疾患の免疫細胞生物学コース——その基礎的理解と臨床への展開

カリキュラム編成者: 富岡秋夫 (東邦大・医)

コースの特色・ねらい: 免疫アレルギー疾患の病態解明を念頭において、細胞を中心に分子レベルから細胞、組織、臓器あるいは個体レベルでの最近の進歩を基礎研究および臨床研究・診療に携わっている専門の先生方から概説していただきます。対象となる疾患は、気管支喘息などのアレルギー疾患、自己免疫疾患、その他でこれから治療薬を開発しようとしておられる企業・大学等の研究者、およびこれらの病気の治療に携わっておられる医師を対象としたカリキュラムになっています。

講義日: 10月13, 16, 17, 23, 24の5日間

おもなカリキュラム内容: 免疫病理学概論/免疫応答の誘導における樹状細胞の機能・分化・動態/マクロファージ (抗原提示細胞による自己・非自己認識機構)/T細胞活性化の制御/アレルギー疾患とT細胞/自己免疫疾患とT細胞/B細胞活性の調節機構/B細胞分化とクラススイッチ/B細胞におけるIL-4とCD40シグナリング/アレルギーのコンダクターとしてのマスト細胞/マスト細胞と好塩基球の培養方法/好塩基球の生物学——up to date/好塩基球と遅発型アレルギー反応/アレルギーの炎症細胞として好塩基球/まとめ・ディスカッション

受講料: 65,000円, KAST 法人賛助会員 (事務所単位)・神奈川県内中小企業 53,000円

申込締切: 平成10年9月21日(月)

◆基礎から臨床への展開までを学ぶ遺伝子診断コース——

検査と診断の進め方及び主要疾患への応用

カリキュラム編成者: 河合 忠 (自治医大名誉教授)

コースの特色・ねらい: これから遺伝子診断を研究しようとする研究者、遺伝子診断分野に参入しようとする企業開発担当者に対して、必要な基礎知識、遺伝子変異を見つけようとする方法、その結果をどのように遺伝子診断に生かすかを学びます。

講義日: 12月7, 8, 9, 14, 15, 16の計6日

おもなカリキュラム内容: 遺伝と遺伝子と染色体/遺伝子検査の進め方/遺伝子検査技術の最近の進歩/遺伝子病の遺伝子解析のアプローチ (総論及び染色体異常を伴う疾患/染色体異常が明確でない疾患/多因子遺伝病)/遺伝子検査のバイオハザードと情報管理 (見学)/遺伝子診断各論 (感染症/神経系疾患/代謝疾患/悪性腫瘍/ミトコンドリア病/出生前診断)/倫理的・社会的問題/遺伝子診療部の役割/総括と意見交換

[施設見学] エスアールエル遺伝子・染色体解析センター

受講料: 71,000円, KAST 法人賛助会員 (事務所単位)・神奈川県内中小企業 57,800円

申込締切: 平成10年10月19日(月)

*上記の目的のほかに技術と社会の接点に関するテーマの「特別講義」1日(11月中旬予定)が加わります。

問合せ先・おもな講義場所: 〒213-0012 神奈川県川崎市高津区坂戸3-2-1 KSP西棟6F

(財)神奈川科学技術アカデミー 教育部教育研修課

Tel. 044-819-2033 FAX 044-819-2026

E-mail: kast-ed@net.ksp.or.jp

<http://home.ksp.or.jp/kast/>

8. 奇形カエルと内分泌攪乱化学物質

広島大学理学部附属両生類研究施設
分化制御機構研究部門 中村 正久

1. 序文

最近、世界各地でカエルの絶滅や急減、奇形の発生が報告されている。オーストラリアでは調査種のうち 29 %、カナダでは 14 %、チリでは 34 %にも及ぶ種が絶滅の危機にさらされている。また、奇形の発生は、北米やカナダでも報告されており、日本でも北九州市山田緑地では 10 %の出現率で過剰肢のカエルが発見されている。カエルの減少、及び奇形の発生は、人間による自然破壊や活動産物による生息地の減少、オゾン層破壊による紫外線増加、酸性雨、病気、寄生虫などに加え、内分泌かく乱物質などの化学物質が要因として挙げられており、これらの要因が複合的に作用している可能性もある。

カエルなどの両生類は生態系で重要な位置を占めており、世界的な生息数の減少や奇形の多発は必然的に生態系全体に大きな影響を与える恐れがある。さらに、カエルに代表される種の絶滅の危機は人類に環境因子が悪影響を及ぼしているという危険信号に恐れ、早急にこの問題を解決する必要がある。このような状況にあって両生類に対する内分泌かく乱物質の影響は殆ど調査されていないのが現状である。

2. 北米における奇形カエルの出現

奇形カエルの出現が大きな社会的話題となったのは、1995 年 8 月、野外旅行に行った中学生が北米のミネソタ州南部の農場の湿地で多数の奇形カエルを発見したのが発端である。彼等が捕まえたヒョウガエルの約 50 %が奇形であったが、場所によっては 67 %もの高率で奇形カエルが出現した。この報告を受けてミネソタ州公害規制局の職員がその年の 9 月にミーカー郡クロウ川から少し離れたところで 91 匹の小型奇形カエルを捕獲した。それ以来、同州の中央にある 4 郡でも見つかった。当初、奇形カエルの種類はヒョウガエルだけであったが、その後、太平洋アマガエル、灰色アマガエル、ヒキガエルなど多くのカエルやサンショウウオに奇形が見つかった。奇形は殆どが後肢異常で生後 1 年以内の幼若カエル（平均体長 37.4mm）であった。後肢異常には発育不全、片肢欠損、過剰肢、肢甲過剰などに加え、目の欠損など多様であった。ミネソタ州で観察されたヒョウガエルについて Helgen et al. (In "Status and Conservation of Midwestern Amphibians" Ed by Lannoo M.J., p.279-297, 1998. University of Iowa Press) は次のように述べている。1995 年 8 月から 9 月にかけてミネソタ州公害規制局の職員と McKinnell R. が捕獲したヒョウガエルの奇形は、殆どが後肢異常であった。奇形の原因究明には、・何時、どこで奇形誘発剤に出会ったか、・発生異常原因候補物質が発生過程のどの時期に存在していたか、・どの薬剤が実際に検出されているか、などを明らかにする必要がある。薬剤によってホルモン遺伝子

の発現が乱れ、その結果、異常が発生する可能性があるので、DNA 含量、染色体分析、組織病理などの解析も必要であると述べている。話題になった奇形カエルはミネソタ州だけで発見されているわけではない。北米バーモント州でも 1997 年 7 月に奇形カエル（ヒョウガエル）126 個体が捕獲された。奇形の内訳は、後肢部分或いは完全欠損 65.4%、指部分或いは完全欠損 21.1%、前肢部分或いは完全欠損 8.4%、目異常或いは完全欠損、その他 0.07%となっている（Kaiser J. Science 278: 2051-2052, 1997）。従って、何がこのような奇形を引き起こすのか、市民、報道関係者、研究者等が一体になって原因究明に取り組むべきであると結論している。奇形カエルの情報は北米ではインターネットで得ることができる（<http://www.npwrc.usgs.gov/narcam>）。現在では、奇形カエルは北米の 36 州、またミネソタ州では 60 郡で発見されている。発見された地域についても、インターネットで情報を得ることができる（図 1、図 2）。

3. 日本における奇形カエルの出現

奇形カエルの出現は、北米、カナダだけでなく日本でも発見されている。奇形カエルが話題になったのは 1995 年 6 月 10 日に福岡県北九州市小倉北区山田町の通称、「山田緑地」の公園において 6 本足のヤマアカガエルの幼体 1 匹を小学生が捕獲したのが発端である。同年 6 月に同じ場所で、7 匹の過剰肢を持つ幼体が武石（北九州市立自然史博物館員）によって捕獲されたのが契機となって過剰肢カエルの出現に関する調査が始まった。山田緑地（140ha）は自然公園で山田弾薬跡地（352ha）の集水域のひとつを占めている。同跡地は、旧日本陸軍によって 1934 年から弾薬庫として使われてきたが、1945 年には在日米軍に接収され、その後、1972 年まで弾薬庫として使用されている。その後は大蔵省の管理下で放置されていたが、1995 年 5 月から、跡地の一部が公園となり市民に開放されている。

1999 年 1 月、武石によって北九州市山田緑地の過剰肢カエルの調査結果がまとめられた。その内容を紹介すると、1995 年と 1996 年に山田緑地で捕獲されたヤマアカガエル 1872 匹の中に、115 匹の四肢異常カエルが見つっている（表 1）。ニホンアカガエル幼体にも外部形態異常が見つかり、四肢異常の分布状況は前後肢の部分及び完全欠損を含め多様である（表 2）。ニホンヒキガエル幼体についても同様に、1996 年に捕獲したものでは、1.37%の割合で異常肢が見つっている（表 3）。1997 年にも異常肢ヤマアカガエルが見つっているが、その頻度は 1.3%である。日本における過剰肢カエルの発見は北九州市山田緑地が最初ではない。山田緑地で頻度と個体数が多いことから特に話題になったことは事実であるが、古くは 1928 年 8 月 7 日青森県弘前市で過剰肢アオガエルが報告されて以来、現在までに 10 種 26 件の事例が報告されている（表 5）。しかし、三郷市在住大内氏によると、少なくとも 1 年間に 20 ～ 30 匹の異常肢カエルを発見するので、実際はこの数よりもかなり多いものと思われる。異常肢カエルの実態を知るには北米のようなインターネットによる情報収集が必要である。また、武石（1999）は山田緑地以外の場所における過剰肢ヤマアカガエルの出現状況を調査している。それによれば、山田緑地が 12.9%の出現率であるのに対し、他の地域では 0.04%と非常に低い（表 6）。この結果からも山田

緑地の過剰肢カエルの出現率が異常に高いのが分かる。さらに、武石は山田緑地産のヤマアカガエル卵塊から発生したカエルに過剰肢を持つものがあるかどうかを検討している。それによると、卵塊からも過剰肢カエルが出現している（表7）。しかし、これが遺伝的なものかどうかは不明であった。そこで、山田緑地産過剰肢ヤマアカガエルの発生原因を明らかにするため、ヤマアカガエルとニホンアカガエルのカエル成体 49 匹を捕獲し、体内の化学物質濃度を分析した。その結果、この2種の雄カエルの全個体から DDT 類が検出された（表8）。しかし、低質・土壌試料には TCDD、PCB、TNT 代謝物は検出されなかった（門上、武石、第7回日本環境化学会講演要旨集、1998 年）。従って、異常肢の原因候補物質が内分泌かく乱物質である可能性も否定できない。

以上が山田緑地で発見された過剰肢カエルに関する情報である。この情報はまだ、一般公開はされておらず、やはり、日本における情報の収集と公開の遅れが気になる。

4. 国内外における形態異常カエル発生原因の究明

日本における形態異常カエルの発生原因の究明は全く行われていないと言っても過言ではない。最近、内分泌かく乱物質による生殖系異常の原因究明が始まったばかりである。国外においては、特に北米で活発に研究が行われている。北米では従来からカエルの生態数や生態の研究が盛んであったが、1995 年のミネソタ州での奇形カエルの発見以来、形態異常カエルの発生原因を追及されるようになった。現在、北米では、カリフォルニア大学（レチノイド説）、ミギル大学（カビ説）、環境保護庁中部大陸生態部門（紫外線説）、ミネソタ大学（発生状況調査）、地質調査所野生生物調査センター（内分泌かく乱物質説）、NIH（内分泌かく乱物質説）、ミネソタ州公害規制局（環境調査及び原因究明の総括）などの機関で多角的な研究が進行している。原因候補物質について現在までの研究成果をまとめてみる。

4-1. レチノイド

レチノイン酸（RA）はビタミン A に由来する脂溶性の小さな物質で脊椎動物の胚発生過程で重要な調節分子である。このことは、ビタミン A 欠乏或いは過剰動物に奇形が生じること（Wilson J.G. et al., *Am. J. Anat.* 92:189-217, 1953）、内因性レチノイドがアフリカツメガエル（Durstion A.J. et al., *Nature* 340: 140-144, 1989）、ニワトリ（Thaller C. & Eichele G., *Nature* 327: 625-628, 1987）、及びマウス（Satre M.A. & Kochher D.M., *Dev. Biol.* 133: 529-536, 1989）の胚に存在すること、胚細胞内に細胞質及び核内 RA 受容体が存在すること、それらは胚形成過程で異なった発現パターンを示すこと、ニワトリ肢芽前部をこの物質で処理すると重複肢が誘導されること（Tickle C. et al., *Nature* 296: 564-565, 1982）、マウス初期胚を処理すると椎骨パターンに乱れが生じること（Kessel M. & Gruss P., *Cell* 67: 89-104, 1991; Kessel M., *Development* 115: 487-501, 1992）などから支持される。また、レチノイドは胚発育因子のひとつとも考えられている。胎生期投与された RA は脊椎動物の正常な骨格形成を乱す作用がある。この作用はすべて薬理的濃度で起きるが、これらの結果は、正常な発生過程でも RA が重要な役割を果たしていることを示唆している。当初

の実験では、ニワトリ肢芽の後部に極化域と呼ばれる領域があり、この領域を肢芽前部に移植すると手指骨のパターンが反転するのでこの領域には前後軸方向の軟骨パターンを決めるモルフォゲンの産生源で、当初は RA がその本体とされていた。しかし、最近の報告では、ショウジョウバエの肢形成を指示する分泌蛋白質をコードする hedgehog (hh) 遺伝子に相同な Sonic hedgehog (Shh) がモルフォゲンの本体で、この分泌蛋白を介して新しい前後軸をつくりだしていることが判明している (Riddle, R.D. et al., Cell 75:1401-1416, 1993)。RA の作用機序は不明であったが、1987 年に RA 情報伝達経路の最初の担い手である RA 受容体 (RAR) が同定されて以来 (Petkovich M. et al., Nature 330:444-450, 1997; Giguere V. et al., Nature 330: 566-569, 1997)、急速に研究が進んだ。RAR はステロイドホルモン、甲状腺ホルモン受容体スーパーファミリーに属する核内転写因子である。そのなかでも甲状腺ホルモン受容体 (TR) (Mangelsdorf D.J. et al., Cell 83: 835-839, 1995) と最も近縁であることが分かった。現在まで少なくとも 3 種類の RAR サブタイプ (α, β, γ) が見出されている。マウス四肢形成過程においては、 α, γ タイプは胎生 10 日目の肢芽に均一に分布しているが、 β タイプは存在していない。その後、 γ タイプは軟骨細胞と分化中の皮膚に、 β タイプは指内間充織に見られる (Dolle p. et al., Nature 342: 702-705, 1989)。このことはマウスの肢の形態形成及び分化に RA と 3 つのタイプの RAR α, β, γ が時期及び場所特異的に関与していることを示している。両生類のアフリカツメガエルでもこれらの受容体の遺伝子は単離され (Blumberg B. et al., PNAS 89: 2321-2325, 1992)、卵及び初期胚では α -オキシレチノールアルデハイドが主要な受容体活性物質である (Blumberg B. et al., PNAS 93: 4873-4878, 1996)。当初、RAR α 遺伝子ノックアウトマウスが作られたが顕著な差は見られなかったので、RAR 遺伝子群のダブルノックアウトマウスを作製したところ、これらのマウスは、胎生期及び生後すぐに致死性を示すものから全身の臓器に異常があるものまで、多種多様の表現型をもっていた (Kastner P. et al., Cell 83: 859-869, 1995)。これらの結果から RA の重要性が再認識された経緯がある。また、RAR の機能を欠失した遺伝子を軟骨組織特異的に強制発現させてやると、外見的に奇形は見られなかったが、同腹マウスよりも約 20% はどこか小さく、成長過程で軟骨細胞での RA シグナルをブロックすると骨の発育異常が生じる。これはビタミン A 欠乏動物の症状と同じであった。このことは RA が正常な骨の発育に関与していることを示している。RAR α (-/-), γ (-/-) ダブルノックアウトマウスでは、ほぼ 100% の出現率で顔面の奇形が観察されること、また四肢の奇形も高頻度に見られる (Lohnes D. et al., Development 120: 2723-2748, 1994)。現在までに、RA は器官形成に関わる多くの遺伝子と密接な関係があることが分かっている (図 3)。

両生類に対するレチノイドの作用に関しては、1968 年にヒキガエル (*Bufo andersonii*) のオタマジャクシにビタミン A を投与すると尾部の再生が遅れることが見出された (Niazi I.A. & Saxena S., Experientia 24: 852-853, 1968)。その論文には再生を遅らせるような物質、例えば、カテプシン様蛋白分解酵素の放出が促進されるためだろうと述べられているが、尾の退縮が甲状腺ホルモン (TH) の支配下にあることを考えると、TH 受容体を介した情報伝達系にレチノイドが関与していることを示唆している。ビタミン A による過剰肢形成は 1992 年にインド産のカエルを用いて行った実験が最初である。フウセンガエル (*Uperodon systoma*) の尾部を切断してビタミン A 含水で飼育すると、その切断部から肢

が形成されるというショッキングな事実が報告された (Mohanthy-Hejmadi P. et al., Nature 355: 352-353, 1992)。この現象は、ヨーロッパアカガエル (*Rana temporaria*) を用いた実験でも確認されている (Maden M., Dev. Biol. 159: 379-391, 1993)。彼等によれば、このカエルのオタマジャクシをビタミン A で処理すると、濃度、処理時間、発生時期依存的に尾から指の数が 1 本から 9 本の肢が左右に生える。彼はこの過剰肢の原因として甲状腺ホルモンを介したレチノイド反応系が関与しているのではないかと結論している。その他、アホロートルの再生肢芽ではレチノイド濃度勾配があり、後部は前部の 5 倍の RA が存在するが (Scadding S.R. & Maden M., Dev. Biol. 162: 609-617, 1994)、アフリカツメガエルではこのようなことはない。

4-2. 寄生虫

これまでの報告を考慮すると、カエルの過剰肢は少なくとも一部はレチノイドが原因であると考えられる。しかし、1999 年 4 月 30 日号のサイエンス誌に非常に面白い論文が掲載された。Sessions et al. (Science 284: 800-802, 1999) は北米 12 カ所、カリフォルニア、オレゴン、アリゾナ、ニューヨーク州から 5 種のカエルを集め、過剰肢のパターンを分類してレチノイドによって起きるパターンとを比較した。彼等は、過剰肢の出現が高頻度で見られる太平洋アマガエル (*Hyla regilla*) を 1997 年から 1998 年にかけて捕獲し、391 匹の肢形態を分析した。その結果、それら 391 匹では 2 重複肢と 3 重複肢が前後対称型のタイプに分かれたが、これらの形態はレチノイドに起因する重複肢の形態とは全く異なっていた。従って、少なくとも太平洋アマガエルの重複肢に関してはレチノイドが原因ではないと結論している。また、同号のサイエンス誌にカエルの過剰肢の原因について別の興味ある論文が掲載されている。スタンフォード大学の Johnson ら (Johnson P.T.J. et al., Science 284: 802-804, 1999) は太平洋アマガエル (*Hyla regilla*) 過剰肢とある種の吸虫 (*Ribeiroia* sp.) の関係について論じている。彼等は 1996 年から 1998 年にかけてカリフォルニア州のサンタクララ郡にある 35 の池で形態異常ガエルの実態を調査した。太平洋アマガエルが棲息している 13 の池のうち 4 つの池で重症の異常カエルが見られ、その 4 つの池のうち 2 つの池では 15%~45% の高頻度で過剰肢や後肢異常が観察された。これらの池の水質検査では PCB などの殺虫剤や重金属は検出されなかった。また、その池で採集した 200 個の太平洋アマガエル卵を実験室に持ち帰って飼育しても異常はまったく見られなかった。興味あることに、市当局が 35 の池を解析したところ、4 つの池だけに太平洋アマガエルと水カタツムリの第一宿主である吸虫 (*Ribeiroia* sp.) が棲息していることが分かった。4 つの池から捕獲したカエルにはその吸虫 (*Ribeiroia* sp.) と別種の吸虫のメタセルカリア (ジストマまたは吸虫の終末期の有尾仔虫で、水中ではメタセルカリアとして水草または魚類の表面に嚢胞を形成し、これが動物のジストマや吸虫の感染源となる) が寄生していた。吸虫 (*Ribeiroia* sp.) のメタセルカリアの体内分布には特徴があった。吸虫は腰帯と後肢周辺の組織に寄生しており、異常及び過剰肢と密接な関係があることを示唆していた。そこで、彼等は太平洋アマガエルと吸虫 (*Ribeiroia* sp.) が後肢異常の原因と考え、オタマジャクシを吸虫 (*Ribeiroia* sp.) のいる水で飼育した。その結果、彼等の推測どおり、吸虫 (*Ribeiroia* sp.) の数を多くすると異常肢の出現と致死率が上昇した。300km 離れた地域に棲んでいる太平洋アマガエルではこのような異常肢のカエルは

出現せず、別の吸虫 (*Aralia mustelae*) と飼育しても何の影響もなかった。実験によって観察された異常は後肢異常だけで頭部異常や前肢異常はなかった (図 4 参照)。北米では、吸虫 (*Ribeiroia* sp.) によるカエルの過剰肢形成や生息数の減少については殆ど調査されておらず、現在のところ吸虫と過剰肢の因果関係は明らかではない。その他のカエルについて同様の実験は行われていないが、奇形ウシガエル (*Rana catesbeiana*) や西洋ヒキガエル (*Bufo boreas*) にもこの吸虫 (*Ribeiroia* sp.) が寄生していることが確認されている。この吸虫 (*Ribeiroia* sp.) が最近話題になっている異常カエルの発生原因であるとすれば、環境変化によって吸虫の数の増加か、或いは水カツムリの増加によるものと思われる。また、有機物質汚染や軟体動物の捕食者がいなくなったため、このような吸虫の寄生が増えたことも考えられる。現在のところ、他の動物に対する吸虫 (*Ribeiroia* sp.) の分布、生活史、病原性については明らかではない。いずれにしても吸虫の寄生がカエルの生存率や奇形率に大きく関わっていることは事実で、この点に焦点を当てて研究をすることが望まれると結んでいる。しかし、吸虫の寄生だけが異常肢カエルの原因でないことは衆目の一致するところである。何故ならば、北米で最初に報告されたミネソタ州では、カリフォルニア州やオレゴン州で見つかった吸虫 (*Ribeiroia* sp.) が確認されていないからである。

4-3. 紫外線

最近まで紫外線 (UV) が異常肢の発生原因である証拠はなかった。1998 年 5 月 5 日付けの政府の発表文書で紫外線照射でカエルの肢が指欠損になったと報告されただけであった。しかし、自然で見つかった指のない肢は 90% 以上が先太というよりむしろ先細であり、しかも両肢異常で、実験室で起きた紫外線による異常肢は自然で見つかったものとは異なっていたため、紫外線が異常肢の発生原因とは言えないとしている (Gardiner D.M. Univ. Calif., Irvine, 私信)。従って、紫外線が異常肢の原因であることを述べた報告は少ない。Blaustein A.R. et al. (PNAS 94: 13735-13737, 1997) は、紫外線を遮断してサンショウウオ (*A. macrodactylum*) の胚を飼育すると紫外線照射したものより奇形は少なく、発生速度も速いという報告をしている。紫外線は致死率を増加し、有意に前後浮腫と尾部奇形を誘発するという報告であるが、異常肢の出現については言及していない。Ankey G.T. et al. (Environ. Toxicol. Chem. 17: 2530-2542, 1998) は、ヒョウガエルを用いた紫外線の影響は、受精後 15~24 日に照射すると最も大きく、奇形発生と紫外線強度には量-反応関係があり、紫外線によって肢芽の先端上皮細胞が破壊されることが肢の奇形につながると考えている。さらに、紫外線照射には種差があり、ミンクカエルやアオガエルはヒョウガエルよりも耐性があることも述べている。しかし、実験室レベルでは紫外線は両後肢異常で対称型であり、このような対称型異常肢は自然界では殆ど見られない。従って、紫外線が野外で発見される異常肢の原因である可能性は低いと思われる。

4-4. 化学物質

化学物質がカエルの胚を異常にするという報告は数多い。インターネットを利用して検索すると 100 以上の論文が画面にでる。しかし、これは殆どがアフリカツメガエルの胚を化学物質の存在下で飼育すると異常胚になるという、いわゆる FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay - Xenopus) 試験に関する報告である。従って、その物質が形態異常カ

エルの原因候補物質である可能性はあるが高濃度で胚を処理するため、胚は発生せず致死となり、発生後期に起きる現象を調べることができない。北米ミネソタ州当局は発見された過剰肢カエルが棲息した池の水や低質、並びにカエル体内の化学物質を分析し、DDT, PCP, PCB などの農薬や重金属を検出している (Helgen J. et al. ミネソタ州公害規制局奇形カエル検査報告書、1996)。これらの物質を含む水や低質を用いて FETAX 試験を行なうと、生存率と奇形率との間に強い相関関係がある (Fort D.J. et al., 1999; 私信)。DDT の作用について、Hayes T.B. et al. (Environ. Toxicol. Chem. 9: 1948-1953, 1997) は、セネガルウオーキングカエルのオタマジャクシを DDT 含水中で飼育するとステロイドホルモンのコーチコステロンを投与した時と同じ病理変化が現れ、上顎が欠損し、鼻孔も閉じると報告している。DDT 処理群と副腎皮質ホルモン処理群との病理所見が同じというのは興味あるが、その作用機序は明らかではない。また、ヨーロッパトノサマガエルは、農薬トリフェニルチン (TPT) で濃度依存的に生存率と成長が低下し、極めてこの農薬に敏感なカエルであることなども報告されている (Fioramonti E. et al., Environ. Toxicol. Chem. 16: 1940-1947, 1997)。また、農薬カルバリルも低濃度 (3.5mg/L) でヒョウガエルのオタマジャクシの 90 % が死滅するという報告もある (Bridges C.M., Environ. Toxicol. Chem. 16: 1935-1939, 1997)。

殺虫剤については、Bonin J.B. et al. (Herpetological Conservation 1: 246-257, 1997) によるカナダ・ケベック州の分析結果がある。1993 年にトマト畑、トウモロコシ畑、未耕作地の 3 か所から変態中及び変態後のアオガエル (*Rana clamitans*) を捕獲したところ、トマト畑で捕獲したものに多くの後肢奇形を見つけたが、殆どが変態中のカエルであった。血液検査では白血球の増加、血中寄生虫、血球核小型化などが観察されたが、成体は正常であった。しかし、成体及び変態中のカエルいずれも、ゲノムサイズが多様化しており、殺虫剤によってゲノム DNA が断片化したことが窺えた。この結果は、殺虫剤によるゲノム DNA の断片化が奇形や疫病の引き金になっている可能性を示している。そのメカニズムは不明であるが、いずれにしても殺虫剤がカエルの種の絶滅を加速していることは間違いない。

最近話題になっている内分泌かく乱物質とカエルの奇形についての報告はない。内分泌かく乱物質がカエルの性腺発達異常の原因であると報告した論文もない。エストロゲン様物質が両生類の発生 (Nishimura N. et al., J. Expt. Zool. 278: 221-233, 1997) と生理作用 (Palmer B.D. & Palmer S.K. Environ. Health Perspect. 103: 19-25, 1995) に影響を与えることを示した研究がある。前者は、エストロゲンや DES がアフリカツメガエルの初期胚の致死や頭部矮小化、尾部屈曲、腹部肥大などの奇形を引き起こす可能性を示したものであり、性分化に対する影響については何も述べられていない。後者は、エストロゲンや DDT を投与するとアフリカツメガエルの血中ビテロジェニンの量が増加するという報告である。最近、Palmer B.D. et al. (Environ. Toxicol. Chem. 17:30-36, 1998)、並びに Kloas W. et al. (Sci. Total Environ. 225: 59-68, 1999) は、環境汚染物質がエストロゲン様活性をもつかどうかを検定するには、アフリカツメガエルは優れたモデル型となると報告している。今更という気がしないわけではないが、理由は、このカエルがよく知られているように、エストロゲンによって雌化するからである。候補物質のエストロゲン様活性の検定には、・エストロゲン受容体との結合能、・培養肝細胞のエストロゲンに対するビテロジェニン

合成能、・実験系における性分化に対する影響の検討が必要であると述べている。具体的には、エストロゲン、ノニルフェノール、ビスフェノール A などの物質の濃度を変えて雄アフリカツメガエルの培養肝細胞におけるビテロジェニン合成を測定すれば、各物質のエストロゲン様活性の強さと相対的強度が分かる。何故なら卵膜を構成する蛋白のひとつビテロジェニンの合成はエストロゲンの支配下にあるからである。RT-PCR 法という最近の分子生物学的手法を用いればビテロジェニン遺伝子の発現量が多くなっているかどうか簡単に分かるので、その量でエストロゲン様活性を検定することができる。しかし、この検定法には問題がある。確かにアフリカツメガエルはエストロゲンによって雌化するが、ビテロジェニンは卵膜を構成する蛋白のひとつにすぎない。性が雄から雌に転換するには、卵膜を構成する蛋白があれば充分ではなく、精巣を構築する細胞が卵巣を構築するための細胞に性質を変える必要がある。脊椎動物の雌決定遺伝子はまだ発見されておらず、雄決定遺伝子が哺乳類だけで発見されているにすぎない。また、雄決定遺伝子は精巣構築に必要であって、この遺伝子が発現しても精子は形成されない。性腺の構築と配偶子形成には数多くの遺伝子の発現が必要である。従って、アフリカツメガエルの雄培養肝細胞のビテロジェニン合成を指標にしても雌化の機構を解明するには不十分で、物質がエストロゲン活性をもつかもたないかを判定するのに有効なだけである。また、すべてのカエルがエストロゲンで雌化できるわけではない。さらに、アフリカツメガエルは4倍体なので、遺伝子解析が難しい。性腺の発達異常は、性腺を構築する細胞で起きる変化を継続的に観察するのが最も良い。そのための方法を開発すべきである。

5. 内分泌かく乱物質汚染に対する今後の対策

内分泌かく乱物質の汚染を防止するための今後の対策として次の2点を提言する。

5-1. カエルの実態調査と調査ネットワークの構築

現在、カエルの生息数に関しては世界的規模の情報ネットワークがある。また、奇形カエルに関しては北米にネットワークが存在する。これらは共にインターネットを利用した情報収集システムである。しかし、我が国においては、カエルに関する全国規模の科学的な調査は皆無である。内分泌かく乱物質による種々の問題を解決するには、その影響の実態を把握するための全国調査が不可欠である。従って、カエルの個体数の状況、及び奇形発生に関する情報を科学的かつ効率的に収集するシステムを構築して調査を行う必要がある。現在、北米で行われているようなインターネットによる情報収集を行うべきである。これによって、国内外の個人レベルでの情報収集、並びに教育機関、研究所、及び自然史博物館レベルで情報を収集することができる。情報を収集した後は整理して解析し、その情報をインターネットを用いて公開する必要がある。それには、環境庁がホームページを開いたり、両生類研究施設のホームページ

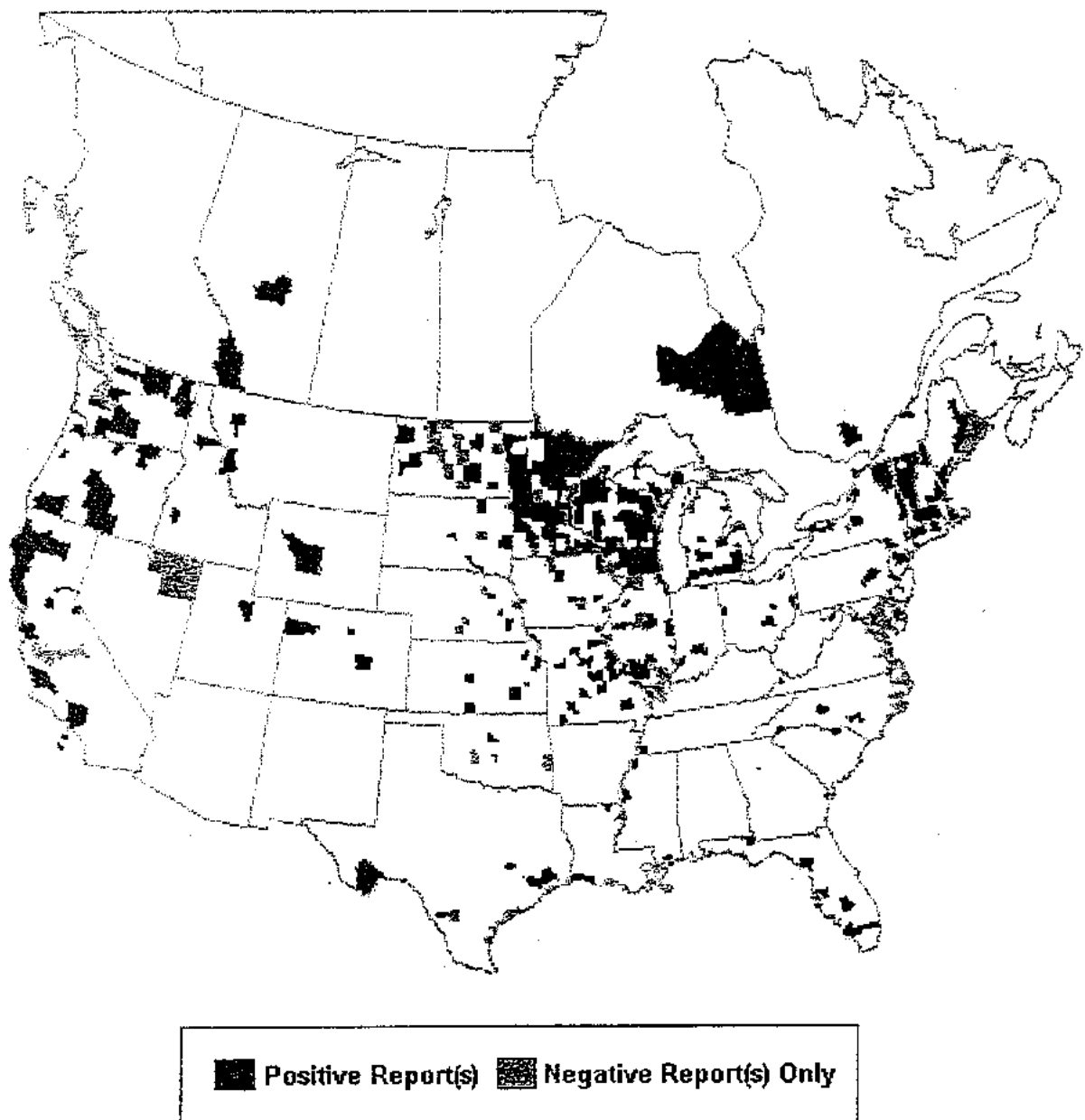
(<http://labs.sci.hiroshima-u.ac.jp/homepage/amphibia/>) などを利用すればよい。

5-2. 内分泌かく乱物質（EDC）の新しい生物検定法の開発

内分泌かく乱物質を用いた生物検定は、その量と反応関係を知るために必要である。現在行われている内分泌かく乱物質などの化学物質の生物検定法には、アフリカツメガエル胚を用いた FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay in Xenopus) 試験 (Fort D.J. et al., J. Appl. Toxicol. 9: 377-388, 1989、他 50 編以上)、レチノイド受容体に対する $[3H]$ 4 - 柱ルチルアルデハイドなどの結合能を指標としたレチノイド受容体検定 (Blumberg B. et al., PNAS 93: 4873-4878, 1996)、及び北東アフリカに棲息する雌リードフロッグの体色変化を利用した内分泌検定テスト (Hayes T.B., 内分泌学雑誌 68: 558-568, 1998、河野、井口訳) などがある。現在使用されている FETAX 試験は、高濃度の化学物質による胚発生異常を観察することによって検定するもので、微量検定には使用できない。また、アフリカツメガエルは4倍体で遺伝的解析も難しく、成熟期間も2～3年と比較的長い。そのため、後期発生異常の検定には応用できない。また、リードフロッグは入手が難しく、入手したとしても個数に限りがある。従って、これらの難点を克服する新しい検定法の開発が是非とも必要である。

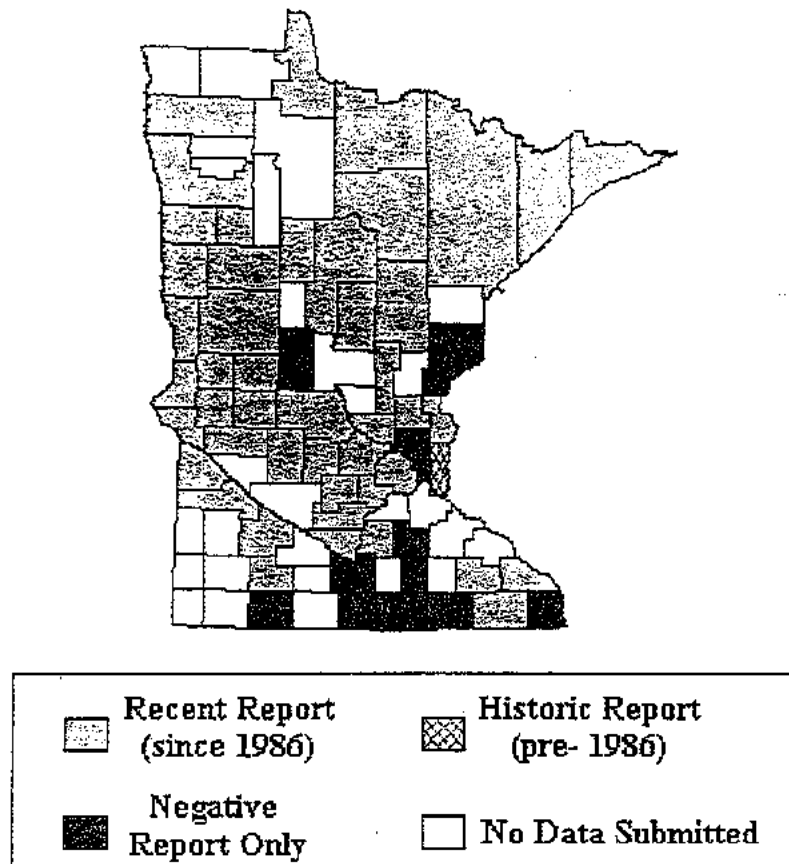
私は、原因物質が微量であっても、視覚的に検定できるトランスジェニック技術に応用した新しい方法の開発を提言する。その方法を実現することは充分可能である。広島大学理学部附属両生類研究施設は核移植技術に習熟し、その技術を用いて3倍体、或いは4倍体のカエルを作製してきた。最近はその技術に応用して、トランスジェニックカエルを作製することに成功している。トランスジェニック技術に応用して、内分泌かく乱物質の生物検定に用いるのである。方法を要約すると、制限酵素を用いて目的遺伝子を膨潤した精子核に組み込み、その精子核をひとつずつ卵に注入して遺伝子を導入し、トランスジェニックカエルを作り、導入した遺伝子をマーカーにするのである。例えば、性腺特異的に発現する遺伝子の転写調節領域を単離し、この領域の下流に緑色蛍光蛋白 (GFP) をコードする遺伝子を繋げた DNA コンストラクトを作製して、これを核移植技術を利用してカエルの卵に導入すれば、導入された遺伝子は性腺で特異的に発現する。同時に GFP が合成されるので、蛍光顕微鏡を用いて蛍光強度や分布を継続的に観察すれば、内分泌かく乱物質の性腺に対する影響を継続して調べることができる (図5参照)。この方法は、カエルは全発生過程を観察できるという哺乳類にはない大きな利点をもっていることを利用している。カエル卵に組織特異的に発現する遺伝子のプロモーター領域の下流に緑色蛍光蛋白 (GFP) をレポーターとして導入することによって組織特異的に蛍光を発するトランスジェニックカエルを作製し、生殖系列に遺伝子を導入することができれば、カエルは数多くの卵を産むので、それを利用することによって多くの施設や研究所で生物検定ができる。また、組織特異的に発現する遺伝子をマーカーに用いれば、微量の内分泌かく乱物質では観察できない組織内の変化を遺伝子レベルで継続的に観察することができる。このように新検定法は多くの利点をもっている。私は、是非ともこの方法を完成し、内分泌かく乱物質汚染防止に役立てたいと思っている。

☒ 1 Locations of
Malformation Reports



North American Reporting Center for Amphibian Malformations

Minnesota



For individual county reports, click on the map above or choose a county from the following list:

Counties:

Aitkin -- Anoka -- Becker -- Big Stone -- Blue Earth -- Carver -- Cass -- Chisago -- Clay -- Cook --
Cottonwood -- Crow Wing -- Douglas -- Faribault -- Fillmore -- Freeborn -- Grant -- Hennepin -- Houston --
Hubbard -- Isanti -- Itasca -- Jackson -- Kandiyohi -- Koochiching -- Lac Qui Parle -- Lake -- Lake Of --
The Woods -- Le Sueur -- Mahnomen -- Marshall -- Mcleod -- Meeker -- Mille Lacs -- Mower -- Nicollet --
Norman -- Olmsted -- Otter Tail -- Pine -- Polk -- Pope -- Ramsey -- Redwood -- Rice -- Sherburne --
Sibley -- St. Louis -- Stearns -- Steele -- Stevens -- Swift -- Todd -- Traverse -- Washington -- Wilkin --
Winona -- Wright -- Yellow Medicine

図3 肢形成における分子相互作用

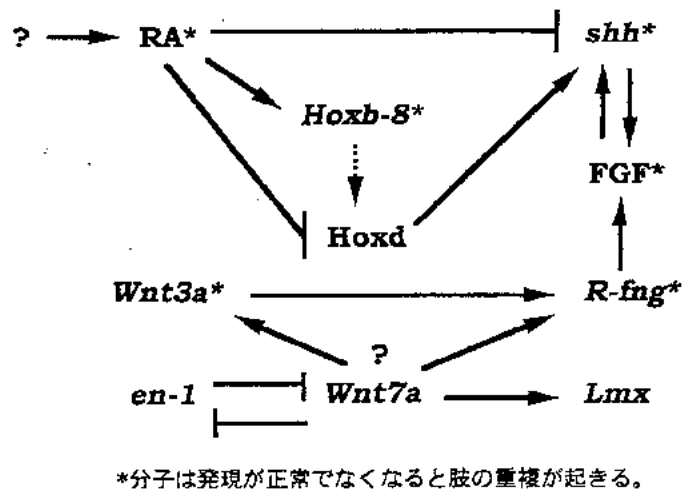
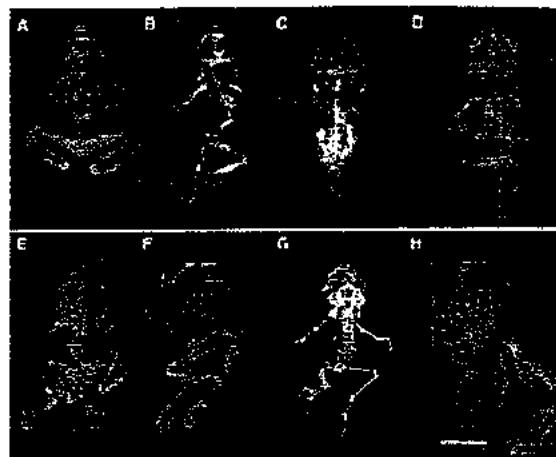


図4 吸虫による奇形カエル



吸虫 (*Ribeiroia* sp.)



Johnson P.T.J. et al., Science 284:802-804, 1999 より抜粋

図 5

トランスジェニックカエルの作製法とそれを応用したEDC新検定法

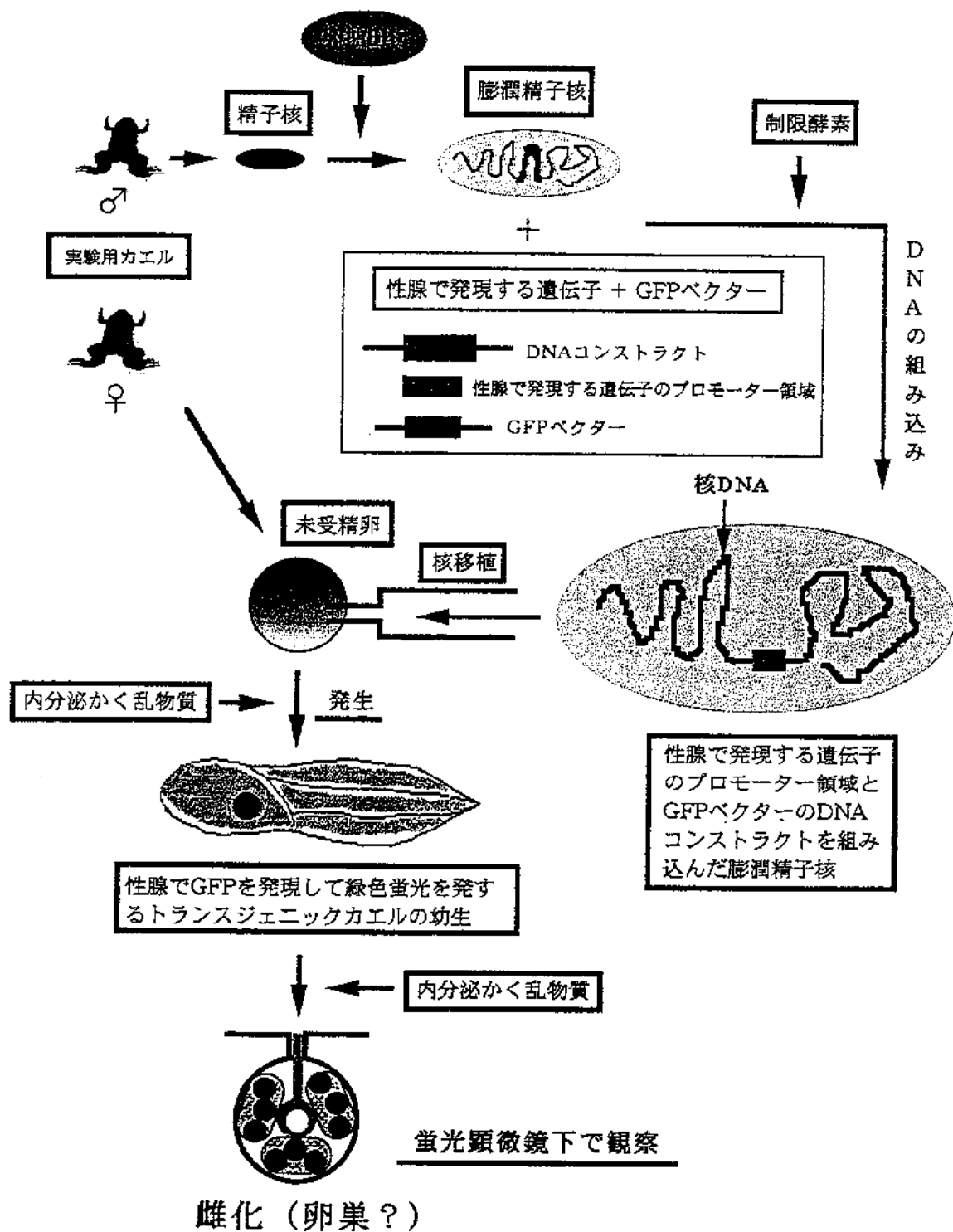


表1. ヤマアカガエル幼体の外部形態異常の出現結果
(北九州市山田緑地、1995・1996年)

調査年	1995年	1996年				
幼生採集池	野草5池	野草1池	野草2池	ガマ池	調整池	合計
幼生採集月日	6/28・30	5/17・20	5/24	5/17・27	6/2	
正 常	52匹 (88.1%)	679匹	51匹	483匹	659匹	1872匹 (94.2%)
四肢異常	7匹 (11.9%)	90匹	0匹	7匹	18匹	115匹 (5.8%)
過剰肢(前肢)	7 (11.9)	82	—	4	4	90 (4.5)
過剰肢(後肢)	—	—	—	1	—	1 (0.05)
前肢の完全欠損	—	1	—	—	—	1 (0.05)
後肢の完全欠損	—	—	—	1	—	1 (0.05)
後肢の部分欠損	—	1	—	1	3	5 (0.25)
多指	—	3	—	—	—	3 (0.15)
多指 (合指)	—	3	—	—	—	3 (0.15)
欠趾	—	—	—	—	8	8 (0.40)
趾の未発達	—	—	—	—	3	3 (0.15)
合 計	59匹 (100%)	769匹	51匹	490匹	677匹	1987匹 (100%)

表2. ニホンアカガエル幼体の外部形態異常の出現結果
(北九州市山田緑地、1996年)

調査年	1996年				
幼生採集池	野草2池	野草3池	野草4池	ガマ池	合 計
幼生採集月日	5/24	5/27	6/10	5/17・27	
正 常	442匹	693匹	81匹	98匹	1314匹 (96.9%)
四肢異常	12匹	27匹	2匹	1匹	42匹 (3.1%)
前肢の完全欠損	—	1	—	—	1(0.07)
後肢の完全欠損	2	2	—	—	4(0.29)
前肢の部分欠損	—	4	—	—	4(0.29)
後肢の部分欠損	6	7	2	1	16(1.18)
欠指	—	5	—	—	5(0.37)
欠趾	—	2	—	—	2(0.15)
無趾	1	2	—	—	3(0.22)
掌の未発達	—	1	—	—	1(0.07)
趾の未発達	—	3	—	—	3(0.22)
矮小な前肢	1	—	—	—	1(0.07)
矮小な後肢	2	—	—	—	2(0.15)
合 計	454匹	720匹	83匹	99匹	1356匹 (100%)

表3. ニホンヒキガエル幼体の外部形態異常の出現結果
(北九州市山田緑地、1996年)

調査年	1996年
場所	野草広場
幼生採集池	ガマ池
幼生採集月日	5/17
正 常	930匹(98.52%)
四肢異常	13匹(1.37%)
過剰肢 (後肢)	1(0.11)
多趾	2(0.20)
多趾 (合趾)	1(0.11)
短趾	2(0.20)
未発達な趾	3(0.32)
矮小な後肢	3(0.32)
変形した後肢	1(0.11)
その他の異常	1匹(0.11%)
体表皮の膨張	1(0.11)
合 計	944匹(100.00%)

表4. 1997年度山田緑地での形態異常ガエル出現状況(暫定)
(ヤマアカガエル)

(A) 山田緑地野草広場(5月26日から採集を開始)

採集場所	野草4池	野草4池の上	ガマの池	合 計
正常個体	561	1020	931	2512
異常個体				
過剰肢(前肢)			1	1
肢の完全欠損(後肢)			5	5
肢の部分欠損(前肢)			2	2
肢の部分欠損(後肢)	1	1	12	14
短趾(後肢)	1	3		4
短趾・裂趾(後肢)		1		1
太い指(前肢)		1		1
肢の矮小化(後肢)	2	1	1	4
肢の矮小化・多趾(後肢)		1		1
合 計	565	1028	952	2545

(B) 山田緑地森の池(6月6日から採集を開始)

採集場所	森の池
正常個体	853
異常個体	
過剰肢(前肢)	1
肢の部分欠損(後肢)	28
短趾(後肢)	2
合 計	884

表5. 過剰肢を持つカエル類の日本での発見例

和 名	種 名	個体数	採集年月日	採集場所	過剰肢の位置と数	文 献
アオガエル属(?)	<i>Rhacophorus</i> (?)	1	1928.08.07	青森県弘前市	左後肢2本、幼生	根岸(1935)
ヤマアカガエル	<i>Rana ornativentris</i>	1	1928.08.	青森県弘前市(?)	右前肢1本、雌、SVL約67mm	同上
ニホンアマガエル	<i>Hyla japonica</i>	1	1928.10.05	青森県東津軽郡平館村	左前肢1本、SVL約19mm	同上
トノサマガエル	<i>Rana nigromaculata</i>	1	1931.10.	埼玉県熊谷市佐倉河村	左後肢1本、雌、SVL約28mm	同上
ニホンアカガエル	<i>Rana japonica japonica</i>	1	1938.10.	千葉県君津郡中村	右後肢2本、SVL約30mm	白井(1940)
ウシガエル	<i>Rana catesbeiana</i>	1	1949.12.05	愛知県春日井市	後肢3本、変態完了直前、SVL47mm	島島(1951)
モリアオガエル	<i>Rhacophorus arboreus</i>	1	1954 (?)	新潟県新潟市	左前肢1本、雄、SVL58mm	佐々木・鈴木(1954)
アズマヒキガエル	<i>Bufo japonicus formosus</i>	1	1956 (?)	新潟県北蒲原郡水原町	左前肢1本、雄、SVL112mm	佐藤(1956)
トノサマガエル	<i>Rana nigromaculata</i>	1	1956.10.	新潟県新潟市	右後肢1本、雄、SVL21.4mm	佐々木(1957)
トウキョウダルマガエル	<i>Rana porosa porosa</i>	1	1961.05.02	東京都江戸川区葛西	左前肢1本、SVL約90mm	青木(1962)
ヌマガエル	<i>Rana limnocharis limnocharis</i>	1	1963.05.	愛知県知多郡阿久比町	左後肢1本	新美(1965)
ウシガエル	<i>Rana catesbeiana</i>	1	1964.05.	愛知県知多郡阿久比町	右前肢1本	同上
ウシガエル	<i>Rana catesbeiana</i>	1	1966.05.17	香川県	後肢2本	立石(1967)
ウシガエル	<i>Rana catesbeiana</i>	1	1966.09.	愛知県半田市乙川浜側町	右前肢1本	新美(1969)
(ヌマガエルの1種?)		1	1967.05.	沖縄県具志川市具志川	後肢7本(左2本、右5本)	琉球新報(1968.08.02)
ウシガエル	<i>Rana catesbeiana</i>	1	1967.08.15	愛知県刈谷市	左後肢2本	新美(1969)
ウシガエル	<i>Rana catesbeiana</i>	2	1967.10.08	愛知県半田市長根町	2匹とも過剰後肢左右各1本、幼生	同上
ヌマガエル	<i>Rana limnocharis limnocharis</i>	1	1971.08.	愛知県中島郡祖父江町	左前肢2本、雄、SVL44mm	新美(1971)
ウシガエル	<i>Rana catesbeiana</i>	2	1973.06.	千葉県市川市	後肢1本(左と右)、変態完了直前	和瀬(1978)
トノサマガエル	<i>Rana nigromaculata</i>	1	1973.09.13	兵庫県豊岡市岩瀬	右前肢1本、SVL45mm	長谷川(1974)
アズマヒキガエル	<i>Bufo japonicus formosus</i>	1	1974.05.25	千葉県市川市	右後肢2本、幼生	和瀬(1978)
シュレーゲルアオガエル	<i>Rhacophorus schlegelii</i>	1	1980.05.	新潟県	右後肢1本、変態完了直前	袴田(1981)
ニホンアマガエル	<i>Hyla japonica</i>	1	1980.07.14	富山県富山市五福	右前肢1本	南部(私信)
トノサマガエル	<i>Rana nigromaculata</i>	1	1982.06.29	新潟県北蒲原郡加治川村	左前肢1本、2年目の雌、SVL45.3mm	高須(1982)
ニホンアマガエル	<i>Hyla japonica</i>	1	1982.6.23	愛媛県上浮穴郡小豆町	右前肢1本、SVL27.5mm	岡山(1995)
ウシガエル	<i>Rana catesbeiana</i>	1	1993.05.22	埼玉県越谷市	後肢1本、幼体	朝日新聞(1993.05.27)
ヤマアカガエル	<i>Rana ornativentris</i>	8	1995.05.	福岡県北九州市山田緑地	前肢1~2本、幼体	武石(1996)
ヤマアカガエル	<i>Rana ornativentris</i>	91	1996.05.	同上	前肢1~3本(90匹)、後肢1本(1匹)、幼体	武石
ニホンヒキガエル	<i>Bufo japonicus japonicus</i>	1	1996.05.17	同上	後肢1本、幼体	同上
ヤマアカガエル	<i>Rana ornativentris</i>	2	1997.05.	同上	前肢、幼体	同上
ヤマアカガエル	<i>Rana ornativentris</i>	90	1998.05.	同上	前肢、幼体	同上

表6. 山田緑地以外の場所でのヤマアカガエル過剰肢幼体の出現状況

(1998年の山田緑地との比較、一部1996年を含む)

採集場所	山田緑地からの距離	採集年月日	採集個体	調査幼体数	過剰肢幼体数	過剰肢幼体出現率	備 考
山田緑地（北九州市） 一の谷の池	—	1998.05.13・23・28	変態途中の幼生	696匹	90匹	12.9%	1997年度に新たに作られた池
大蔵小学校（北九州市） プール	3.5km	1998.05.27	変態途中の幼生	411匹	0匹	0%	
たしろ少年自然の家（北九州市） チャプチャプ池	7.5	1998.03.12以前	卵塊（5ヶ）	1529	0	0	卵塊からの飼育
同上	同上	1996.06.11	変態途中の幼生	1079	0	0	
平尾台南側斜面（行橋市） 採石場跡地内の池	14.7	1998.05.17・26	変態途中の幼生	1678	0	0	
英彦山麓前坊（福岡県太田町） 舗装道路側溝の水たまり	40.8	1998.05.25	幼 生	2241	1	0.04	前肢1本過剰

表7. 山田緑地産ヤマアカガエル卵塊からの過剰肢幼体の出現

(1998年1・2月採集、160卵塊の飼育結果)

(a) 過剰肢幼体が出現した卵塊の割合：160卵塊中17卵塊（10.6%）

飼育開始時の卵数	調査卵塊数	卵塊当たり調査幼体数（匹）	調査幼体総数（匹）
過剰肢幼体が出現した卵塊			
300卵/卵塊	8	144~266（平均230.4）	1,843
50卵/卵塊	9	13~ 42（平均 36.3）	327
小 計	17	13~266（平均127.6）	2,170
過剰肢幼体が出現しなかった卵塊			
300卵/卵塊	26	62~272（平均211.9）	5,510
50卵/卵塊	117	10~ 50（平均 38.8）	4,545
小 計	143	10~272（平均 70.3）	10,055

(b) 過剰肢幼体出現卵塊における出現率の変動（0.4%~31.0%）

卵塊番号	調査幼体数（匹）	過剰肢幼体数（匹）	過剰肢幼体出現率（％）	備 考
（1卵塊当たり300卵で飼育開始）				
No.246	249	43	17.3	以下断りの無い限り 全て前肢が過剰
No.245	245	43	17.6	
No.153	221	24	10.9	後肢過剰1匹を含む 後肢過剰
No.152	211	4	1.9	
No.150	261	4	1.5	
No.168	144	1	0.7	
No.170	246	1	0.4	
No.001	266	1	0.4	
（1卵塊当たり50卵で飼育開始）				
No.128	42	13	31.0	後肢過剰1匹を含む
No.109	35	9	25.7	
No.003	40	9	22.5	
No.103	41	7	17.1	
No.047	13	2	15.4	
No.127	40	2	5.0	
No.035	32	1	3.1	
No.052	42	1	2.4	
No.063	42	1	2.4	
合計（17卵塊）	2,170匹	166匹	10.3％（各出現率の平均値）	

表8. カエル体内の化学物質濃度の分析結果
(1998年1・2月、成体を採集)

種 類	捕獲場所	分析個体数	性別	頭胴長(mm)	分析部位	分析結果【範囲値 (ppb) と検出個体数 (匹)】					
						DDT	DDE	DDD	DDT類 (合計)	TNT	B(a)P
ヤマアカガエル	山田緑地	7	雄	53~60	全体	1~15 (5)	1~22 (7)	2~3 (2)	1~40 (7)	N.D.	70(1)
		6	雌	65~88	全体 (除卵)	1 (1)	1 (1)	N.D.	1 (2)	N.D.	N.D.
		(3)	(雌)	(65~80)	卵	1 (1)	N.D.	N.D.	1 (1)	N.D.	N.D.
	市内八幡東区	10	雄	56~65	全体	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	30~40 (3)
		10	雌	81~85	全体 (除卵)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	30~40 (2)
		(2)	(雌)	(82, 85)	卵	1 (1)	N.D.	N.D.	1 (1)	N.D.	N.D.
ニホンアカガエル	山田緑地	12	雄	43~59	全体	1~55 (12)	1~200 (12)	1~9 (4)	2~264 (12)	N.D.	40(1)
	市内若松区	2	雌	66, 66	全体 (除卵)	N.D.	1 (1)	N.D.	1 (1)	N.D.	N.D.
		2	雌	57, 69	全体 (除卵)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
* 日本食品分析センターにて測定					検出限界	1ppb	1ppb	1ppb	1ppb	10ppb	10ppb

第2章

先天奇形サーベイランスに関する調査研究

1. 内分泌攪乱化学物質の人への影響調査方法の研究

横浜市愛児センター所長

横浜市立大学客員教授 住吉 好雄

1. はじめに

内分泌攪乱化学物質の人への影響については現時点では全く不明で、いろいろな角度からの研究が必要である。

今回は現在までに報告されている文献的考察を行い今後の研究方法について考えて見たい。

2. 文献的考察

環境汚染物質の多くの物質は発育中の胎芽、胎児、および新生児には特に影響を及ぼすことが考えられる。その点に関し、1980年カリフォルニアのL.D.Longoは重金属(水銀、鉛、カドミウム)、ダイオキシン類、PCBs、殺虫剤、除草剤、一酸化炭素、オゾン、塩化ビニール、ヘキサクロロフェン、放射線、煙草、アルコール、薬品(サリドマイド、DES、フェニトイン、フェノバルビタール、オピオイド、ヘロイン、メサドン)等を催奇形作用、遺伝子変異作用および催悪性腫瘍作用などを有する物質として挙げている。親がそれらの物質に暴露された場合、特に生殖機能に及ぼす影響として、1)不妊、不育、2)自然流産、3)染色体異常、4)染色体異常を伴わない先天異常、5)性比の変化、6)後期胎児死亡、7)新生児死亡、8)低出生体重児、9)発育障害、10)行動異常、11)幼児期悪性腫瘍、12)幼児期死亡等をあげている。

2-1. Dioxin類の人に及ぼす影響について(人為的暴露の結果に関する文献)

そのなかでDioxin類の人に及ぼす影響についてはベトナム戦争時の除草剤(オレンジ剤)の影響で、流産、死産及び奇形児の増加が報告されている(1、2)。また多くのベトナムからの帰還兵が癌に侵され、また彼等のこどもに奇形児が多く見られたと言う報告もみられる(3)。

しかし1976年イタリアのSevesoでおきた化学工場の爆発事故でDioxin(TCDD)がばらまかれた村で100,000人が被害を受けたとされているが、この事故による自然流産の増加や奇形児の出産の増加については明かではないとされている(4)。

1978年オレゴン州で森に散布された2,4,5-TCDDの影響では、自然流産の明かな増加とその地域の褥婦の母乳から高濃度のDioxinが検出されたとしている(5)。

またリーサス猿の実験では妊娠20~40日にTCDDをあたえると明かに流産が増加し(6)

胎児奇形、特に口蓋裂および腎の異常が増加したという報告がある(7)。

また Dioxin を散布した牧場に放牧した牛の牛肉の脂肪に高濃度の Dioxin が検出されたという報告もある。しかし Dioxin の人に対する毒性に関する科学的な根拠ならびに安全性に関する上限の値等に関しては明かではない。

2-2. Dioxin類の子宮内膜症発生に関する文献

S.E.Rier のリーサス猿の実験で Dioxin を与えると明かに子宮内膜症を発症させることが出来、その重症度は Dioxin 濃度と相関すると報告し (8)、またそのメカニズムは、恐らく Dioxin による全身の免疫機構の変化—サイトカイン産生の異常—が原因であろうとしている (9)。

Andrey,M.らも 1996 年同様の事実を、ラット、マウスの実験から証明しラットやマウスなどの種により免疫反応が異なり、Dioxin による子宮内膜症発症の機構は種によつて異なり複雑であるとしている (10)。

1994 年、ベルギーの P.R.Koninckx らはベルギーにおける Dioxin 汚染と子宮内膜症と題する報告で、1989 年の WHO レポートによると母乳中の Dioxin 濃度はベルギーが世界中で一番高く、ベルギーの不妊症の婦人の 60~80%が子宮内膜症によるものでこの数字も世界で一番高いことから、母乳中のダイオキシンが子宮内膜症を、人でも発生させるのではないかと報告した (11)。しかし血液中の Dioxin を測定し、その値と子宮内膜症との関連を見たわけではないのでその関連性については、明かではない。

2-3. 塵芥処理場・化学工場等の人々に及ぼす影響に関する文献

1992 年 S. Cordier らは工場で化学溶剤に暴露されていた女性労働者の子供に口唇・口蓋裂が最も多くみられ、次いで消化器系の奇形、および多発奇形が多く見られたと報告している (12)。

1997 年、LA.Croen 等は塵芥処理場等から 1/4 マイル以内の地域に妊娠初期に居住していた母親から生まれた児には、それ以外の地域の児に比べて、心奇形が 4 倍、無脳症、二分脊椎症、などの神経管欠損症が 2 倍、多くみられたが、予想された口唇・口蓋裂は多くなかったと報告している (13)。

1997 年、S.Cordier らは工場で Glycol Ether に暴露されていた母親からは神経管欠損症、多発奇形、口蓋裂の順で多く見られたと報告している (14)。

ドイツにおける塵芥処理場にかんする文献には 1995 年 A.Schechter らは市立の塵芥処理場に働く労働者の血液中の Dioxin 類は明かに一般の人より高濃度であつたが、フィルターを付けたり、灰よけのマスク着用、粉塵や蒸気を避ける呼吸器着用、防御スーツの着用等により一般人と同じレベルの血中 Dioxin 類濃度に下げることに成功したと報告している (15)。

またドイツに於ける市立の塵芥処理場の近くに住む人の血中及び母乳中の Dioxin 類とそれ以外の地域に住む人の同様の検査では塵芥処理場の近くに住む人々も全く同様の値で健康に影響を与える程の Dioxin 類は見られなかったとしている (16)。わが国における塵芥処理場職員の Dioxin 類の調査は、所沢市において平成 9 年~1

0年にかけて行われているが、中間報告では毛髪中の Dioxin の測定で2ヶ所とも同様の値を示し、平均 1.35 pg-TEQ/g。経験年数別では15年未満平均1.52 pg-TEQ/g、15年以上1.18 pg-TEQ/g、年令別では、40歳未満1.76pg-TEQ/g、40歳以上0.98 pg-TEQ/g で、其の他地域の住民の平均値2.26 pg-TEQ/g より低い値を示していた。

同じく所沢市周辺の6市町村の64施設における平成8年1月1日~平成9年12月31日の死産及び先天奇形の発生状況調査結果は、妊娠22週以降の19672人の出産児のうち奇形児は134人、0.68%、死産児は168人、0.85%で、全国平均の奇形児 1.01%、死産児 2.67% の値よりいずれも低い値を示していた。

3. まとめ

現在 Dioxin 類に関する文献は枚挙に暇がないほど多く、それだけ世界中の人々の関心事である。今回はそのうち生殖機能に及ぼす影響を中心に代表的なものについて検索した。大きく分けて1) 妊娠期間中の Dioxin 類の暴露の影響、2) 出生後の Dioxin 類の暴露の影響にわけることができる。

1) 妊娠期間中の母親への暴露の影響としてあげられているものは、発育障害で、その結果としてあらわれるものは、自然流産、子宮内胎児発育遅延、先天異常；「神経管欠損症（無脳症、二分脊椎症、脳瘤）、口唇・口蓋裂、心臓奇形、尿道下裂、など、染色体異常等」、子宮内胎児死亡、死産等が挙げられている。

2) 出生後の Dioxin 類の暴露の影響としては男性・女性ともに、性成熟の異常（早熟、遅延）、性行動の異常、甲状腺がん、乳癌、男性特有のものとして、精子形成異常、過小陰茎、性巣悪性腫瘍など、女性特有のものとして、子宮内膜症、膵がん、子宮・卵巣がん、などが挙げられている。

また中枢神経、脳への影響として情緒不安定、性格異常等も考えられている。

そのほか、たとえば妊娠中に DES (diethylstilbesterol) に暴露されると、女兒の膣がんが孫の代に発生したという文献もあらわれ、もしそれが確かだとすれば何代に亘って影響するという恐ろしい物質が現れたことになる。

4. 今後の課題ならびに方針

1) 先天異常モニタリングを継続して実施しているグループは今後内分泌攪乱化学物質と関係があると考えられる性器異常、中枢神経系異常、心臓奇形等を中心に地域を限定して、詳細に検討する。

2) 産婦人科学会、日本母性保護産婦人科医会の協力をえて、自然流産、子宮内膜症の増加の有無を調査する。

3) 泌尿器科関係では、男性性器の器質的、機能的異常の増加の有無を検討する。

4) 男性性巣悪性腫瘍の増加の有無を調査する。

5. 文献

- 1) L.D.Longo;Environmental pollution and pregnancy,Risks and uncertainties for the fetusand infant, Am.J.Obstet.Gynecol.137 (2) ,162-173,1980
- 2) National Research Council;The effects of herbicides in South Vietnam.Part A,Summary and conclusions prepared for Department of Defense ,Washington,D.C.1974,National Research Council.
- 3) C.Holden:Agent Orange furor continues to bild,Science,205:770,1979
- 4) Bartazzi,P.et al.The Seveso Studies on Early and LongtermEffects of Dioxin Exposure: A Review,Epidemiology, 8 (6) ,646-652,1997
- 5) Environmental Protection Agency;2,4,5,-T and Silvex,Fed.Register 44:15,874,1979
- 6) McNulty, W.,P.,2,3,7,8-Tetrachloro-dibenzo-p-dioxin: abortions in rhesus macaques,in Press.
- 7) Van Miller,J.P.et al.Tissue distribution and excretion of tritiated tetrachlorodibenzo-p-dioxin in non human primates and rats,Food Cosmet.Toxicol.14:3114,1976
- 8) Sherry E.Rier et al.Endometriosis in Rhesus Monkey (Macaca mulatta) Following ChronicExposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin,Fundamental and Applied Toxicol-ogy,21:433-441,1993
- 9) Sherry E.Rier et al.,Immuno-responsiveness in Endometriosis; Implications of Estrogenic Toxicants,Environ. Health Perspect 103 (Suppl) 151-156,1995
- 10) A.M.Cummings,et al.Promotion of Endometriosis by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Rats and Mice: Time-Dose Dependence and Species Comparison,Toxicology and applied Pharmacology,138,131-139,1996
- 11) P.R.Koninckx et al. Dioxin Pollution and endometriosis in Belgium,Human Reproduction ,9 (6) ,1001-1002,1994
- 12) S. Cordier et al.Maternal occupational exposure and congenital malformations,Scand. J. Work Environ Health,18,11-17,1992
- 13) L.A.Croen et al. Maternal residential proximity to hazardous waste sites and risk for selected congenital malformations,Epidemiology,8 (4) :337-339,1997
- 14) S.Cordier et al.Congenital Malformations and Maternal Occupational Exposure to Glycol Ethers,Epidemiology,8:355-363,1997
- 15) A.Schechter et al. Dioxin concentrations in the blood of workers at municipal waste incinerators,Occup.Environ.Med.52:385-387,1995
- 16) E. Deml et al. Chlorinated dibenzodioxins and dibenzo-furans (PCDD/F) in blood and Human milk of non occupational exposed persons living in the vicinity of a municipal waste incinerator,Chemosphere,33 (10),1941-1950,1996

2. 日本母性保護産婦人科医会・外表奇形等調査の解析

横浜市立大学医学部産婦人科(*)
平原史樹、住吉好雄

1. 研究目的

先天異常モニタリング、サーベイランスは先天異常、奇形児の発生状況を継続的に定点調査し、特定の奇形が多発した際、その原因を究明し、奇形発生の予防、予知にをするシステムであるが、内分泌攪乱化学物質をはじめとするさまざまな環境因子がとりまく今日の社会では、環境保健の観点からきわめて重要なものである。

本研究では外因性内分泌攪乱化学物質がヒトの生殖機能、奇形発生、疾病の誘因などに関与している可能性文献的検討をおこなうとともに、分担研究者のかかわるサーベイランスシステムにおいて標記の検討をすることを目的とする。

2. はじめに

本邦の産婦人科医の大多数が所属する日本母性保護産婦人科医会（日母）では、北海道から沖縄にいたる全国約270医療機関の協力を得て、1972年より外表奇形児の発生状況を継続的に調査し、モニタリングを行っている。これらのモニタリングの報告は横浜市立大学医学部附属浦舟病院に設けられた、国際クリアリングハウスモニタリングセンター日本支部において集計され、日本母性保護産婦人科医会の協力のもとに同センターにおいて分担研究者らにより詳細な分析、検討を行なっている。さらに、ここで得られた分析結果は世界保健機構(WHO)のNGO(非政府機関)の一組織である国際先天異常監視機構(International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems, ICBOMS)に集められ、世界先進25ヵ国に設置された同様のモニタリングシステム機関からの情報とあわせ、世界規模レベルで分析・検討され、奇形発生状況の把握、またその予知・予防に役だっている。今回はこれらの日母外表奇形等調査の応用を検討も試みることにする。

3. 研究方法

1) 日本母性保護産婦人科医会（日母）外表奇形等調査による先天奇形発生分析法を検討した。対象は在胎週数満22週以降の出産児の、出産後7日以内に確認された外表奇形であり、日母外表奇形等調査表による検討を行った。

2) 外因性内分泌攪乱化学物質による奇形発生の可能性に関する文献を調査した。

4. 研究結果と考察

1) 日母外表奇形等調査；1997年1月1日より、1997年12月31日までに出産した外表奇形等調査結果は、出産児総数100,930児のうち1,256児(1.24%)であった。奇形児は本調査により全国出生児の約10%を把握、モニターしたことになる。また近年の傾向として妊娠中に診断される奇形症例が増加しており、1997年度の症例においては全1,256児のう

ち、439児(35.0%)が出生前に判断されている。各外表奇形の内訳については、口唇・口蓋裂がもっとも多く、続いてダウン症、心室中隔欠損、水頭症等が高頻度発生奇形であった。これらの調査において外因性内分泌攪乱化学物質の影響をみるために、その影響があるといわれる、尿道下裂の発生頻度をみると、出産10000に対し 2.58となり、20年前の1978年の発生頻度2.24に比し、若干の増加傾向が示された。

また、本調査のみでは、標記の研究目的の分析が容易でないことから、さらに検討が必要なことが示唆された。

2) 文献的調査によれば外因性内分泌攪乱化学物質と奇形発生の間に有意な相関を見いだした文献はみられなかったが、警告のごとく、示唆している文献(*)はおおくみられ、世界保健機構(WHO)のNGO(非政府機関)の一組織である国際先天異常監視機構(International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems, ICBDMs)においても、尿道下裂発生頻度の経年的国別変化などが調査され、世界的規模でも解析がなされており、これらの調査を注視して分析することも重要と考えられた。

いずれにせよ、現代の環境をとりまく多種多様な因子はいつどのような形で催奇形因子として影響を与えることになるか常に万全の監視体制を整えることが重要である。過去にサリドマイドという薬害の悲劇を味わった我々には先天異常モニタリング、さらにはサーベイランスは極めて重要なことであり、今後も厳重な監視を行うこととしたい。

5. (*) 文献例

- ◆International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems, Annual report 1996, International Center for Birth Defects (Rome, Italy) 1996.
- ◆International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems, Annual report 1997, International Center for Birth Defects (Rome, Italy) 1997.
- ◆International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems, Annual report 1998, International Center for Birth Defects (Rome, Italy) 1998.
- ◆Siffel C, Czeizel AE, Using the Hungarian Birth Defects Registry for surveillance, research and intervention. Cent Eur J Public Health 5: 79-81, 1997.
- ◆Brent RL, Beckman DA, Landel CP, Clinical teratology. Curr Opin Pediatr 5: 201-211, 1993.
- ◆Olea N, Olea-Serrano F, Lardelli-Claret P, Rivas A, Barba-Navarro A, Inadvertent exposure to xenoestrogens in children. Toxicol Ind Health 15: 151-158, 1999.

6. 研究発表

1. 住吉好雄、佐藤孝道、安村鉄雄、皆川進、本多洋、古谷博、森山豊、日本母性保護医協会外表奇形等調査の現況、産婦人科治療、52: 159-167、1986
2. 住吉好雄、森沢孝行、清田明憲、安村鉄雄、皆川進、本多洋、北井徳蔵、我が国における外表奇形モニタリング、産婦人科治療、58:520-525、1989
3. 住吉好雄、唇裂、口蓋裂、産婦人科の実際、39: 1629-1636、1990
4. 住吉好雄、白須和裕、日原弘、清田明憲、南條継雄、皆川進、坂元正一、日本母性保護医協会外表奇形等調査の分析、平成2年度厚生省心身障害研究報告書、67-71、1991
5. 住吉好雄、清田明憲、田中政信、田辺清男、平原史樹、我が国における無脳症とダウン症候群の疫学、産婦人科の治療、68: 101-106、1994
6. 平原史樹、住吉好雄、山中美智子、安藤紀子、平吹知雄、沢井かおり、清田明憲、田中政信、佐藤孝道、坂元正一、日本母性保護医協会外表奇形等調査の分析ならびに、胎児異常診断、先天異常診断、先天異常児出生後のケアに関する調査の検討、平成5年度厚生省心身障害研究報告書、264-268、1994
7. 平原史樹、住吉好雄、山中美智子、安藤紀子、平吹知雄、沢井かおり、清田明憲、田中政信、佐藤孝道、坂元正一、日本母性保護産婦人科医会外表奇形等調査の分析ならびに、内科合併症母体より出生した外表奇形児の検討、平成6年度厚生省心身障害研究報告書、216-218、1995
8. 平原史樹、住吉好雄、水口弘司、朝倉啓文、田中政信、坂元正一、日母外表奇形等調査の分析ならびに妊娠早期超音波診断に関する検討、平成7年度厚生省心身障害研究報告書、180-181、1997
9. 平原史樹、住吉好雄、田中政信、朝倉啓文、水口弘司、先天異常モニタリング、産婦治療、74: 466-472、1997
10. 住吉好雄、平原史樹、水口弘司、田中政信、先天異常モニタリング、産婦治療、75: 87-94、1997

3. 先天奇形を指標とした環境モニタリング

神奈川県立こども医療センター

重症心身障害児施設長 黒木 良和

1. はじめに

内分泌攪乱化学物質のヒトへの影響は明確でないというのが現状である。しかし、内分泌攪乱化学物質と精子数の減少、子宮内膜症や生殖器腫瘍、乳癌の増加、尿道下裂、停留睾丸の増加、免疫機能の低下、神経系の異常などの事実との関連性を完全に否定することもできない 1)2)。本研究は内分泌攪乱化学物質等の影響を先天奇形サーベイランスという手法で疫学的に解明することを目指している。そこで、まず行うべき研究は正確な実態調査であろう。神奈川県では 1981 年から人口ベースの先天異常モニタリングを実施してきた。このモニタリング調査を内分泌攪乱化学物質等の影響調査に応用する方策を検討するのが分担研究の目的である。

2. 内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）のヒトへの影響に関する文献

ー特に先天奇形についてー

詳細な文献調査は他の分担研究者が行っているのので、代表的なものに絞ってまとめた。最も確実なものは、環境ホルモンではないが、妊娠中に投与された合成エストロゲン（Diethylstilbestrol, DES）による外性器異常（停留睾丸、睾丸低形成等）と精子の質の低下 3)である。ダイオキシン類の影響は情報があいまいで関連性が明確なものは少ない。Seveso での肥料工場爆発事故での大量ダイオキシン（TCDD）被爆でも、奇形の発生増加（頻度及び特定の奇形増加共に）は証明されていない 4)。しかし、性比の有意の低下は観察されている 5)。ベトナム戦争での枯れ葉剤（Agent Orange）暴露の米国退役軍人の調査でも有意の生殖に関する障害は証明されていない 6)。これらの他にも環境ホルモンのヒト健康被害に関する文献が多数発表されているが、信頼性の高い確実なものは少ない。しかし、ほとんどの人が環境ホルモンに暴露されている事実を考えると、環境ホルモンの健康被害についての総合的研究は急務と思われる。

特定の内分泌攪乱化学物質の健康被害に関する研究とは別の観点から、内分泌攪乱化学物質の影響を推定する研究もある。例えば奇形の経時的変化から類推したものとして、新生児男児の尿道下裂の頻度を経年的にみたものがある。米国の二つの大規模な調査で過去 20 年間に尿道下裂の頻度がほぼ倍に増加したとしている 7)。診断精度の向上による頻度上昇の可能性もあるが、観察期間中における尿道下裂を誘発する要因の増加の可能性の方が高く更なる調査が必要としている。子宮内での胎生早期のエストロゲン様物質への暴露は性の分化に異常を来すことが知られているが、性比の変化からその可能性を類推している研究がある。前述の Seveso 事故後の男児の顕著な減少や、欧米先進工業国での過去 20-30 年間に於ける緩やかな性比の減少の報告 8)などがそれである。

3. 神奈川県先天異常モニタリングに於ける尿道下裂発生の経年変化

欧米諸国で尿道下裂の発生頻度が増加している 7) 9) 13) ので、わが国でも同様の変化がみられるのか、神奈川県の先天異常モニタリングのデータで検討した。

神奈川県の先天異常モニタリングは年間約 4 万人の生産児及び 22 週以降の死産児を対象に生後 1 週間に観察される全ての奇形をモニターしている人口ベースの先天異常モニタリングである。図 1 に 1981-1997 年の尿道下裂発生の年次推移を示した。神奈川県では欧米でみられた様な尿道下裂の発生増加は認められなかった。逆に 1990 年以降統計的に有意ではないが緩やかな下降傾向が窺えた。欧米での上昇傾向の起点が 1960-1970 年であり、わが国のその時期の尿道下裂の発生状況を知りたいが、わが国のモニタリングは 1981 年以前には存在せず、わが国でも欧米と同様の発生増加が 1980 年までに認められたか否かは不明である。

4. わが国の性比の変動

Davis ら (1998) は北欧、米国、カナダなどの工業先進国で過去 30-40 年間に男児の出生が有意に減少してきたことを報告している 8) (図 2)。性比は最も基本的な指標で、どの国でも偏りなく観察できるし、人の健康被害を感知する見張り番的なものと述べている。性比減少の原因は不明としながらも、殺虫剤やアルミ製造工場で働いている男性を夫にもつ婦人から生まれた子どもの性比が低下しているという報告や、1976 年のイタリアセベンでの化学工場爆発で高濃度のダイオキシンの曝露された人達からは、7 年間に渡って男児が女児の半分しか生まれず、全体的な産児数も減少したという報告 5) を引用して、環境ホルモンを含む環境要因の影響も否定できないとしている。そこで、わが国の人口動態統計資料 14) を用いて、1900 年から 1995 年までの性比の推移を検討した。その結果、多少の増減はあるものの、1900 年から 1970 年までの 70 年間は性比は上昇傾向（男の出生比率が上昇）を示し、その後は一転して低下している事実が明らかになった（図 3）。1970 年以降をさらに詳細に検討すると、1970 年から 1983 年までは男児の出生比は低下しているが、その後はほぼ一定で推移している（図 4）。欧米工業先進国での男児出生の減少傾向は、わが国でも確認された。性比低下の原因は不明であるが、わが国のプラスチック生産量の推移と性比の低下が逆相関を示すことや、日本人の PCB 摂取量が 1980 年から着実に減少している事実 15) を考慮すると、性比の推移と環境ホルモン等の関係を否定し去ることはできない。

5. 神奈川県人口ベース先天異常モニタリング (KAMP) と環境モニタリング

表 1 に神奈川県人口ベース先天異常モニタリングの概要を示した。選択による偏りの無い年間 4 万出生を対象としており、同時に妊娠中の各種疫学情報もある程度収集されている。更に正常対照群のデータも含まれているので症例対照研究にも耐える。奇形の有無に関係なく全ての多胎児に関する情報も収集されており、遺伝要因と環境要因の分析にも有利なものである。また、奇形を有する患者の約 30 % がこども医療センターを受診しており、奇形の把握率をある程度算定できるので、真の発生頻度を

推定することも可能である。この様にKAMPは内分泌攪乱化学物質など外因の影響を調査するための基本的な条件を備えている。しかし、より目的に合ったモニタリングに発展させるために、以下のような改善が必要である。

- 1) 協力施設の報告漏れを無くする：いくつかの協力施設がドロップアウトすると選択による偏りが生じ、奇形発生の地域特性がつかみにくくなる。
- 2) 奇形発生状況や性比の監視はKAMP全体と同時に地域別にも常時継続する。
- 3) 食餌特性に関する情報を収集する：肉好きか魚好きか、緑黄色野菜の摂取状況などは環境ホルモン摂取の程度を類推するのに有効。
- 4) ゴミ焼却場や産業廃棄物処分場等の所在地との関係で、奇形、性比、流死産、その他の健康被害の実態を調査する。
- 5) 詳細な疫学調査が要求される場合に備えて、インフォームド・コンセントを得ておく。

更に、同じ調査集団に対してダイオキシン等の測定や精子数測定、子宮内膜症、生殖器腫瘍などの調査を行えば、因果関係を解明するのに役立つであろう。また、他で行われている環境測定（土壌、空気、魚介類、鳥類など）の情報を有機的に利用することも極めて重要である。予算的にすぐ実行が困難であれば、少なくとも検体保存（血清、母乳、臍帯血など）だけでも早急に開始することが重要である。

6. 文献

- 1) Daston GP et al: Environmental estrogens and reproductive health: a discussion of the human and environmental data. *Reproductive Toxicology* 11: 465-481, 1997
- 2) Golden RJ et al: Environmental endocrine modulators and human health: an assessment of the biological evidence. *Critical Reviews in Toxicology* 28: 109-227, 1998
- 3) Haney AF et al: Structural and functional consequences of prenatal exposure to diethylstilbestrol in women. In *Developmental toxicology: mechanisms and risk*. Banbury Rpt No.26. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press: 271-285, 1987
- 4) Mastroiacovo P et al: Birth defects in the Seveso area after TCDD contamination. *JAMA* 259:1668-1672, 1988
- 5) Mocarelli P et al: Change in sex ratio with exposure to dioxin. *Lancet* 348:409, 1996
- 6) Wolfe WH et al: Paternal serum dioxin and reproductive outcomes among veterans of Operation Ranch Hand. *Epidemiology* 6:17-22, 1995.
- 7) Paulozzi LJ et al: Hypospadias trends in two US surveillance systems. *Pediatrics* 100:831-834, 1997
- 8) Davis DL et al: Reduced ratio of male to female births in several industrial countries. A sentinel health indicator? *JAMA* 279:1018-1023, 1998

- 9) Bjerkedal T, Bakketeig LS: Surveillance of congenital malformations and other conditions of the newborn. *Int J Epidemiol* 4:31-36, 1975
- 1 0) Kallen B, Winberg J: An epidemiological study of hypospadias in Sweden. *Acta Paediatr Scand Suppl* 293:3-21, 1982
- 1 1) Matlai P, Beral V: Trends in congenital malformations of external genitalia. *Lancet* 1:108, 1985
- 1 2) Czeizel A: Increasing trends in congenital malformations of male external genitalia. *Lancet* 1:462-463, 1985
- 1 3) Kallen B et al: A joint international study on the epidemiology of hypo-spadias. *Acta Paediatr Scand Suppl* 324:1-52, 1986
- 1 4) 厚生省大臣官房統計情報部「人口動態統計」
- 1 5) 環境ホルモン問題についてのQ & A、日本化学工業協会、1998

表1 神奈川県人口ベース先天異常モニタリングの概要

対象

神奈川県全域、人口ベース（県内出生の約半数、年間4万出生）
全生産児と死産児（22週以降または500g以上）

調査項目

44種のマーカー奇形（奇形診断の手引き配布）
その他の明らかな奇形

観察期間

生後1週間（産科医または小児科医）

報告様式

奇形児1例に対して2例の正常対照児をセットとして報告

多胎児

奇形の有無に関係なく全例報告

報告を求める疫学情報

妊娠初期の住所、夫婦年齢、近親婚の有無、妊娠歴、流死産歴
奇形児出産既往、喫煙・飲酒歴、妊娠初期の疾病、服薬
放射線被曝歴、夫婦の職業

（単位名：1万男児対）

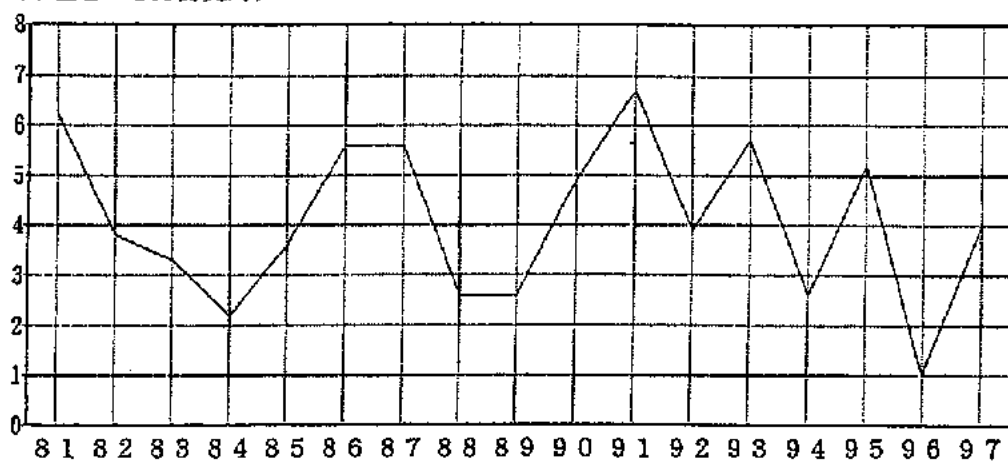


図1 KAMPにおける尿道下裂の発生状況（1981-1997）

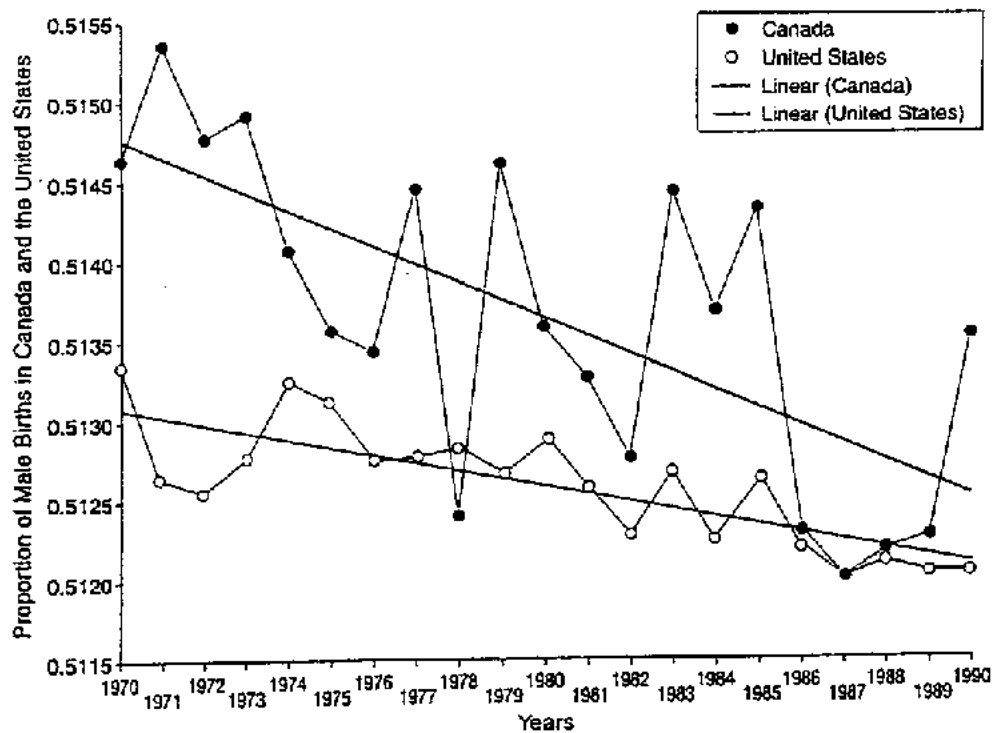
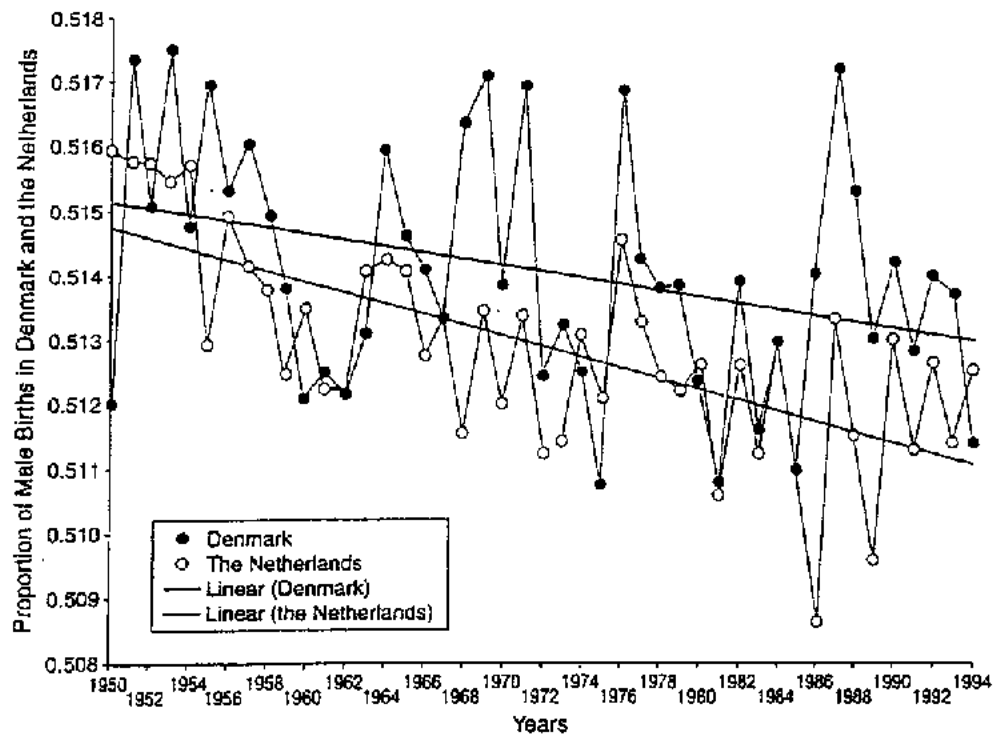


図2 北欧、米国、カナダにおける新生児の性比の変動

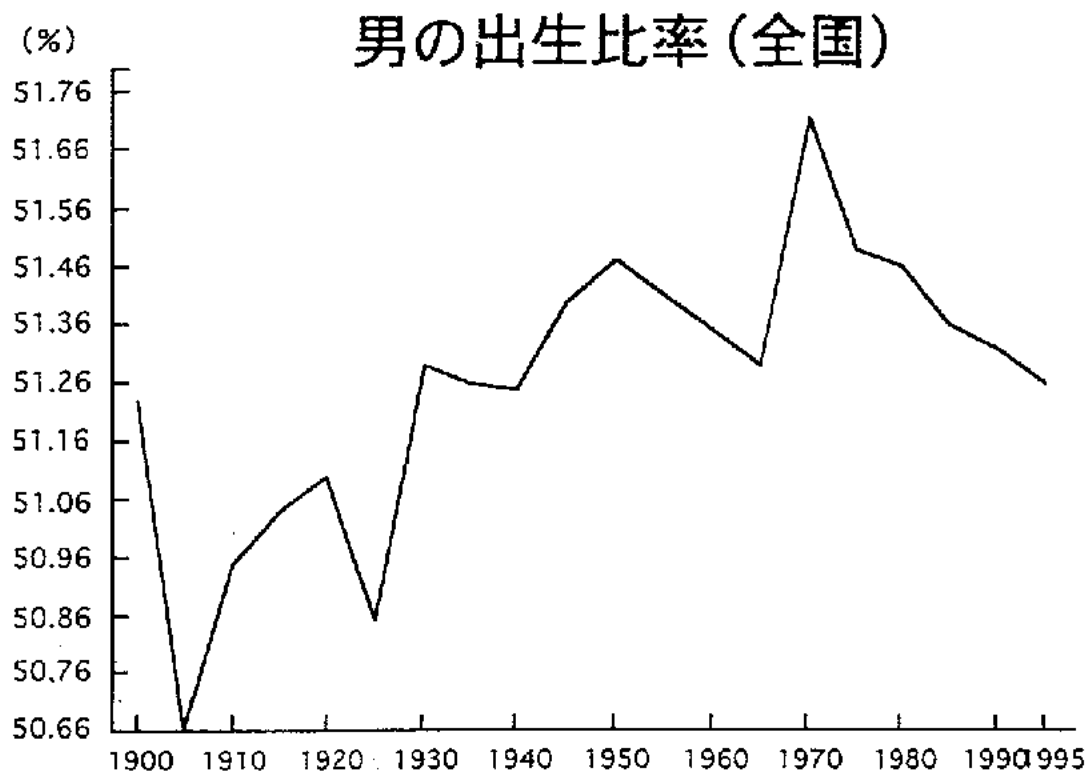


図3 わが国の性比の変動(1900-1995)

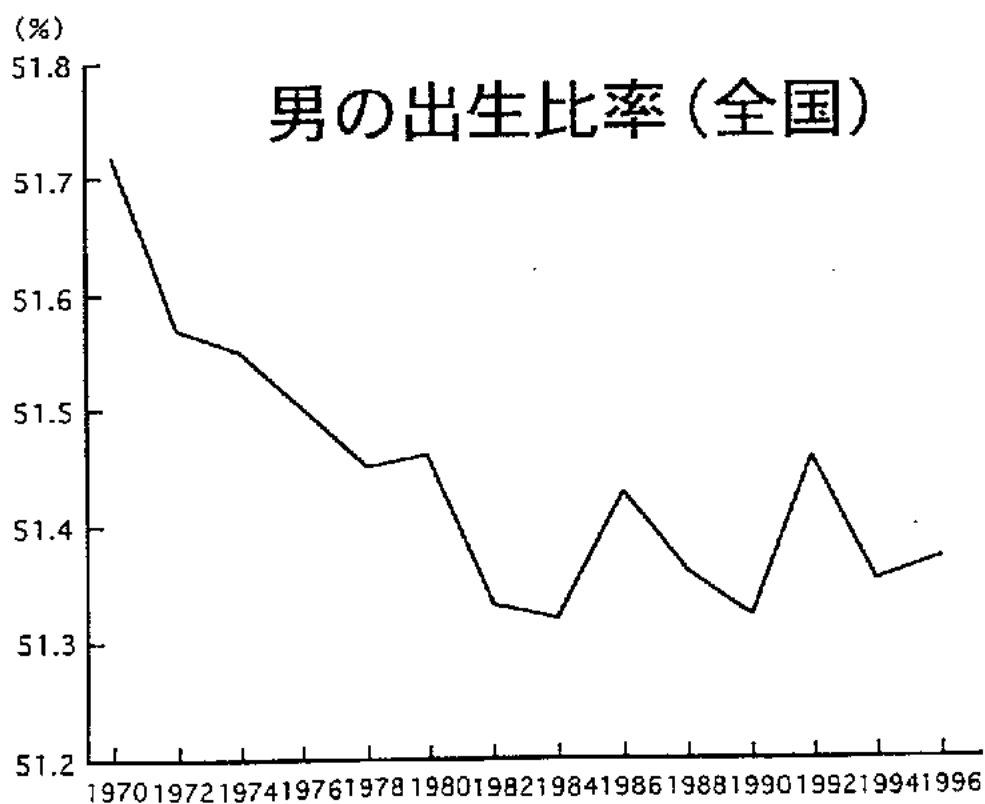


図4 わが国の性比の変動(1970-1996)

4. 泌尿器科領域での奇形発生状況の分析

聖マリアンナ医科大学泌尿器科 岩本晃明

1. 緒言

外因性内分泌攪乱物質（いわゆる環境ホルモン）は実験動物において、エストロゲン作用、抗アンドロゲン作用を有し、精子生成能力、生殖異常等の雄性生殖器系の異常を引き起こすことが報告されている。これらの実験動物の調査研究等は人における性腺、外性器先天奇形あるいは精子数の減少や前立腺及び精巣腫瘍の増加などの様々な影響を想定させている。ヒトではこの化学物質が母胎から胎盤を通じて胎児へ影響することが懸念されている。今回、生殖器など先天奇形と外因性内分泌攪乱物質に関する文献、知見等を調査・検討し出産時の先天奇形の実態調査システムを確立するための基礎資料とすることにした。さらに泌尿器科領域での奇形発生状況の分析を行い、調査方法の検討をするための資料とした。

2. 研究成果の要旨

2-1. 先天奇形発症に関する分析

男性生殖器の発生は、胎生 7 週目になると sex-determining region (SRY) 遺伝子が活性化し、精巣決定因子 (testis determining factor: TDF) を産生する。これにより原始生殖腺にセルトリ前駆細胞が発生し、抗ミュラー管ホルモン (anti-Müllerian hormone: AMH) を分泌する。さらに胎児性ライディッシュ間細胞の発生を誘発し、テストステロン (T) の分泌が開始される。既に中腎管 (ウオルフ管) の基部に尿管芽が発生する時期に、中腎管と並列に中腎傍管 (ミュラー管) が発生している。ミュラー管は男性の場合、AMH によってすぐに退化する。9 週間頃までに外性器は生殖結節、生殖隆起及び尿生殖洞を取り囲む生殖壁ができている。胎生 12 週までに精巣は深鼠径輪の近傍まで下降する。またその頃に左右の生殖壁、生殖隆起は融合して尿道海綿体、陰嚢となり、生殖結節は肥大して亀頭となる。胎生 7 ヶ月以降 T やその他のアンドロゲンの影響で精巣導帯の収縮が開始し、9 ヶ月までに精巣は陰嚢底部に到達する¹⁾。

このような生殖器の分化にはテストステロン (T) や活性型 DHT 及びこれらのレセプターそしてアンドロゲン標的細胞内の 5α -reductase が重要な役割を演じているが、これらのどの過程に障害が起きても様々な生殖器奇形が発症する。このうち臨床的には尿道下裂と停留精巣が比較的多く見られる異常である。停留精巣はその位置によって腹腔内に留まっている高度のものから陰嚢部高位にある軽度のものまで 4 段階に分類される。尿道下裂が高度になるほど停留精巣の合併も多くなると言われている。その原因については諸説があり、複数の因子が関与していると思われるが、1945 年から 1971 年の間に DES で治療された女性が出産した男児に多くの停留精巣、尿道下裂そして生殖機能の低下をもたらしたと報告されている。動物実験及びヒトへの DES の暴露データによると、高濃度の DES 暴露が停留精巣をはじめとする雄性生殖器官への障害を引き起こすが、低用量の場合の影響につ

いては明らかにされていない。また、母体内のエストロゲン濃度と停留精巢の出現頻度との関連が指摘されている。これらの事実と過去 40～50 年間における生殖器官の發育異常の増加減少がよく似ていることから、この異常は胎児の發育期間中でのエストロゲン暴露に原因があると Sharpe ら²⁾は考えている。

2-2. 尿道下裂に関する文献的調査

尿道下裂は男児の泌尿器科疾患では比較的頻度の高い先天奇形である。この異常は胎生 8 週から 12 週頃の外陰部の形態発生中に陰唇陰囊ヒダの不完全な癒合に由来し陰茎腹側にあるいは陰囊に尿道の異常開口をもたらす。この尿道発生過程は胎児精巢によるテストステロン(T)の分泌に依存している。

その発生原因は、現在のところ不明であるが、初産あるいは高年齢出産のような母親側の因子や胎生中の変異原への暴露などの環境因子と遺伝的要因の相互作用の結果として発生するのではないかと考えられている。臨床的な研究からは患児の中に T 代謝物や T レセプター-の欠損例も見られている。男性生殖器の發育に影響を及ぼす内分泌因子の異常の結果で尿道下裂が起こるとされている。

尿道下裂の発生頻度について世界の文献を見ると児 1 万人あたり 0.37 人から 4.1 人とかなり巾がある^{3, 4)}。そして尿道下裂の重症度で軽度のものがどの程度解析の中に含まれるのか一定の基準が記載されていないことから国別、地域別での比較は困難であると考えられる。発生動向を調べた報告によれば、ノルウェー⁵⁾、スウェーデン⁶⁾、デンマーク⁷⁾、英国⁸⁾、ハンガリー⁹⁾、において 1970 年代と比較し 80 年代では上昇傾向にある。Matlai らの調査によればイングランドとウェールズでの増加、ハンガリーでは 1971 年と 1983 年の比較で 12 人から 24 人に増加している。スウェーデンでは 1965 年と 1979 年の比較で 8 人から 12 人に増加しているものの、その増加は 1969 年から 1973 年まででそれ以後は増加しておらず、この間調査方法は変えていないと Kallen⁶⁾は報告している。その後 International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems¹⁰⁾による 1993 年までの調査ではデンマーク、ノルウェーは増加傾向を示し、一方、英国、スウェーデン、ハンガリーでは増加を示していないとのことである。北欧の国の中でフィンランドは幾分増加傾向を示すが 1990 年で出生 1 万人当たり 5 人とデンマークの 1.4 人と比較し約 1/3 と頻度が低いことが報告されている¹¹⁾。European Registration of Congenital Anomalies¹²⁾による 1980 年から 1992 年までのヨーロッパ 17 地域の報告によれば増加傾向を示しているのは Strasbourg と Malta 地方で、逆に減少傾向を示しているのが Northern Netherlands や Glasgow, Liverpool 地方であった。オーストラリア⁴⁾では 1985 年頃より除々に増加傾向を示し、出産 1 万に対し 21.5 人で 1990 年から 1992 年の統計では地域差を認めるデータである。1997 年 Paulozzi ら¹³⁾が米国の the Metropolitan Atlanta Congenital Defects Program と the Birth Defects Monitoring Program の極めて綿密に調査されているデータをもとに尿道下裂の動向を分析したところ、1993 年の発症率は 1968 年の約 2 倍有意に増加していたこと、この間、毎年 2.9%の増加率で白人以外の人種では 5.7%の増加を見ている。特に尿道が陰囊あるいは会陰部に開口する重度の尿道下裂が 1967 年に比較して 1990 年では 2.7 倍、1993 年では 5.5 倍増加しているとの報告である。米国内では West, Central, North, East, South East の地域の順で増加率が高かった。

一方、本邦での動向は、日本母性保護産婦人科医会の先天異常モニタリングの集計を見るとやや増加傾向となっているが他の国々と比較すると最近では出産1万人に対し2人から3人弱と発生率は少ない。

尿道下裂の発生原因を文献的に見ると1970年代の数論文は避妊薬や妊娠テスト薬あるいは妊娠の継続のために使われたprogestinの胎児への暴露が尿道下裂に導き、発生の上昇傾向と関係していると報告している。Sharpeら¹³⁾は過去30~50年間に男性生殖器官の発育障害が2倍以上増加して、その原因に食生活の変化、体脂肪の増加によって内因性のエストロゲンが増加したとの説、酪農製品の摂取量の増加、あるいは環境内のエストロゲン様化学物質等による影響を挙げている。また、Goldmanら¹⁴⁾によれば胎仔ラットの実験結果から合成プロゲステロゲンの暴露は尿道下裂を引き起こすことを明らかにしている。

一方では、1995年のRaman-Wilmsら¹⁵⁾による報告ではそのような暴露と外生殖器の奇形との関係を見出していない。

前述の米国からの論文は特に高度の尿道下裂が増加しているとの今までになかった報告であるが、その増加傾向の原因については言及されておらず、危険因子についての研究の重要性を述べているに過ぎない。

以上のように動物実験からは合成progestinの暴露が尿道下裂の発生に関与するデータがあるものの、ヒトにおいて内分泌かく乱化学物質が尿道下裂を引き起こすとの証拠は、現在のところない。

2-3. 停留精巣に関する文献的調査

停留精巣の経時的、地域差による発生頻度の比較を行う上での問題点として論文発表者の停留精巣の診断基準が一定していないことである。通常、停留精巣の位置による分類として腹腔内精巣、鼠径管内にある鼠径部停留精巣、恥骨前、ないし陰嚢上部にある鼠径下部停留精巣そして移動精巣、表在性鼠径精巣、精巣転位症に分類される。しかし各臨床医によって多少分類が異なっているため発生頻度の動向を解析するには相当慎重であらねばならない。またこれらの診断を何歳の時期に行うかによっても発生頻度が異なってしまう。

停留精巣の発生原因は内分泌異常によって高頻度に発生することは良く知られている。また遺伝的な要因も一部言われている。出生時の停留精巣の罹患率に影響する胎児期における要因として、出生時の体重、妊娠期間、胎児の数等が挙げられる。また、停留精巣の出現は季節による変動や人種での差異があることが報告されている¹⁶⁾。停留精巣の発現頻度に黒人と白人とで異なっており前者で1/3低いとの報告¹⁷⁾、また一方では黒人と白人とで顕著な相違を認めなかったとする報告もある¹⁸⁾。精巣腫瘍の発現率も同じ傾向にある。

停留精巣の発現動向を見ると、英国オックスフォードで生まれた男児7,500人の調査では、停留精巣の頻度を1950年代半ばと1980年代で比較すると、出生時では4.0%から5.4%へ、3ヶ月齢では0.96%から1.86%へとそれぞれ増加を示したと報告している^{19,20)}。一方、ニューヨークのマウントサイナイ病院で生まれた6,935人の男児での最近の研究によると、停留精巣罹患率は出生時で3.7%、3ヶ月齢では1.0%に減少した。この百分率は数十年前と変わらなかったもので停留精巣の増加についての証拠はないと結論している¹⁸⁾。それは、

診断の基準や患者の確認法などに統一性がないことからくる人為的な理由による見かけ上の増加あるいは地域による差も考えられる。

本邦における停留精巣の増加の有無は診断上の問題もあり疫学的な調査が行われにくくデータの報告は見られない。

3. 今後の展望

以上の文献的知見を得た上、今後尿道下裂、停留精巣など先天奇形の疫学調査を行う予定である。方法としては高橋班員と協力し、小児泌尿器科学会員を通じて調査を行う。調査内容には患児の周産期の環境、両親の生活習慣などを含むような調査システムとし、すでに調査、質問用紙を作成している。これらから得られた集計データは各項目について統計学的解析を行い、環境因子の関与の検討を行う予定である。

4. 参考文献

1. 石動孝一郎：性の分化と機能、小児泌尿器科全書；166-177、金原出版、1998
2. Sharpe R and Skakkebaek EN : Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 341: 1392-5,1993
3. Hohlbein R: Missbildungsfrequenz in Dresden. *Zentralbl Gynakol* 18: 719-31,1959
4. Sweet RA, Schrott HG, Kurland R and Culp OS: Study of the incidence of hypospadias in Rochester, Minnesota, 1940-1970, and a case-control comparison of possible etiologic factors. *Mayo Clin Proc* 49: 52-8, 1974
5. Bjerkedal T, and Bakketeig LS : Surveillance of congenital malformations and other conditions of the newborn. *Int J Epidemiol* 4: 31-36,1975
6. Kallen B and Winberg J: An epidemiological study of hypospadias in Sweden. *Acta Paediatr Scand* 293 (Suppl): 3-21,1982
7. Kallen B, et al : A joint international study on the epidemiology of hypospadias. *Acta Paediatr Scand Suppl* 324: 1-52,1986
8. Matlai P and Beral V : Trends in congenital malformations of external genitalia. *Lancet* 1: 108,1985
9. Czeizel A : Increased birth prevalence of isolated hypospadias in Hungary. *Acta Paediatr Hung* 27: 329-37,1986
10. International Clearinghouse for birth defects Monitoring Systems Annual Reports,1980-1993. Rome Italy International Centre for Birth Defects:1982-1995
11. Jensen TK, Toppari J, Keiding N and Skakkebaek NE: Do environmental estrogens contribute to the decline in male reproductive health? *Clin Chem* 41: 1986-1901,1995
12. European Registration of Congenital Anomalies Report 6 Part 2 : Tables Surveillance of Congenital Anomalies in Europe 1981-1992, Institute of Hygiene and Epidemiology, Brussels 1995
13. Paulozzi LJ, Erickson D and Jackson J: Hypospadias trends in two US surveillance systems. *Pediatrics* 100: 831-4,1997
14. Goldman AS, et al: Induced genital anomalies. *Ann Ny Acad Sci* 142: 755-767,1967
15. Raman-Wilms L, Tseng AL-I, Wighardt S, Einarson TR and Koren G: Fetal genital effects of first-trimester sex hormone exposure: a metaanalysis. *Obstet Gynecol* 85: 141-9,1995
16. Golden RJ et al : Environmental endocrine modulators and human health: An assessment of the biological evidence. *Critical Reviews in Toxicology* 28: 109-227,1998
17. Heinonen OP, Slone D, Shapiro S: Birth defects and drugs in pregnancy. Littleton CO.: Publishing Sciences Group, 1977
18. Berkowitz GS, Lapinski RH, Dolgin SE, Gazella JG, Boadian CA and Holzman IR: Prevalence and natural history of cryptorchidism. *Pediatrics* 92: 44-9,1993

19. Ansell PE, Bennett V, Bull D, Jackson MB, Pike LA, Pike MC, et al :
Cryptorchidism: A prospective study of 7,500 consecutive male birth,1985-8. Arch
Dis Child 67: 892-9,1992
20. Scorer CG: The descent of the testicle. Arch Dis Child 39;605-9,1964

5. 尿道下裂の疫学調査の検討

聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院泌尿器科
高橋 剛

1. 緒言

生活文化の変化に伴い、生活環境中に生み出された様々な化学物質やストレスが生態系特に生殖系に影響を与えていることが指摘されている。このうち、外因性内分泌攪乱物質（いわゆる環境ホルモン）は女性ホルモン受容体と結合し、女性ホルモンと同様の作用を及ぼすことが判明しつつあり、男子の生殖能力を障害すると共に体内で代謝され、胎盤を通じて胎児への影響が懸念されている。

そこで、出産時の先天奇形の実態調査システムの一つとして外因性内分泌攪乱物質（いわゆる環境ホルモン）の小児の外性器異常への関与の質問方式の調査を立案した。この目的のため、外性器形成異常の中で代表的疾患である尿道下裂を対象に疫学調査を計画した。

2. 研究成果の要旨

2-1. 泌尿器科領域での奇形発生状況の分析

住吉らのモニタリングシステムによる調査では、1975年より1997年まで22年間の新生児性器異常は表1のごとくに見られた。このうち、尿道下裂については増加傾向のある年も見られるが有意ではない。発生頻度については米国統計¹⁾の約10分の1であり民族差であるか、統計上の問題が考えられる。本症の外因性内分泌攪乱物質の関与に関する報告は本邦ではまだなかった。

2-2. 環境因子の奇形発生に及ぼす影響についての調査

すでに発見されている尿道下裂患者を対象にその周産期の環境、患者の両親の生活習慣を調査し、外因性内分泌攪乱物質の関与を考察することとした。実施方法としては、小児泌尿器科学会学術委員会の協力を得て、同学会員（会員数757名）のうち外科系会員（泌尿器科503名、小児外科173名）に質問用紙を送付した。その上で、各会員が担当している患者家族にアンケート方式で統一内容の質問項目を調査（表2）し、回答を得た上で集計する。集計したデータの各項目について統計学的解析を行い、環境因子関与の検討を行う。これは、岩本班員と共同して行うこととする。

2-3. 今後の展望

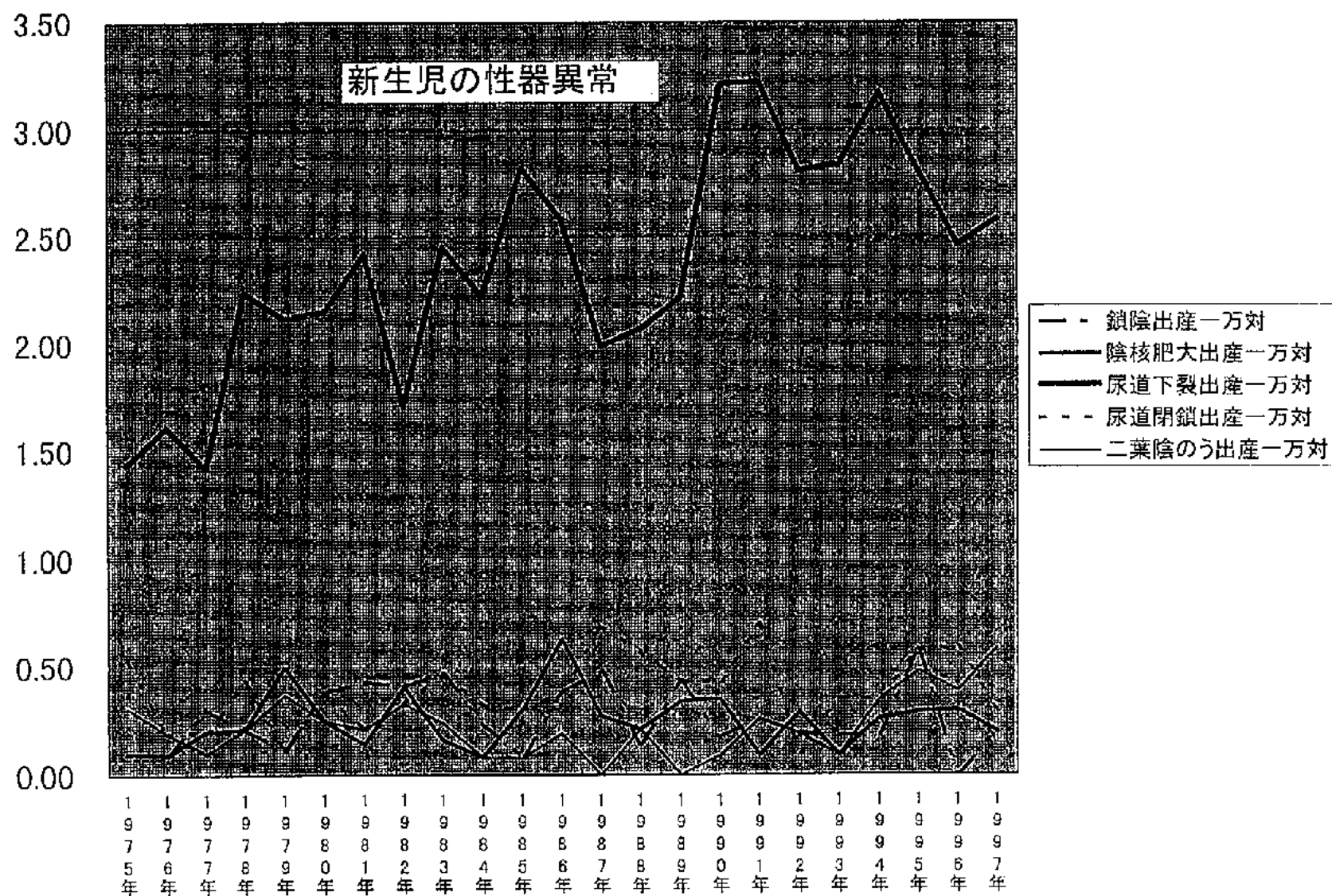
ヒト生殖器先天異常と外因性内分泌攪乱物質の関連性はかなりの確度をもって予測され得るが、予断は許されない。それは今まで疫学調査がなされなかったこととともに先天奇形の発生に影響を及ぼしているかを判定す

る調査システムが確立されていないことによる。今回立案、進行中である調査法にも困難性の伴うことが予想されるが、長期的継続的に定点観測していくことが是非必要である。

3. 参考文献

- 1) Paulozzi L. T., Erikson D., Jackson R.T. : Hypospadias Trends in Two US Surveillance Systems.,
Pediatrics, Vol.100, No.5, 831~835, 1997

(表1)



(表2)

尿道下裂についての全国調査質問表

これはお子様の今回の病気の発生原因を調べ、環境からの影響はあるのかを調査するためのものです。あなたが記入された内容は医学統計以外に用いることは決してありません。記入は今回一回限りですので、正確にご記入くださるようお願い致します。なお本文中の呼び方は次のようにしてあります。

- ・ **本人** (病気のお子様)
- ・ **母、父** (本人のご両親)
- ・ **兄弟** (本人の兄弟)

回答は、○で囲むか () 内に記入して下さい。

尿道下裂調査登録票（担当医記入用）

イニシャル	初診時年齢	受診経路	下裂程度分類	合併奇形	治療方針
(姓・名) 例 日本太郎 (N・T)	才 月 新生児 ()日 才 月 日	1.自院内出生 2.初診来診 3.紹介初診 4.自院内紹介 5.その他	(初診時 外尿道口部位 で判定) 1.亀頭部 2.冠状溝部 3.陰茎前部 4.陰茎中間部 5.陰茎後部 6.陰茎陰囊部 7.陰囊部 8.会陰部	1.二分陰囊 2.鎖肛 3.停留精巣 4.半陰陽 5.外尿道口狭窄 6. VUR 7.陰茎前位陰囊 8.その他	1.手術済み 2.手術予定 3.観察後決定 4.無処置 5.その他
例) N.T.	3才5月	2	6	1, 3, 8	2
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					

1. 現在、通っている病院名()病院
()科
・本人のイニシャル (. .)

例: 日本 太郎(N.T.)

本人（お子様）に関すること

2. 生まれた時の身長・体重を教えてください。

・体重 ()グラム
・身長 ()センチ

3. 本人の出産前に今まで出産したことがありますか

・いいえ

・はい

(2・で「はい」と答えた方のみ次の3・の設問にお答えください)

4. 本人を含めて兄弟・姉妹は何人ですか

()人

5. 本人は妊娠満期で生まれましたか

・ はい

・ 満期前 (週早目)

・ 満期後 (週遅目)

6. 本人は単独で生まれましたか

・ はい

・ 双子

・ 三つ子

・ その他()

7. 出産後、いつ本人の病気(尿道下裂)に気付きましたか

- ・ 出産直後から生後一週間以内
- ・ 乳児検診のとき
- ・ その他()才頃
- ・ 今回の受診まで気付かなかった

8. 本人の尿道下裂について誰が初めに気付きましたか

- | | |
|--------|----------|
| ・助産婦 | ・母 |
| ・産科医 | ・父 |
| ・産科看護婦 | ・祖父母 |
| ・乳児検診医 | ・その他 () |
| ・小児科医 | ・わからない |

9. 兄弟、親類の男の子で同じ病気の人はいいますか

- ・ いない
- ・ いる 兄弟 ()人、親類 ()人

母に関すること

10. 次の質問に教えてください

- ・ 本人(お子様)を含めて今まで何回出産しましたか ()回
- ・ 今まで、妊娠は何回でしたか ()回
- ・ 流産はありましたか 自然流産 ()回
人工流産 ()回
- ・ 今までの妊娠中に異常な事がありましたか ・なし ・あり 内容 ()
- ・ 規則的なとき生理の周期は何日型ですか ()日型

11. 本人(お子様)を妊娠する前の一年間で、生理の周期はどうでしたか

- ・ (ほとんど)規則的
- ・ (ほとんど)絶えず生理不順
- ・ ときどき規則的、ときどき不順
- ・ 薬によって規則的
- ・ 上記のどれでもない
- ・ 具体的に ()

12. 妊娠するまでに何か病気の治療を受けたことがありますか

- ・ いいえ
- ・ はい 具体的に ()
- ・ 治療を受けた期間は () 日間

13. 妊娠するまでにホルモン剤、ピルなどをのんだことがありますか

- ・ ない
- ・ ある 薬の名前 ()

14. 妊娠するまでに何か手術を受けたことがありますか

- ・ いいえ
- ・ はい 具体的な内容 ()

15. ・妊娠中に家事以外の仕事をしていましたか

- ・ いいえ
- ・ はい
 - ・ 週 () 時間
 - ・ 不規則
 - ・ わからない

16. 妊娠するまでに下記の病気にかかったことがありますか

- | | |
|-------------|-------------------|
| ・骨盤の感染または炎症 | ・卵管の炎症 |
| ・卵巣嚢腫 | ・クラミジア感染 |
| ・淋病 | ・膣の分泌異常または真菌のおりもの |
| ・子宮内膜症 | ・甲状腺疾患 |
| ・糖尿病 | ・子宮筋腫 |
| ・破裂した虫垂炎 | ・その他 |

17. 妊娠中に何か薬を服用したことがありますか

- | | | |
|----------------|---------------|--|
| ・特にない | | |
| ・流産防止の薬 () 日分 | ・抗生物質 () 日分 | |
| ・痛み止めの薬 () 日分 | ・ビタミン剤 () 日分 | |
| ・風邪薬 () 日分 | ・ホルモン剤 () 日分 | |

・喘息の薬 () 日分 ・その他

18. 妊娠中に次のことを何回受けましたか

・レントゲン検査 () 回 ・超音波検査 () 回 ・MRI検査 () 回

19. 本人を出産したときなにか治療を受けていましたか

・いいえ ・はい 内容()

父母に関すること

20. 次の質問にこたえてください

・生まれた土地 父() 県 : 母() 県

・そこには何年住んでいましたか
父() 年 : 母() 年

・今住んでいる所 父() 県 : 母() 県

・そこには何年住んでいますか
父() 年 : 母() 年

・今まで一番長く住んでいた所
父() 年 : 母() 年

・本人が生まれたとき父母の年齢は
父() 才 : 母() 才

・父母のここ2年間の健康状態は
父 ・良い ・普通 ・悪い : 母 ・良い ・普通 ・悪い

・最終学歴は 父 () : 母 ()

父母に関すること

21・本人の妊娠が判った時点で、次のような事がありましたか
ありましたら父は△、母は○を付けてください。

・電子レンジの使用	毎日() 毎週() →通算()年	まれに/全然()
・携帯電話の使用	毎日() 毎週() →通算()年	まれに/全然()
・パソコン、ワープロの使用	毎日() 毎週() →通算()年	まれに/全然()
・塗料塗り	毎日() 毎週() →通算()年	まれに/全然()
・金属の溶接	毎日() 毎週() →通算()年	まれに/全然()
・金属の研磨	毎日() 毎週() →通算()年	まれに/全然()
・金属の油とり	毎日() 毎週() →通算()年	まれに/全然()
・有機溶媒での洗浄、汚れとり	毎日() 毎週() →通算()年	まれに/全然()
・接着剤を用いる仕事	毎日() 毎週() →通算()年	まれに/全然()
・プラスチックを接着する仕事	毎日() 毎週() →通算()年	まれに/全然()
・化学物質を噴霧、塗布	毎日() 毎週() →通算()年	まれに/全然()
・写真現像	毎日() 毎週() →通算()年	まれに/全然()
・麻酔薬を使用する仕事	毎日() 毎週() →通算()年	まれに/全然()
・実験室での研究	毎日() 毎週() →通算()年	まれに/全然()
・50度C以上の職場での労働	毎日() 毎週() →通算()年	まれに/全然()
・放射線をうけた	毎日() 毎週() →通算()年	まれに/全然()
・殺虫剤農薬噴霧	毎日() 毎週() →通算()年	まれに/全然()
・ストレスを感じる事	毎日() 毎週() →通算()年	まれに/全然()
・タバコを吸う	毎日() 本 毎週() 本 →通算()年	吸わない
・酒を飲む		
ビール・ワイン・日本酒		
焼酎・ウイスキー・梅酒	毎日() ml 毎週() ml →通算()年	飲まない
・高圧線が近い生活	毎日() 毎週() →通算()年	まれに/全然()
・ごみ焼却場近くの生活	毎日() 毎週() →通算()年	まれに/全然()
・化学工場近くの生活	毎日() 毎週() →通算()年	まれに/全然()
・多量の排気ガスをすうこと	毎日() 毎週() →通算()年	まれに/全然()
・深夜の労働	毎日() 毎週() →通算()年	まれに/全然()
・食事の傾向	魚が多い() 肉が多い() 野菜が多い() どちらでもない()	

その他。何かお知らせ下さる方は下記に御記入下さい

22. 本人の病気について知りたいことはありますか

- ・手術で完全に治るのか
- ・将来結婚に支障ないのか
- ・心理的にコンプレックスをもたないか
- ・遺伝する病気なのか
- ・環境ホルモンの影響があるのか
- ・成長とともに手術した部分も大きくなっていくのか
- ・その他心配な事を何でもお書きください

ご協力ありがとうございました。