

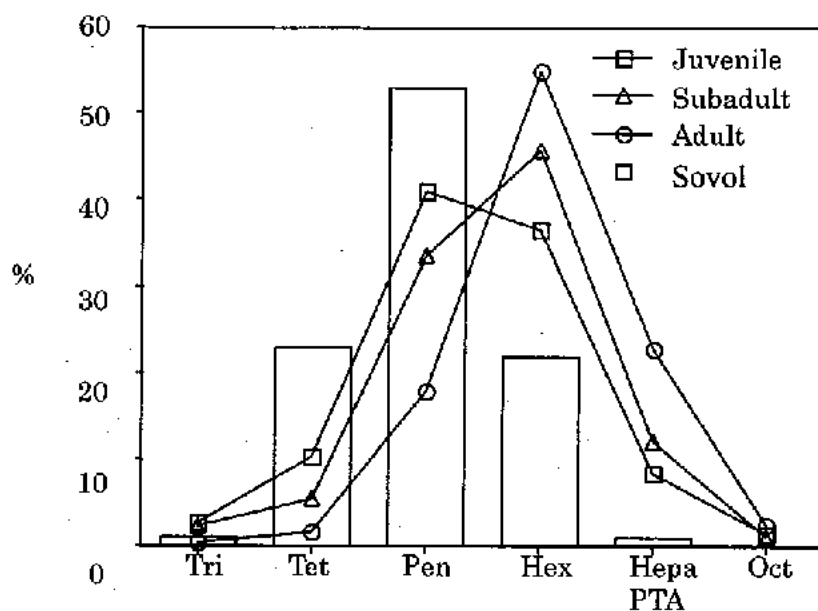


Figure 3. The change of residual PCB congener compositions with growth stage

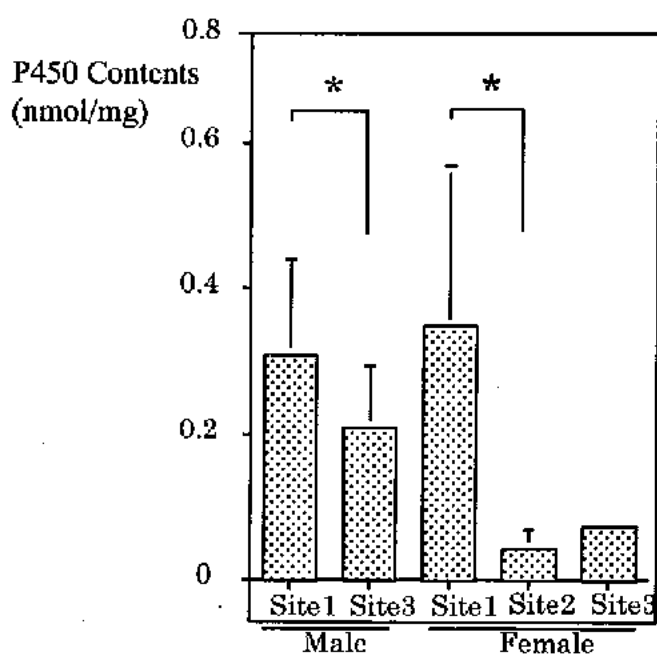


Figure 4. Alterations of cytochrome P450 contents in hepatopancreas of carp
Site1:Hikiji River (downstream),
Site2:Hikiji River (upstream), Site3:Sakai River (reference)

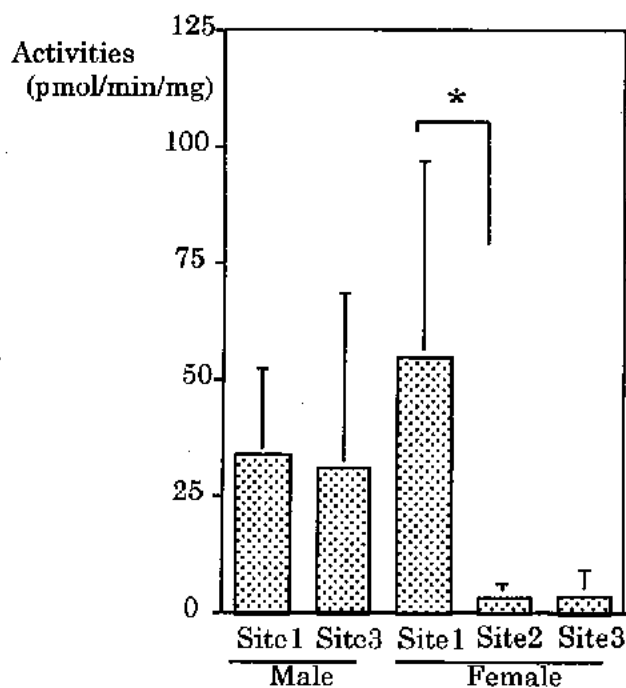
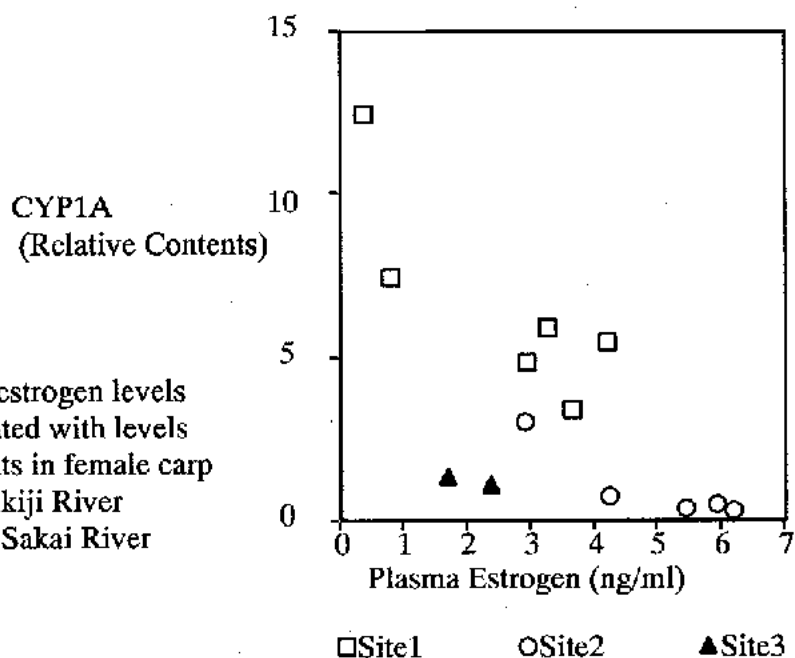


Figure 5. Alterations of EROD activity in hepatopancreas of carp
Site1:Hikiji River (downstream), Site2:Hikiji River (upstream), Site3:Sakai River (reference)

Figure 6. Plasma estrogen levels negatively correlated with levels of CYP1A contents in female carp $p<0.013$, Site2:Hikiji River (upstream), Site3:Sakai River (reference)



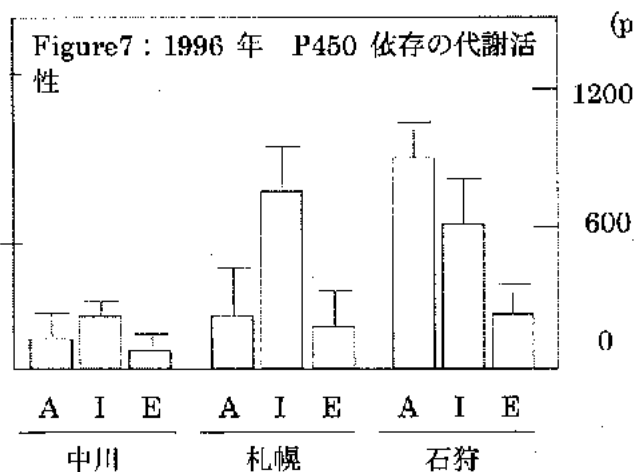
Activity (nmol/min/mg)

12

6

0

Figure7: 1996 年 P450 依存の代謝活性



A:アミノピリンN脱メチル化
I:イミプラミンN脱メチル化
E:EROD

Figure8 : 2000 年 EROD 活性

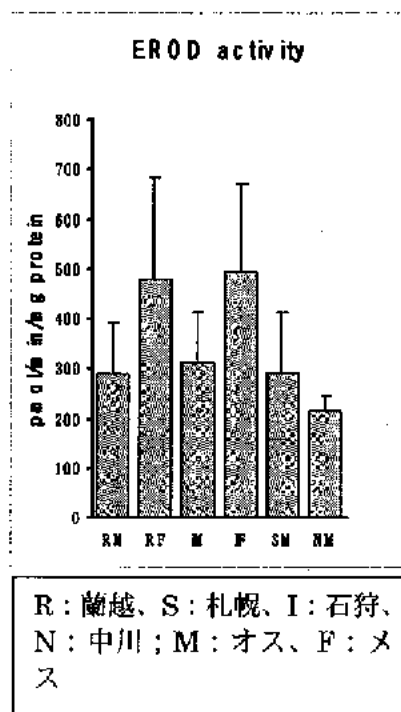
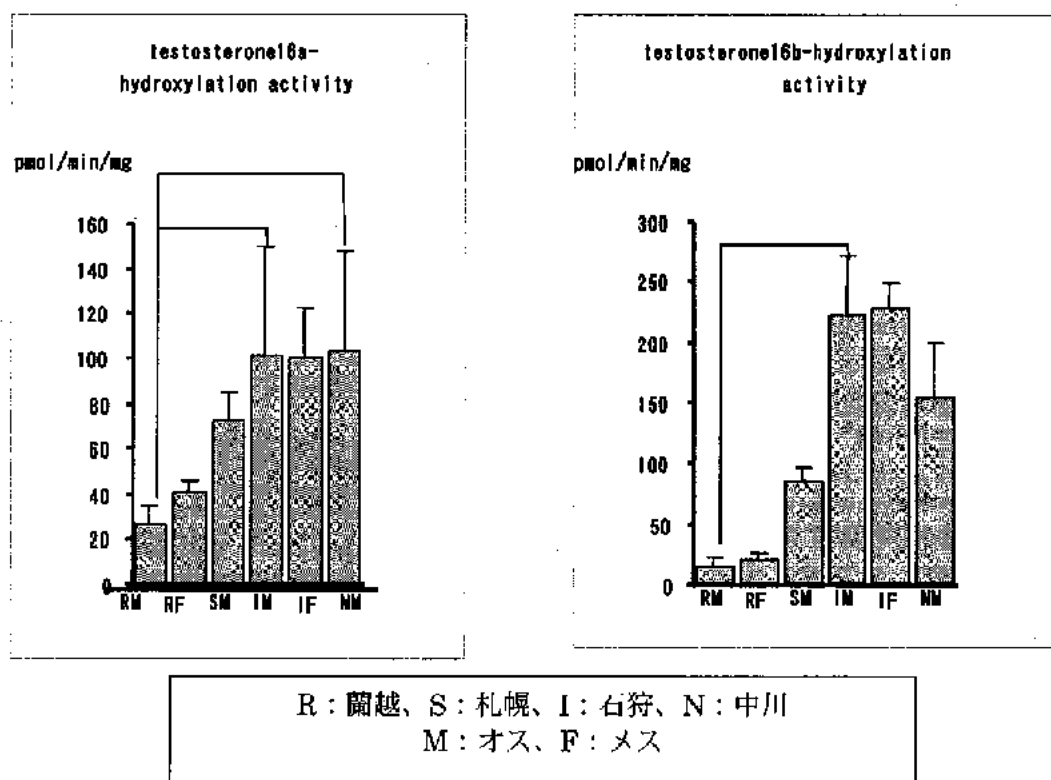


Figure9 : 2000 年 テストステロン代謝活性



10. 生殖発達毒性に関する研究

研究者 鈴木 勝士（日本獣医畜産大学教授）

研究要旨

生殖腺発達過程に対する内分泌攪乱化学物質の影響に関しては、初期発生、胎生期および生後初期の生殖腺発生過程、生後の生殖機構成立過程における内分泌および神経系の発達に対する影響等が考えられている。他方、生殖細胞系列自体への突然変異誘発性も憂慮されている。本研究では、当教室で発見維持されている、これらの生理的過程に異常を示す複数の突然変異ラットの系統(hgn: ocd: lde)をモデルとして、その病態解析と遺伝解析を通じて、生殖発達攪乱の解析に有用な方法の検討、毒性マーカーとして有用な機能分子の検索、環境要因によって生じたと考えられる遺伝的変異の同定を目指して研究を進めてきた。遺伝解析と病態解析の結果、体節形成、泌尿生殖器等のこれらのラットの異常は、環境因子への暴露によって生じると考えられる広範な生殖発達機構の異常について、モデルとして利用できることが判明した。これらのミュータントの異常の起源は、30年以上前にクロズドコロニーの維持過程で器具機材の消毒に使用されていた化学物質による可能性があり、そうであれば、環境要因により生殖系列に生じた劣性突然変異が世代を越えて維持された例に相当する。今後、病因遺伝子とその異常が確定できれば、化学物質による遺伝子のヒットポイントの共通性を見出させる可能性がある。今後、正常ラットの生殖系列に対する薬物誘発突然変異の解析を実験に加える予定である。

研究協力者名

鈴木浩悦（日本獣医畜産大学 助手）

斎藤賢一（日本医科大学医療技術専門学校
助教授）

A. 研究目的

生殖腺発達過程に対する内分泌攪乱化学物質の影響に関しては、初期発生に対する影響、胎生期および生後初期の生殖腺発生過程に対する影響、生後の生殖機構成立過程における内分泌および神経系の発達に対する影響等が考えられる他、生殖細胞系列自体への突然変異誘発性が憂慮されている。そこで本研究では、これらの生理的過程に異常を示す複数の突然変異ラットの系統をモデルとして、その病態解析と遺伝解析を通じて、生殖発達攪乱の有用な解析方法の検討、毒性マーカーとして有用な機能分子の検索、環境要因によって生じたと考えられる遺伝的変異の同定を目指して研究を進める。精巣形成不全症（HGN）では、胎生後期から生後初期にかけての精巣セルトリ細胞の増殖低下とアポトーシスにより精巣形成不全を生じ、生後初期に始原生殖細胞が精粗細胞に分化できずに死滅する。骨軟骨形成不全症（OCD）では、骨軟骨の形成不全から長骨の短縮を主

徴とし、体躯、頭部、四肢、および尾の短縮、全身性の水腫、口蓋裂、突舌などを呈して、出生直後に呼吸困難により死亡する。矮小ラット（LDE）では、生後の体成長遅延、発作性癲癇、生殖障害を示し、生後45日前後で死亡する。これらのラットの突然変異は当教室で維持していた原種クロズドコロニーにおいて、何らかの環境影響により生殖細胞系列ゲノムに生じたと考えられる。また、それぞれの病態は、同様な異常が胎生期あるいは生後の化学物質などの環境影響によっても生じる可能性があり、それらの作用の解析モデルとして有用である。

B. 研究方法

1. 精巣形成不全症ラット（HGN）に関する研究

精巣形成不全症ラット（hgn/hgn）の原因遺伝子はラット第10染色体に存在し、生殖腺の発達および生殖細胞の分化にとって重要な因子をコードしていると考えられる。本年度は、原因遺伝子の同定を目指して、hgn遺伝子座周辺の詳細なリンケージマップ、病因遺伝子を含む領域のRadiation Hybrid map、さらにマウスの第

11 染色体上の相同領域での *hgn* 遺伝子座の位置を明らかにするために、マウス-ラットの comparative map を作成した。さらに *hgn* 存在領域を含むラット YAC をスクリーニングするとともに、マウス第 11 染色体上の相同領域にマップされているいくつかの候補遺伝子について、正常および発症の精巣と腎臓でその発現を調査した。連鎖解析のために作成した Brown Norway (BN) 系統とのバッククロスで 1000 匹以上のバッククロス個体を作成したが、その雌個体は精巣形成不全症としての原因遺伝子 (*hgn* 遺伝子座) のマッピングには使用できない。それらを用いて *hgn* 遺伝子座周辺のマイクロサテライトの詳細なリンケージマップを作成すると共に、雄において *hgn* 遺伝子座と完全連鎖するマーカーを用いて、雌の *hgn* に関する遺伝子型を推定し、表型特性を比較することで、マップされた *hgn* 遺伝子の雌体成長や生殖性に対する影響を評価した。*hgn* の系において、*hgn* と連鎖するマーカーにより遺伝子の発現は胎生期既に開始していると考えられるが、精巣と腎臓の大きさでの遺伝子型判定では、胎生期のより早期に遡って、発症と非発症とを判別し、比較することは困難である。そこで外交配-バッククロスの遺伝子型を判定し、胎生期発生過程に対する *hgn* 遺伝子の影響を調査した。

2. 骨軟骨形成不全症 (OCD) に関する研究

本症の病因遺伝子 *ocd* は染色体に当てはめられていなかった。そこで HGN 系統と同様にリンケージ解析により *ocd* 遺伝子座のマッピングを行った。本症は致死性であるため、連鎖解析には雑種第一代 (F1) 同士の交配により得られた F2 の発症個体を用いた。また、交雑群で病因遺伝子と連鎖する複数のマイクロサテライトにおいて OCD の系統内多型が見られたため、系統内の 100 匹の発症個体と RH パネルを用いて病因遺伝子存在領域のより詳細なリンケージマップを作成した。また、系統内多型の由来に関して、当教室で維持している系統と外来系統に関して調査をした。外交配の系で得られた発症個体に関して表型を調査した。外貌観察、腹腔内臓器の観察、骨格系の観察、各臓器の組織観察を行った。

3. 癲癇を伴う矮小ラット (LDE) に関する研究

本系統は系統確立過程であるため、系統内での発症率から遺伝様式を決定した。体成長、死亡日齢、各種臓器の成長と組織観察、下垂体機能 (特に成長ホルモンについて、SDS-PAGE および免疫染色) に関して評価を行った。

(倫理面への配慮)

動物の取り扱いと管理に関する NIH のガイドラインに準拠して実験を行った。

C. 研究結果

精巣形成不全症 (HGN) に関して

連鎖解析により、*hgn* 遺伝子座は、*D10Rat161*、*D10Rat211*、*D10Rat195*、*D10Rat130* と *D10Rat168* との間の 0.36cM の領域にマップされた。さらに、*hgn* 遺伝子座は、*Whn*、*D10Rat169*、*D10Arb9* (*Aldo3*) の 3 個の遺伝子座と総計 565 匹の雄の戻し交配仔でもなお完全連鎖することが判明した。RH パネルにより、*D10Rat161*、*D10Rat211*、*D10Rat195*、*D10Rat130* の並びが決定され、*hgn* 遺伝子座の位置は *D10Rat195* および *D10Rat130* から *D10Rat168* の間の 22.6cR の範囲に位置することが判明した。ラットの YAC のスクリーニングでは、この範囲を網羅する単一の YAC を見出すことはできなかった。新規にこの領域にマップされたマウスの EST を調査したが、有力な候補は見いだせなかった。バッククロスの雌 468 匹について、*hgn* 遺伝子座周辺の連鎖地図を作製したところ、雄で得られた結果を裏付ける詳細な連鎖期間、離乳後、成熟までの体重は有意に軽かった。また、腎臓についても、ホモ型の腎重量は、ヘテロ型に比べて有意に小さかった。地図が作製された。雄で *hgn* 遺伝子座と強固に連鎖するマーカーにより、総別した雌のバッククロスにおいては、マーカーホモ型はヘテロ型に比べ体成長が全体的に遅延し、哺育性周期に関しては、ヘテロ型は 100~225 日では 100% の個体が正常な性周期を示したが、ホモ型では 131 日齢までに持続的発情を示すものが 43% 存在し、225 日までには持続的無発情を示すものが 17% 見られ、*hgn/hgn* の雌が早期不妊症を引き起こすことが確認された。卵巣組織で持続的発情を示した *hgn/hgn* 個体は、ヘテロ型と比較して明らかに卵胞数が少なかった。持続的無発情を示した個体の卵巣には、比較的多くの卵胞

が見られたが、いずれも成熟卵胞に至る前に閉鎖していた。正常性周期を示すホモ型の個体においても、卵巣および子宮重量はホモ型で有意に軽く、これらの臓器に対して *hgn* 遺伝子の影響があることが考えられた。BN とのバッククロスから得られた胎生 17.5、19.5、および 21.5 日齢のホモ個体は、同腹ヘテロ個体に比べて、体重、胎盤、腎重量において、明らかに低下していた。精巣および腎臓の発生に関しては、胎齢 19.5 および 21.5 日のホモ型において、生後の *hgn/hgn* の病理発生の前段階と考えられる形態学的変化を確認することができた。

骨軟骨形成不全症 (OCD) に関して

F2 において、発症の見られた腹では正常 33 匹、発症 14 匹が得られ、 χ^2 検定で 3:1 の分離比に適合していた。発症の 14 匹を使用して、各染色体のマイクロサテライトマーカーでタイピングを行ったところ、*ocd* 遺伝子座が D11Mgh3 と完全に連鎖していることが判明した。さらに OCD 系統内で D11Mgh3 近傍のマイクロサテライトに関して多型が存在することが判明し、33 匹の intercross で *ocd* 遺伝子座と完全連鎖を示す D11Rat93、D11Rat94、D11Arb4、D11Rat3、および D11Mgh3 ならびに *ocd* 遺伝子座のごく近傍のマーカーに関して RII パネルを用いて配列すると共に、系統内の *ocd/ocd* を 100 匹のゲノミック DNA を用いて、これらのマーカーをタイピングした結果、*ocd* 遺伝子座は、D11Rat64 と D11Rat95 との間の 28.1cR の範囲に存在することが判明した。また、この領域に相同なマウスの第 16 染色体においては、*ocd* 遺伝子座は D16Mit57 から *Mox2* との間が存在する。F2 発症個体の表型解析では、すべての発症個体で、頭部、四肢、体軀および尾の短縮、腹部膨満、全身性皮下水腫、口蓋裂および突舌を認め、全身骨格の骨標本ではすべての発症で長骨の短縮がみられた。腎臓の異常としては水輸尿管症が 63.2% の個体で認められた。大腿骨頭の矢状断、腎臓の長軸断面、甲状腺および気管の断面、心臓、肺、胸腺、皮膚に関して病理学的観察を行い、OCD 系統での発症個体と同様な異常所見を認めた。

癩癰を伴う致死性の矮小症 (LDE) について

発症と非発症とが約 3:1 に分離し、 χ^2 検定の結果、本症が常染色体性単純劣性で遺伝する可能性が示唆された。*lde/lde* は、3 日齢以降体成長が有意に遅延していた。平均死亡日齢は *lde/lde* 雌で 46.20 ± 18.80 日、*lde/lde* 雄で 44.30 ± 20.50 日であった。病理学的検査では、*lde/lde* の精巣で精細管の萎縮、生殖細胞の精細管内腔への脱落などの変化が見られたが、精巣以外の臓器では、光学顕微鏡観察のレベルではあきらかな病理学的異常は見られなかった。下垂体抽出液の SDS-PAGE では、雌雄両方の表現型正常 (+/?) および *lde/lde* でラット GH の分子量 (約 22,000) に相当する位置に明瞭なバンドが確認された。さらに Western blotting 法により、+/? および *lde/lde* の両方で、このバンドが GH であることを確認した。さらに +/? および *lde/lde* ラットの両方で細胞質が抗 GH 抗体に明瞭に染色される細胞が検出され、その数は +/? および *lde/lde* ラットで同程度であった。また ELISA での血漿 GH の測定では、+/? と *lde/lde* ラットとの間で有意差は見られなかった。行動学検査では、*lde/lde* ラットにおいて、四肢姿勢、よろめき歩調、異常歩調および握力に明らかな異常が見られた。

D. 考察

性腺形成不全症ラットに関して

今回の実験で *hgn* 遺伝子座は、約総数 1000 匹以上のラットバッククロス、RII パネル、100 匹のマウスバッククロスなどを用いた検討により、D10Rat195 および D10Rat30 から D10Rat68 の間の 0.36cM (22.6cR) の範囲に存在することが判明した。この情報をもとにラットの YAC (WI/MIT) ライブラリーをスクリーニングしたが、この領域を網羅する単一のクローンを見出すことはできなかった。今後、複数のクローンによるコンティグを作成すると共に、他の YAC、BAC、あるいは PAC ライブラリーをスクリーニングする必要性がある。マウスではいくつかの EST に関して調査を進めたが、*hgn* の病因遺伝子として有力なものは見いだせなかった。*hgn* 遺伝子座は 565 個体のバッククロスでも、ヌードマウスおよびヌードラットの原因遺伝子である *whn* (winged helix of nude) と完全に連鎖しているため、*whn* の極近傍に存在すると考えられる。ヌードマウスに

においては、病因遺伝子 *whn* の同定の過程で、周辺に多数のマイクロサテライトや EST がマップされており、コンディグも作成されている。今後、これらのマーカーの中からラットに應用できるものを選抜して、マウスラット間のより詳細な比較地図を作成すれば、この領域のマウスの情報から *hgn* 遺伝子を見いだせる可能性がある。以上の遺伝解析とは別に、BN とのバッククロスの系で *hgn* 遺伝子座と連鎖するマーカーを利用することにより、雌の表現型特性や胎生期の発生に対する *hgn* 遺伝子座の影響を調査することができた。*hgn* 遺伝子はしても、雄だけでなく雌においても、遺伝的背景の変更された外交配の系で、体成長や繁殖性に影響を及ぼすことが確認された。また、胎生期においては、精巣および腎臓の発生だけでなく、胎生期の体成長や胎盤の成長に対しても影響を及ぼすことが判明した。

骨軟骨形成不全症 (OCD) に関して

遺伝解析により *ocd* 遺伝子座をラット第 11 染色体上にマップすると共に、RH パネルおよび系統内多型の存在を利用して、*ocd* 遺伝子座周辺の比較的詳細なマップを作成することができた。*ocd* 遺伝子座周辺の多型性は、当教室で維持していたクローズドコロニーにもともと存在していたものであり、本症が致死であるために、OCD 系統が *ocd*/+ 同士の交配で維持されてきたために、*ocd* 周辺の多型性が系統内で保持されてきていたと思われる。いずれにしても系統内で遺伝子型を判別できるマーカーが見出されたため、効率的な動物生産と胎生期に遡っての病態解析が可能となった。これまでのところ、*ocd* が存在すると考えられるマウスおよび人の相同領域に *ocd* で見られる異常をうまく説明しうる有力な候補はマップされていない。今後、*ocd* に関しても *hgn* と同様に詳細なリンケージマップの作成と候補遺伝子検索を行っていく必要がある。本症は、見かけ上単一の遺伝子で、様々な臓器の器間発生に対して多様な異常を引き起こす。外交配の系で得られた発症個体でも系統内のものと同様な異常が見出されており、*ocd* 遺伝子が様々な臓器の形態形成に対してクリティカルな役割を果たしていることは明らかである。

癲癇を伴う致死性の矮小症 (LDE) に関して

LDE に関しては、本研究でその遺伝様式が上記の 2 系統と同様に常染色体性単純劣性であることが判明した。次のステップでは外交配の系を用いた連鎖解析を行い、病因遺伝子を染色体上に当てはめて、候補遺伝子を検索する必要がある。表型に関しては、本症が体成長の重度の遅延を示して、早期死亡することが判明した。今回は成長ホルモンに関して調査を行ったが、SDS-PAGE、ブロッティング、免疫染色、ELISA の結果から本症では成長ホルモンの産生はあると考えられる。今後、レセプター以降のホルモンに対する応答性、細胞内カスケード、IGF などの成長因子、それ以外のホルモン（甲状腺ホルモンなど）に関して調査を進める必要がある。

本症ラットは特に精巣組織に異常を呈することから、FSH、LH、PRL などの血中ホルモンレベルの調査が必要である。矮小系統はラットやマウスでは多数報告されているが、本症のように、歩行異常や癲癇を伴うものは報告されていない。マッピングの結果、ある程度染色体領域を絞ることができたならば、矮小や神経異常の原因遺伝子としての候補遺伝子を調査することが有効であると考えられる。

E. 結論

当教室で維持している複数ミュータントラットについてその遺伝解析および病態解析を行った。これらのラットの異常は、環境因子への暴露によって生じると考えられる生殖発達機構の広範な部分についてその病態解析モデルとして利用できると思われる。これらのミュータントの異常の起源は、30 年以上前にクローズドコロニーの維持過程で器具機材の消毒に使用されていた化学物質による可能性がある。さもすれば、環境要因により生殖系列に生じた劣性突然変異が世代を越えて維持された例を示すものであろう。今後、病因遺伝子とその異常が確定されれば、遺伝子自体のヒットポイントとしての共通性を見出させる可能性がある。今後、正常ラットの生殖系列に対する薬物誘発での突然変異解析を実験に加えたいと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki, H., M. Kokado, K. Saito, T. Kunieda and K. Suzuki (1999). A locus