

るが、腹数が少なかったことと、今回妊娠黄体数が調べられていないことから、過去の報告に見られるような着床阻害に関しては情報が得られなかった。

表2 TBT 0, 4, 8, 16mg/kgおよびMMS 50mg/kg投与群の出生児数と出生時体
並びに外貌異常

	0mg/kg (5)	TBT16mg/kg (6)	MMS 50mg/kg (6)
産児数	14.00 ± 2.35	13.00 ± 1.41	- ±
着床痕	15.20 ± 1.90	14.00 ± 1.00	14.00 ± -
出生児体重			
雌(g)	5.79 ± 0.21	6.2 ± 0.12	±
雄(g)	6.25 ± 0.18	6.6 ± 0.08	±
外表奇形	0/70	0/52	

()内は腹数

外表奇形の頻度は総出生児数あたりの出現数

3. マイクロサテライトマーカーの分析

(1) 13年度実験の際にマイクロサテライトパターンで変異が検出されたマーカーに関する詳細な検討

昨年度の報告書では、変異の検出について以下のように記載されている。

以下の表(この報告書では次ページ)に示されるように、20種類のマイクロサテライトマーカーのうち8種類のマーカーで泳動パターンに異常が認められた。陰性対照群では、母親、父親、児動物の肝臓、性腺のいずれのサンプルでも各マイクロサテライトマーカーに特有の斉一なパターンが観察され、近交系動物の特徴を示した。TBTのみに変異が認められたのは、5、6、9、17および20番染色体上の5種類のマーカーであり、MMSのみに変異が認められたのは7および11番染色体上の2種類のマーカーであり、TBTとMMSの両方で変異が認められたのは2番染色体上のマーカーであった。

変異が認められたサンプルは性腺由来のDNAに限られており、20番染色体上のマーカーの場合にはTBT4、8、16mg/kg群の順に雄雌を合計した変異の頻度は、

電気泳動上確認された増幅産物の泳動パターンの差異を昨年の報告書ではとりあえず変異としたが、本当にTBTあるいはMMSの母体投与により出生児の性腺のDNAに変異を起こしたのか否か、慎重に検討しないと正しい結論が得られない。そこで、まず増幅産物の泳動像に差異が見られた個体と差異を示したマイクロサテライトマーカーについて、残されたデータをさかのぼって、サンプルの採取、DNA抽出、PCR条件、泳動条件について再度チェックした。

その結果、一部に死亡した動物からサンプルを得た場合に増幅パターンに差があったものが見つかった。また、電気泳動にかける際DNA含量を可及的一定にしていたにもかかわらず増幅が良好に行われなかったものも見つかった。これらについて、サンプルが残っ

ていることが確認されたため、再度増幅から実施して昨年度検出された「変異」が再現的に検出されるかまず確認することにした。

表 変異の検出された染色体と変異の出現率

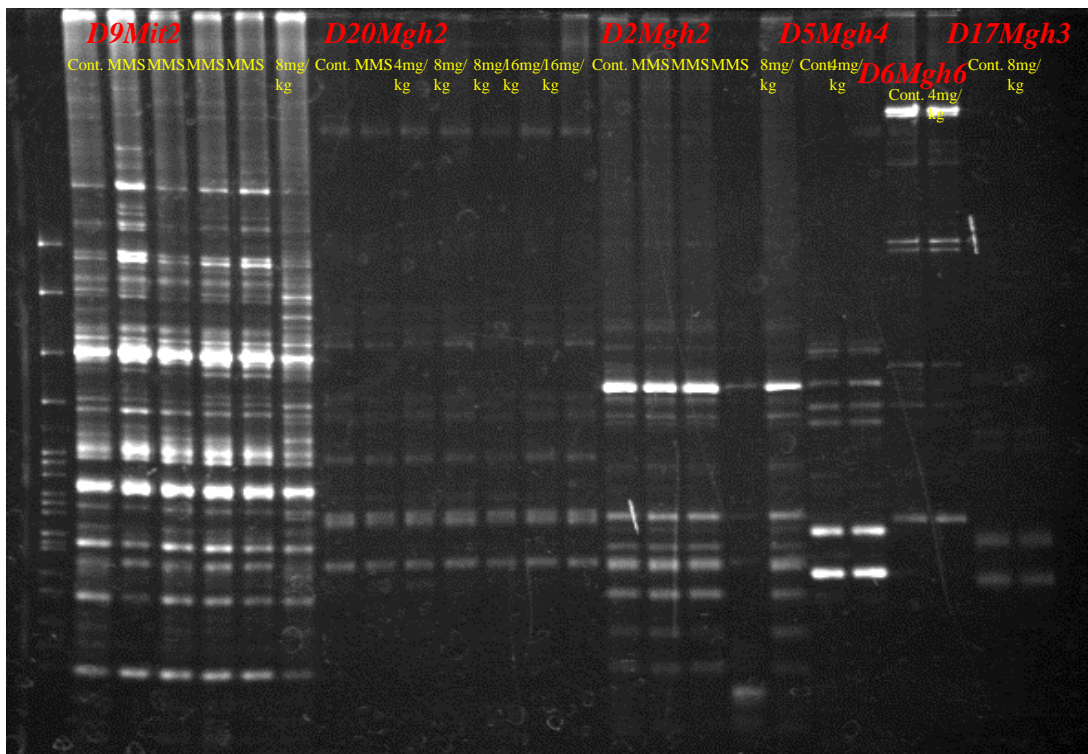
染色体	用量	母	父	雄子肝臓	雄子生殖腺	雌子肝臓	雌子生殖腺
2	0	0/4		0/16	0/15	0/9	0/7
	4	0/5		0/15	0/13	0/17	0/13
	8	0/5		0/20	1//20	0/22	0/13
	16	0/6		0/30	0/30	0/21	0/16
	MMS50	0/5		0/18	1//23	0/18	2//15
	total	0/25	0/9	0/99	2/101	0/87	2/64
5	0	0/4		0/16	0/15	0/9	0/7
	4	0/5		0/15	0/13	0/17	1//13
	8	0/5		0/20	0/20	0/22	0/13
	16	0/6		0/30	1//30	0/21	0/16
	MMS50	0/5		0/18	0/23	0/18	0/15
	total	0/25	0/9	0/99	0/101	0/87	1/64
6	0	0/4		0/16	0/15	0/9	0/7
	4	0/5		0/15	0/20	0/17	1//23
	8	0/5		0/20	0/20	0/22	0/13
	16	0/6		0/30	0/30	0/21	0/16
	MMS50	0/5		0/18	0/23	0/18	0/15
	total	0/25	0/9	0/99	0/101	0/87	1/64
7	0	0/4		0/16	0/15	0/9	0/7
	4	0/5		0/15	0/13	0/17	0/13
	8	0/5		0/20	0/20	0/22	0/13
	16	0/6		0/30	0/30	0/21	0/16
	MMS50	0/5		0/18	1//23	0/18	0/15
	total	0/25	0/9	0/99	1/101	0/87	0/64
9	0	0/4		0/16	0/15	0/9	0/7
	4	0/5		0/15	0/13	0/17	0/13
	8	0/5		0/20	1//20	0/22	0/13
	16	0/6		0/30	0/30	0/21	0/16
	MMS50	0/5		0/18	0/23	0/18	0/15
	total	0/25	0/9	0/99	1/101	0/87	0/64
11	0	0/4		0/16	0/15	0/9	0/7
	4	0/5		0/15	0/13	0/17	0/13
	8	0/5		0/20	0/20	0/22	0/13
	16	0/6		0/30	0/30	0/21	0/16
	MMS50	0/5		0/18	0/23	0/18	1//15
	total	0/25	0/9	0/99	0/101	0/87	1/64
17	0	0/4		0/16	0/15	0/9	0/7
	4	0/5		0/15	0/13	0/17	0/13
	8	0/5		0/20	0/20	0/22	1//13
	16	0/6		0/30	1//30	0/21	0/16
	MMS50	0/5		0/18	0/23	0/18	0/15
	total	0/25	0/9	0/99	1/101	0/87	1/64
20	0	0/4		0/16	0/15	0/9	0/7
	4	0/5		0/15	0/20	0/17	1//13
	8	0/5		0/20	1//20	0/22	0/13
	16	0/6		0/30	5//30	0/21	0/16
	MMS50	0/5		0/18	0/23	0/18	0/15
	total	0/25	0/9	0/99	6/101	0/87	1/64

この表は昨年度の成績を再掲したものである。

(2) 「変異」の再現性

D9Mit2、D20Mgh2、D2Mgh2、D5Mgh4、D6Mgh6、D17Mgh3 についていずれも対照と「変異」を示したサンプルについて、再度 DNA を PCR 増幅し電気泳動にかけたところ

る、以下の図 1 に示すように、D9Mit2 と D20Mgh2 の TBT8mg/kg 群のサンプル（同一個体）で昨年度報告した異常が再現された。他の昨年異常を検出した事例では、いずれも対照群と同様な増幅産物の泳動パターンが得られた。その結果、もし「変異」が起こったとするならば D9Mit2 と D20Mgh2 の TBT8mg/kg 群の動物について詳細な検討を加える必要があると判明した。D7Mgh7 と D11Mgh3 についても同様の検討をした結果、異常は検出されなかった（データは示さない）。



前回の発表で変異である可能性があると判定した個体の生殖器の泳動結果。前回変異である可能性があると判定したパターンを示す。

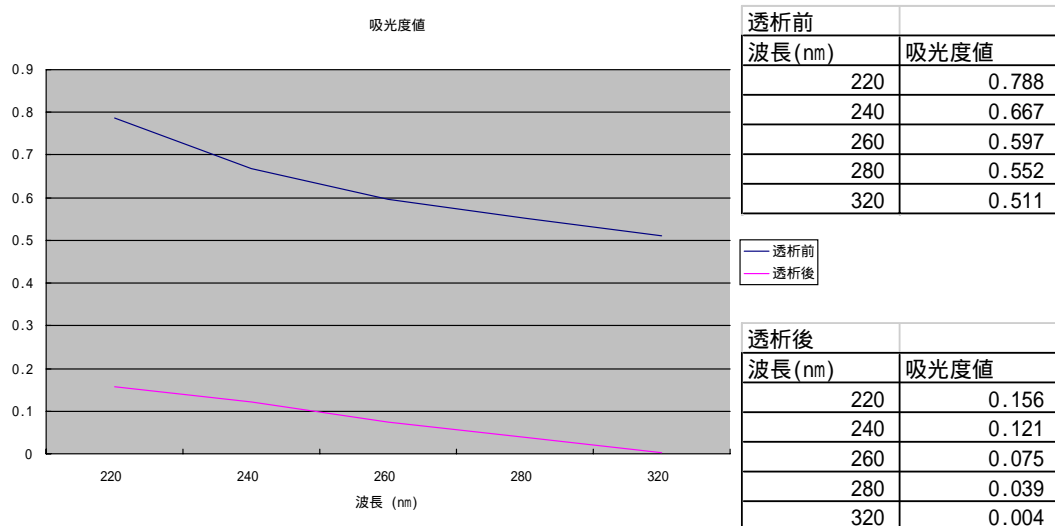
図 1 D9Mit2、D20Mgh2、D2Mgh2、D5Mgh4、D6Mgh6、D17Mgh3 の増幅パターン

(3) D9Mit2 と D20Mgh2 の TBT8mg/kg 群のサンプルの特殊性 その 1

データをさかのぼって調べたところ、この二つのマイクロサテライトマーカーで異常が検出されたサンプルは同一個体のものであった。このサンプルは、死後発見された動物から得られていたことが判明した。採取時の判断で何とか DNA が抽出できると判定されてプロセスされていた。十分量のコンタミネーションのないサンプルが得られているか否かを確認するため、残っていたサンプルが吸光分析された。次ページの図 2 に示すように、220nm 近辺の吸光度が高かった。生後 1 日齢の死後サンプルされた精巢の DNA 値は 6 日齢のものより高い値を示した（280nm:蛋白も）。抽出用の試薬がもっと遅い日齢の重量に対しての希釈を考慮して作られているところから、抽出液に含まれた EDTA、SDS、Tris などの塩類が混入している可能性が考えられた。そこで抽出液を透析し、透析液について再度吸光度分析を行った。いずれの波長でもほぼ同じレベルの吸光度の減少があり、何ら

かの光学的密度の高かつこの波長域で同等な吸収のある物質が混入していたと考えられた。

残っているサンプルの透析後、再度 PCR と電気泳動を実施する必要が生じた。



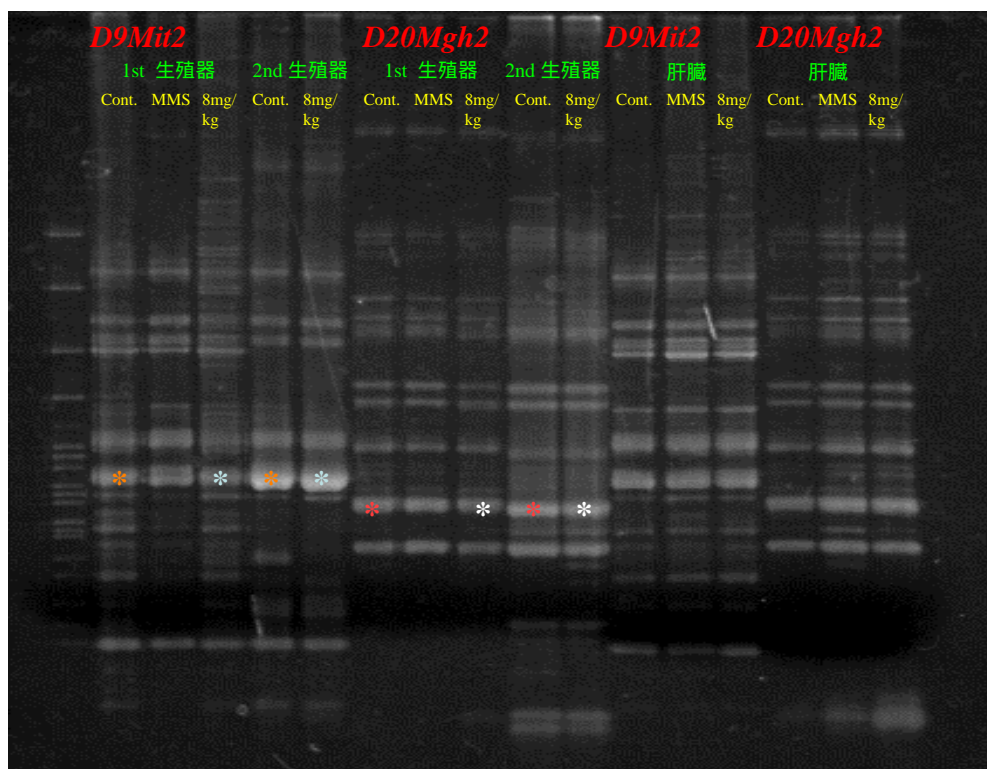
前回の発表で変異である可能性があるかと判定したサンプルの吸光度値。このサンプルは1日齢の死亡仔から抽出された精巢であり、6日齢の生存仔から抽出したサンプルよりもDNA濃度が高い値を示していた。吸光度値を再検討し、透析を行った。

図2 TBT8mg/kg の異常個体サンプルの透析前後の吸光度分析

(4) D9Mit2 と D20Mgh2 の TBT8mg/kg 群のサンプルの特殊性 その2

昨年来用いてきたマイクロサテライトマーカーによる DNA 増幅産物の電気泳動像では、通常の遺伝子増幅の場合のように想定される分子量（移動度）の単一バンドが得られる訳ではなく、想定分子量より大きな分子量の複数のバンドが増幅されている事例が多かった。増幅に際してマーカーと結合が何らかの理由でずれたりする、いわゆるミスマッチによって染色体の別の部位を増幅しているものと、増幅された産物が反応液に存在する塩類イオンと相互作用して高次構造が変わることによって、電気泳動の移動度が変わる可能性がある。複数のバンドが生じることには、そのほかにも未知の要因が関与している可能性があると考えられる。これらの複数のバンドについて別々に切り出してシーケンス分析を経験したことがあるが、メインバンドとサブバンドで同一配列であると確認された事例があった。

D9Mit2 と D20Mgh2 に関して、PCR 産物の一部を 2nd PCR にかけて、同じマイクロサテライトマーカーで増幅し、異なったパターンに由来するものが増えるか否か、バンドパターンを比較した。



前回の発表で変異である可能性があると判定した個体の肝臓および生殖器の1stおよび主要なバンドの2ndPCR。前回変異である可能性があると判定したパターンを * で示す。

図3 D9Mit2 と D20Mgh2 による主要バンドの 2nd PCR

D9Mit2 と D20Mgh2 双方について、星印で示したように 1 回目の PCR では主要バンド以外に高分子領域に差異が認められる。高分子量領域のバンドの増幅をめざして、レーン全体を切り取り、2 回目の PCR 増幅を行ってその産物の電気泳動を行うと、対照と異常固体の増幅産物はともに同じパターンを示した。この結果、1 回目の PCR により増幅された高分子領域のバンドが消失し、バンドパターンは全体的に単純化した。高分子量領域で 2 回目の PCR では出現しなかったバンドについては、なんらかの誘発性の変異を示している可能性も捨てきれないので、メジャーバンドの外に高分子バンドについても切り出して 2 回目の PCR につけ、同様な分析をする必要があると考えられた。

(5) D9Mit2 と D20Mgh2 による主要バンド以外のバンドの 2nd PCR

レーン全体から 2nd PCR によって再現性良く複数の単純化されたバンドが、対照と TBT8mg/kg 群のかつて異常と判定された精巢の DNA サンプルで増幅されることが確認されたので、主要バンド以外のバンドから逆にメジャーバンド相当のバンドが 2nd PCR により増幅されるか否かを確認するとともに、図3の実験で増幅されなかったバンドが何に起因しているのか推測を試みることにした。

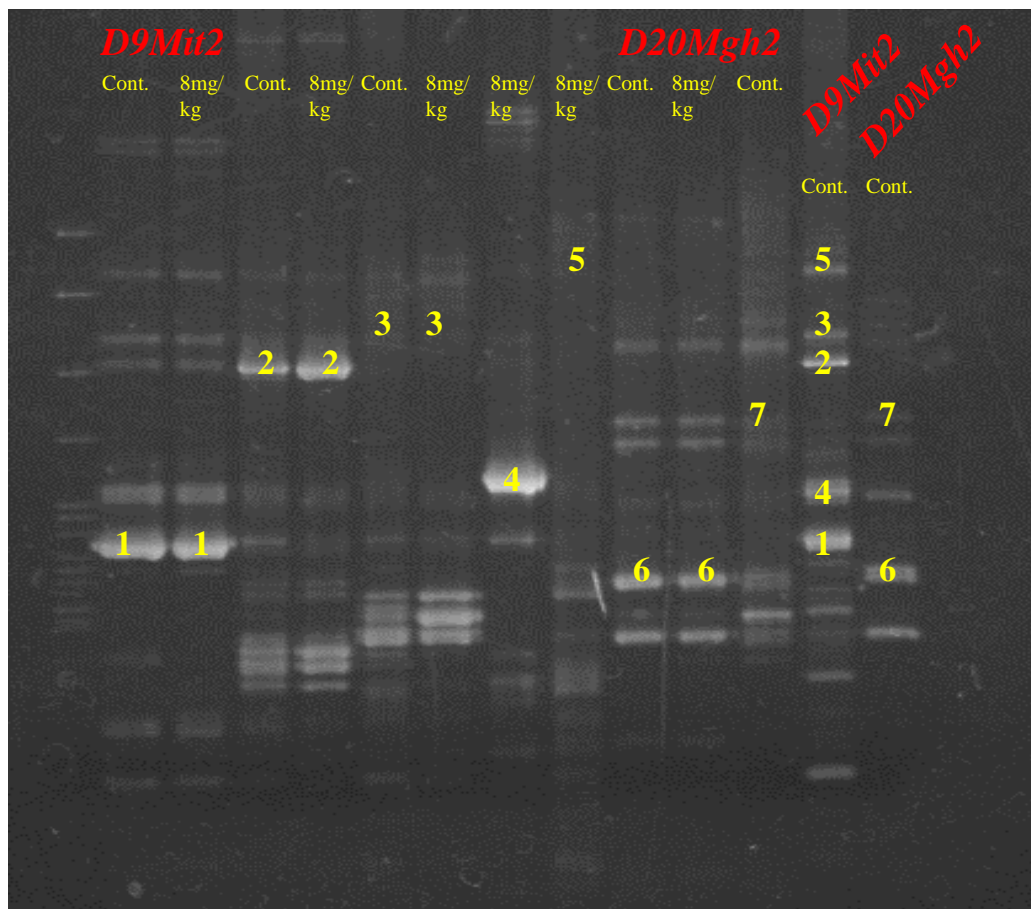


図4. アクリルアミドゲルから切り出したバンドの2nd PCR。

図中右の2つのレーンにD9Mit2とD20Mgh3での増幅の際出現するバンドに便宜的に付したナンバーが示してある。左から2レーンずつ(対照と8mg/kg)のD9Mit2の1番のバンド、2番のバンド、3番のバンド、次いで1レーンずつ4番と5番のバンドの増幅結果が示してある。本図に示した8mg/kgの事例では5番のバンドが検出されなかったため、対照の位置と比較してそのバンドが存在するであろうと想定される部位を切り抜いて2nd PCR増幅をかけた。さらにD20Mgh3については6番のバンドについて2レーン、7番について1レーンが割り当てられている。D9Mit2では1番からの2nd PCRでは2~5番のバンドも増幅された。2番については2番のバンドが濃くなったほか、1番についても増幅された。3番については3番の増幅が悪かったほか1番も薄く、それより低分子領域で複数のバンドが増幅された。4番については2番と同じような傾向があり4番がより多く増幅さ、1番も少ないが増幅された。5番については5番1番ともに増幅が悪く、必ずしも増幅されたと確認できるわけではないが、経験的には薄いバンドが存在していると解釈して良いようである。D20Mgh3についてもD9Mit2と同様な傾向が確認された。

全体として、高分子領域に出現するバンドの場合、それを基準にして 2nd PCR を実施すると明瞭な増幅パターンが得られにくい傾向があった。何らかの理由でメジャーバンドと移動度の異なるバンドが生じ、そのバンドを元に再増幅するとそのバンドがより強く増幅される場合があることも判明した。使っているプライマーは同じであり、かつそのような場合にはメジャーバンドも増幅されてくるので、実際のシーケンスには差がない可能性もある。おそらく何らかの高次構造が変化するのであろうが、詳細に関してはそれぞれの増幅産物についてシーケンス分析を行わないと結論が出ないと考えられる。

図3で消えたバンドと表現したバンドについて、仮に真の変異で分子量が異なるバンドが存在していたのだとすると、そのバンド自体はもっと多量に増幅されるはずであると考えられる。配列分析などにより、異なったバンドであることが確認された場合でも、その増幅される鋳型になったサンプル DNA 上の配列が、本来増幅されるべき配列の位置に存在していることを更に確認する必要が生じる。

(6) D9Mit2 と D20Mgh2 による脱塩処理後の PCR

上述の分析に基づいて、昨年度の成績に関して再度検討するとすれば、脱塩処理を施して PCR を行い、それぞれの増幅結果を対照群と比較することが必要であると判断された。DNA サンプルの量が少ないことから、マイクロダイアライザーシステム（日本ジェネティクス社）を用いて脱塩処理を行った。その後の電気泳動の結果を図5に示す。

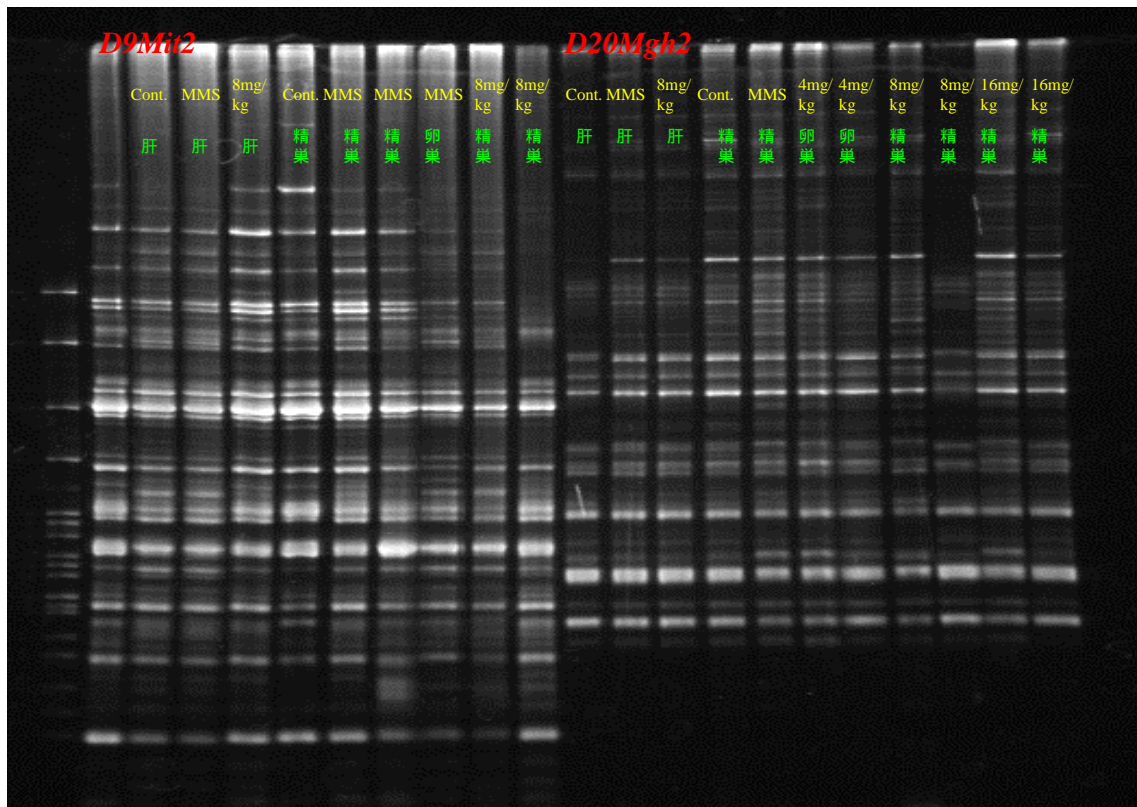


図5. 透析後の泳動結果。前回変異である可能性があると判定したパターンを、透析後のパターンを で示す。

この結果、昨年異常がある(「変異」とされた PCR 増幅産物の電気泳動パターンは、いずれも対照群で見られるパターンと同じパターンであることが確認された。生殖腺サンプルでの増幅産物の電気泳動パターンは肝臓での結果と変わらなかった。

最終的に昨年度検出された可能性があるとした「変異」は実際には存在しないことが確認された。今年度、新たにサンプリングしたサンプルについては、昨年度「変異」が検出されたマイクロサテライトマーカーについてまず、「変異」の有無についてスクリーニングすることが必要であると考えられた。

(7) D9Mit2、D20Mgh2、D2Mgh2、D5Mgh4、D6Mgh6、D17Mgh3、D7Mgh7 と D11Mgh3 による今年度採取したサンプルでの PCR 増幅パターンの分析

以下 16 組の電気泳動像を示す。1 組に 4 枚の電気泳動結果が含まれているが、それらの配列は表 3 に示してある。また、表 4 に各実験群での動物の内訳が示してある。

なお、レーンに×が付してある部分があるが、この部分はサンプルのアプライが無かったことを意味している。今年度のサンプルについては、昨年度の抽出が死亡動物からのものや、生後 1 日から 6 日程度の幼弱で臓器の計量なものからサンプリングしたために、アーティファクトとして実際より高い DNA 含量が誤って得られたなどの経験から、10 日齢以上の動物のみからサンプリングすることにした。

表 3. 電気泳動のレーンにアプライした動物番号
左から

レーン番号	1	レーン番号	2	レーン番号	3	レーン番号	4
	マーカー		マーカー		マーカー		マーカー
1	20F	25	C0529M	49	T0323M	73	12M
2	70F	26	C102M	50	T0324M	74	M102M
3	00F	27	C103M	51	T102M	75	M103M
4	33F	28	C104M	52	T103M	76	M104M
5	02M	29	C105M	53	T104M	77	M105M
6	03M	30	C106M	54	T105M	78	M106M
7	01M	31	C107M	55	T106M	79	M107M
8	12M	32	C108M	56	T306M	80	M108M
9	C0207M	33	13F	57	T307M	81	M109M
10	C0208M	34	23F	58	T308M	82	M201M
11	C0209M	35	35F	59	T309M	83	M202M
12	C0210M	36	34F	60	T401M	84	M203M
13	C0211M	37	31F	61	T402M	85	M204M
14	C0212M	38	05M	62	T403M	86	M205M
15	C0213M	39	11M	63	T404M	87	M206M
16	C0314M	40	14M	64	T405M	88	M301M
17	C0315M	41	T0102M	65	T406M	89	M302M
18	C0316M	42	T0104M	66	T407M	90	M303M
19	C0317M	43	T0105M	67	T408M	91	M304M
20	C0318M	44	T0106M	68	37F	92	M305M
21	C0330M	45	T0107M	69	30F		
22	C0526M	46	T0320M	70	32F		
23	C0527M	47	T0321M	71	13M		
24	C0528M	48	T0322M	72	15M		

表4. 各実験群での動物の内訳

	対照群				TBT投与群					MMS 投与群					
	親	20F	70F	00F	33F	13F	23F	35F	34F	31F	37F	30F	32F		
		02M	03M	01M	12M	05M	05M	11M	11M	14M	13M	15M	12M		
子供(10日齢)	C0207M	C0314M	C0526M	C102M	T0102M	T0320M	T102M	T306M	T401M	M102M	M201M	M301M			
	C0208M	C0315M	C0527M	C103M	T0104M	T0321M	T103M	T307M	T402M	M103M	M202M	M302M			
	C0209M	C0316M	C0528M	C104M	T0105M	T0322M	T104M	T308M	T403M	M104M	M203M	M303M			
	C0210M	C0317M	C0529M	C105M	T0106M	T0323M	T105M	T309M	T404M	M105M	M204M	M304M			
	C0211M	C0318M		C106M	T0107M	T0324M	T106M		T405M	M106M	M205M	M305M			
	C0212M	C0330M		C107M					T406M	M107M	M206M				
	C0213M			C108M					T407M	M108M					
				合計					T408M	合計	M109M	合計			
	7	6	4	7	24	5	5	5	4	8	27	8	6	5	19