

481.3
94 44

はしがき

21世紀を迎えた今、「環境」との調和をはかりながら、この新世紀を豊かな世界にしようと叫ばれている。しかしながら、化学工業の発達した現在、我々の周囲にはダイオキシンを始めとした内分泌攪乱化学物質が蔓延している。欧米の研究者からは、生殖器における腫瘍の増加、ワニの生殖器異常、ヒトの精子数の減少、鳥類における卵殻の脆弱化が報告されており、これらの異常が内分泌攪乱化学物質によるものであることが指摘されている。しかしながら、日本を始めとして世界中で、内分泌攪乱化学物質の具体的な影響を示す証拠の蓄積は少なく、正確な内分泌攪乱化学物質に対する生物試験法（バイオアッセイ法）すら確立されていないのが現状である。

したがって、本研究では、家禽における内分泌攪乱化学物質に対する感受性を明らかにするとともに、骨髓骨を用いた内分泌攪乱化学物質のバイオアッセイ法の確立を試みた。

研究組織

研究代表者：杉山稔恵（新潟大学自然科学系・助手）

研究分担者：楠原征治（新潟大学自然科学系・教授）

西村宏一（(独)農業・生物系特定産業技術研究機構畜産草地研究所・主任研究員）

研究経費

平成 15 年度 1,600 千円

平成 16 年度 900

平成 17 年度 1,100

計 3,600 千円

研究発表

【学会誌等】

杉山稔恵・楠原征治 (2004) 鳥類の産卵と骨組織. THE BONE, 18: 53(457)-58(462).

杉山稔恵 (2005) 鳥類カルシウム代謝における骨髓骨の形成と吸収. 日本家禽学会誌, 42: 197-208.

T. Imamura, T. Sugiyama and S. Kusuhara (2006) Expression and localization of estrogen receptors α and β mRNA in medullary bone of laying hens. Animal Science Journal, 77: 223-229.

【口頭発表】

2003年

前美沙紀・杉山稔恵・楠原征治. ニワトリ卵管におけるダイオキシン受容体の発現と局在. 北信越畜産学会第59回大会, 富山県.

2004年

杉山稔恵・西村宏一. 鳥類におけるエストロゲン様内分泌攪乱化学物質の骨髓骨に及ぼす影響. 日本畜産学会第103回大会, 東京農工大学.

今村友彦・杉山稔恵・楠原征治. ウズラ骨髓骨の形成過程におけるエストロゲン受容体 α および β の発現. 日本畜産学会第103回大会, 東京農工大学.

杉山稔恵・楠原征治. 鳥類の産卵と骨のバイオサイエンス. 第9回生命科学シンポジウム, 東京農工大学.

杉山稔恵. 産卵鶏骨髓骨における骨吸収と骨形成に関する研究. 日本家禽学会2004年度秋季大会, 広島大学.

2005年

坂本尚樹・杉山稔恵・楠原征治. ウズラ骨髓骨を用いた環境ホルモンバイオアッセイ法の検討. 第44回北信越畜産学会大会, 福井県.

坂本尚樹・杉山稔恵・西村宏一・楠原征治. 内分泌攪乱化学物質DDEがウズラ骨髓骨形成に及ぼす影響. 日本畜産学会第104回大会, 東京大学.

T. Sugiyama, N. Sakamoto, K. Nishimura and S. Kusuhara. Effects of endocrine disruptors on avian medullary bone formation. 2nd Joint Meeting of ECTS and IBMS, Geneva.

2006年

今村友彦・杉山稔恵・楠原征治. 雄ウズラにおける選択的エストロゲン受容体アゴニストによる骨髓骨の形成. 日本畜産学会第106回大会, 九州大学.

ニワトリにおけるダイオキシン受容体の成長過程に伴う発現

【要約】

ダイオキシン類は、ダイオキシン受容体 (AhR) を介してその機能が発現することが知られている。近年、野生動物およびヒトにおいて、生殖機能異常、生殖行動異常、雄の雌性化、孵化能力の低下といった現象が数多く報告されている。その原因として、生物の生息環境中に存在する p, p'-ジクロロジフェニールクロロエタン、ポリ塩化ビフェニール類、TBT およびダイオキシン類等の内分泌攪乱化学物質の影響が指摘されている。最近、ニワトリを始めとした家禽において、ダイオキシン類が体内脂肪に蓄積されていることが報告され、野生のものだけではなく家禽においても内分泌攪乱化学物質が悪影響を及ぼすことが危惧されている。

本研究では、鳥類におけるダイオキシン類の影響を明らかにすることを目的とし、ニワトリ成長過程の筋胃、卵管卵殻腺部、骨髄、肺、腎臓、肝臓および心臓におけるダイオキシン受容体の発現を RT-PCR 法を用いて検討した。

生後 1 日齢では、筋胃、腎臓および肝臓に AhR mRNA の高い発現が認められたものの、肺では中等度、心臓では低い発現が観察されるのみであった。その後、30 日齢では、腎臓および肝臓が AhR mRNA の高い発現を示し、筋胃、卵管、肺および心臓で中等度、骨髄では低い発現が観察された。60 日齢および 90 日齢では、筋胃、卵管、肺、腎臓、肝臓および心臓に高い発現が認められ、骨髄では低い発現が観察された。120-390 日齢では、筋胃、卵管、骨髄、肺、腎臓、肝臓および心臓の全ての臓器において AhR mRNA の高い発現が観察された。

以上の結果から、ニワトリ雌において、ダイオキシン類に対する感受性が成長過程に伴って変化することが示唆された。また、これまで、胎生期におけるダイオキシン類の影響が指摘されているものの、孵卵後および成熟後においてもダイオキシン類に対する高い感受性が存在し、ダイオキシン類によってニワトリの内分泌機能が攪乱されている可能性が示唆された。

【研究の背景と目的】

近年、魚類、爬虫類、鳥類といった野生生物およびヒトにおいて、生殖機能異常、生殖行動異常、雄の雌性化、孵化能力の低下のほか、免疫系や神経系への悪影響が数多く報告されている¹⁾。その原因として、生物の生息環境中に存在する p, p'-ジクロロジフェニールトリクロロエタン^{2,3)}、ポリ塩化ビフェニール類^{4,5)}、TBT⁶⁾およびダイオキシン類等⁷⁾の内分泌攪乱化学物質への暴露が指摘されている。とりわけ、ダイオキシン類は、生活および産業廃棄物の焼却によって容易に生成されて地球上のいたるところに存在し、生物に悪影響を及ぼしていると考えられている。

内分泌攪乱化学物質はホルモンと同様に受容体を介してその機能が発現することが知られており、ステロイドホルモン受容体であるエストロゲン受容体 (ER)、アンドロゲン受容体 (AR) およびダイオキシン受容体 (AhR) が内分泌攪乱化学物質受容体として示唆されている。殺虫剤である p, p'-ジクロロジフェニールトリクロロエタン^{2,3)}およびフェナリモル⁸⁾は、エストロゲン受容体と結合し、アゴニストとして作用する。このことは、性成熟過程において、適切な時期にエストロゲンがさやうしなければならぬにもかかわらず、内分泌攪乱化学物質がエストロゲンによって制御される正常な内分泌機能を攪乱して悪影響を及ぼすことを示唆している。一方、殺虫剤であるフェニトロチオン⁹⁾、プラスチック可塑剤であるフタル酸ジエチル¹⁰⁾および除草剤であるリニュロン^{11,12)}は、アンドロゲン受容体と結合してアンタゴニストとしての作用を示し、正常なアンドロゲンの作用を阻

害する。また、ダイオキシン受容体は、ダイオキシン類と結合してエストロジェンの作用を阻害すると考えられている^{13,14}。エストロジェン受容体とアンドロジェン受容体は、そのリガンドが生体内に存在し、性成熟に重要な役割を果たしていることから数多くの研究がなされているものの、ダイオキシン受容体は、そのリガンドが生体内に存在しないオルファン受容体であり、その発現と役割は未だ不明な点が多い。

多くの野生鳥類は食物連鎖の中で上位に位置し、魚類および小形動物を捕食しているため、内分泌攪乱化学物質が体内に濃縮して悪影響を及ぼし、卵殻の薄化、雌化、生殖障害、甲状腺腫と甲状腺の異常をもたらすものと考えられている¹⁵。また最近では、ニワトリを始めとした家禽において、ダイオキシン類が体内に蓄積していることが報告され¹⁶、野生のものだけではなく家禽における内分泌攪乱化学物質の影響が危惧されている。

したがって、本研究では、鳥類におけるダイオキシン類の影響を明らかにすることを目的とし、ニワトリ成長過程の各組織におけるダイオキシン受容体の発現を検討した。

【材料と方法】

1. 供試動物

1、30、60、90、120、180、210、330、360、390日齢の白色レグホーン種雌を材料として使用し、各ニワトリより筋胃、卵管卵殻腺部、肝臓、肺、腎臓、心臓、大腿骨骨髓の各組織を採取した。その後、材料は液体窒素により急速凍結させ、実験に供するまで-80℃にて保存した。

2. 総RNAの抽出

凍結保存したサンプルを、予め液体窒素で冷やしておいた乳鉢の中に入れ、途中RNAが分解しないように液体窒素を流し込みながら5-10分間かけて破碎し、25-50 mgを1.5 mlチューブに採取した。そこにISOGEN（日本ジーン）を0.5 ml加え、材料とISOGENが均等に混ざり合うまでシリンジを用いて攪拌し、5分間室温に静置した。その後、この懸濁液に-20℃のクロロホルムを0.1 ml加えて攪拌し、2-3分間室温に静置させ、4℃、1400 rpmで15分間遠心分離を行った。分離した水相、中間相、有機相のうち水相にRNAは含まれているので、水相のみを150-200 µlチューブに移し、それに-20℃のイソプロパノールを0.25 ml加えて5-10分間室温に静置した。その後、4℃、14000 rpmで10分間遠心分離を行い、RNAを沈殿させた。上清のみを除去した後、75%エタノールを0.5 ml加え、十分にRNAを洗浄し、4℃、1000 rpmで遠心分離を行い、RNAを沈殿させた。その後、エタノールを除去し、15-20分間風乾してエタノールを完全に除去し、DEPC処理蒸留水にてRNAを溶解した。また、分光光度計 Ultraspec2000UV（ファルマシア）を用いて、この溶液のRNA濃度を測定した。

3. プライマーの設計

PCRに用いるプライマーは、ニワトリにおいてクローニングされているAhR遺伝子のcDNAの塩基配列をもとに、それぞれ異なるエクソンを由来とする上流配列特異的プライマー 5'-ATGCAGATCCTGGAAGGAGA-3' および下流配列特異的プライマー 5'-CCCAGTGTAGCTGACGTTGA-3'をソフトウェア Primer 3を用いて作製した。

4. 逆転写反応 (RT)

総RNAの1 mgに対し、最終濃度 50 mMのTris-HCl (pH 8.3)、3 mM MgCl₂、75 mM KCl、10 mM DDT、0.5 mM dNTPs、10U RNase阻害剤、50 pmol ランダムプライマー、20U M-MLV 逆転写酵素を加えて混合し、DEPC処理水にて計10 µlになるよう調整した。サーマルサイクラー Gene Amp PCR System 2400-R（パーキンソンエルマー）を用いて、

まず、ランダムプライマーを鋳型 RNA に十分結合させるための前処理として 30°C で 10 分間、次に逆転写反応によって cDNA を合成するために 42°C で 20 分間、そして 99°C で 5 分間置いて DNA-RNA の二本鎖を熱変性によって一本鎖とする一方、M-MLV 逆転写酵素に含まれる RNA 分解酵素で余分な鋳型 RNA を分解して、cDNA 溶液を得た。

5. ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)

RT によって得られた cDNA 溶液 10 μ l に対し、最終濃度 10 mM Tris-HCl (pH 8.3)、25 mM MgCl₂、50 mM KCl、2.5 U の rTaq DNA ポリメラーゼ、上流配列特異的プライマーおよび下流配列特異的プライマーを各 20 pmol 加えて混合し、DEPC 処理水を加えて計 50 μ l となるように調整した。サーマルサイクラー Gene Amp PCR System 2400-R を用いて、一本鎖の鋳型 cDNA を得るための熱変性を 95°C で 30 秒間、配列特異的プライマーを鋳型 DNA に結合させるために 65°C で 60 秒間、ポリメラーゼによる DNA 合成基質の伸長反応を 72°C で 90 秒間、以上を 1 サイクルとして 35 サイクルの PCR を行った。得られた PCR 産物は、エチジウムブロマイドを 15 ml 入れた 2.0 % アガロースゲルにて電気泳動を行った。このゲルに紫外線を照射して、特異的な DNA 断片の存在を確認して写真撮影を行った。また、DNA サイズマーカーとして、50 bp DNA ラダー (インビトロジェン) を用いた。

【結果】

1 日齢から 390 日齢のニワトリ雌より、筋胃、卵管、骨髄、腎臓、肝臓および心臓を採取し、RT-PCR 法にて AhR の mRNA の発現を検討したところ、202 bp の目的とするサイズの PCR 産物が検出され、ニワトリにおける AhR mRNA の発現が確認された (図 1)。しかしながら、その発現は日齢および各臓器で異なっていた。すなわち、1 日齢では、筋胃、腎臓および肝臓に高い発現が認められ、肺では中等度、心臓では低い発現が観察されるのみであった。30 日齢では、腎臓および肝臓に高い発現が認められ、筋胃、卵管、肺および心臓で中等度、骨髄では低い発現が観察されるのみであった。60 日齢では、筋胃、卵管、肺、腎臓、肝臓および心臓に高い発現が認められ、骨髄では低い発現が観察された。120-390 日齢では、筋胃、卵管、骨髄、肺、腎臓、肝臓および心臓の全ての臓器において AhR mRNA の高い発現が観察された。

【考察】

これまで、ヒト、モルモット、ラット、マウス、ニワトリおよびニジマスなどで AhR cDNA がクローニングされている¹⁶⁻¹⁹。AhR はダイオキシン類をリガンドとする転写因子であり、ダイオキシン類と結合した AhR が標的ゲノム DNA のプロモーターであるダイオキシン反応領域に結合して mRNA の転写を促進することが明らかにされている^{13,14}。この mRNA 由来のタンパク質は未だ明らかにされていないものの、エストロジェン受容体のゲノム DNA への結合の抑制、あるいはエストロジェンによって誘導される mRNA の転写を阻害し、アンタゴニストとして作用している^{13,14}。

ダイオキシンに対する感受性は、生物種に加え系統によっても異なることが知られている。実際、AhR を介したダイオキシン類の感受性 LD₅₀ は、モルモットで 0.6 mg/kg、ハムスターで 500 mg/kg を示し、モルモットがハムスターの約 800 倍近い感受性を有している¹⁹。また、ニワトリにおいては、LD₅₀ 25-50 mg/kg を示し高い感受性を有していることが知られている^{9,20}。ダイオキシン類に対する感受性は、各臓器もしくは細胞に発現している発現している AhR 数とダイオキシン類との親和性に依存することが示されており、最近、

RT-PCR法の開発により、各臓器に発現しているAhR mRNA量から、ダイオキシン類に対する感受性を明らかにしようとする試みがなされている。その結果、AhR mRNAの発現がAhRタンパク質の発現を示し、ダイオキシン類に対する感受性を反映していることが明らかにされている²¹⁾。本研究においても、RT-PCR法によりAhR mRNAの発現が示され、ニワトリにおいてダイオキシン類の影響を受ける可能性があることが明らかになった。

各臓器におけるAhRの発現は、ラットについて調べられており、肺、胸腺、腎臓、肝臓、筋肉の順でAhR mRNAの発現は高く、副腎および膵臓では発現が認められないことが報告されている^{22,23)}。本研究では、胸腺、副腎および膵臓については調べられていないものの、120-390日齢の各臓器いずれにおいてもAhR mRNAの高い発現を示した。これらは、ラットに類似して各臓器にAhR mRNAが発現しているものの、各臓器におけるダイオキシン類に対する感受性が種によって異なることを示している。しかしながら、本研究において、卵管、骨髄、肺および心臓において、AhR mRNAの発現は日齢で変化した。すなわち、肺および心臓では1-30日齢でその発現は低いもしくは中等度でしか観察されなかったにも関わらず、60日齢では高い発現を示した。卵管および骨髄では、1日齢では発現は観察されなかったものの、30日齢でAhR mRNAの発現が中等度および低く推移し、60日齢および120日齢以降でそれぞれ高い発現を示した。これまで、ダイオキシン類は胎生期に作用して内分泌機能を攪乱しているものと考えられてきており、研究の多くが胎生期に限定したものである²⁴⁻²⁶⁾。本研究では、胎生期におけるAhR mRNAの発現について検討しなかったものの、120日齢以降の成熟したニワトリのいずれの臓器において、AhR mRNAの高い発現が確認された。このことは、胚発生期のみならず成熟したニワトリにおいてもダイオキシン類に対する高い感受性が存在し、ダイオキシン類による内分泌攪乱が起こっているものと推測される。

鳥類におけるダイオキシン類の作用は、ダイオキシン類の暴露を受けたそのF1において卵管卵殻腺部におけるエストロゲン受容体およびプロジェステロン受容体の発現が減少することが知られている²⁷⁾。また、血中のエストロゲンおよびテストステロン濃度が低い傾向を示すとされている²⁷⁾。現在、野生鳥類のワシ、タカ、ハヤブサおよびカモメなどにおいて卵殻の薄化による胚発生の異常がアメリカおよびヨーロッパで報告されている²⁸⁾。卵殻は卵管卵殻腺部で形成され、そのカルシウムの沈着は産卵周期に伴った血中エストロゲン濃度に依存したカルシウム結合タンパク質の発現によって促進されている^{28,29)}。また、卵殻カルシウムの多くは、血中エストロゲン濃度の上昇に依存して骨髄中に形成される骨髄骨から供給される³⁰⁾。このことから考えると、鳥類における卵殻の薄化はダイオキシン類等の内分泌攪乱化学物質の影響によって卵管卵殻腺部および骨髄骨の異状によって引き起こされたことが推測される。

以上の結果から、ニワトリにおいて、ダイオキシン類の作用に不可欠なAhRが、筋胃、卵管、骨髄、肺、腎臓、肝臓および心臓で発現しており、ダイオキシン類の影響を受ける可能性が明らかとなった。しかしながら、卵管、骨髄、肺および心臓などでは成熟とともにAhR mRNAの発現が増加した。このことは、ダイオキシン類に対する感受性が日齢によって変化することを示しており、これまで推測されてきている胚時期におけるダイオキシン類の悪影響に加えて、孵卵後および成熟後においてもダイオキシン類が内分泌を攪乱していることが確認された。

【引用文献】

1. Vos JG, Dybing E, Greim HA, Ladefoged O, Lambre C, Tarazona JV, Brandt I, Vethaak AD (2000) Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Crit Rev Toxicol* 30:71-133.
2. Lascombe I, Beffa D, Ruegg U, Tarradellas J, Wahli W (2000) Estrogenic activity assessment of environmental chemicals using in vitro assays: identification of two new estrogenic compounds. *Environ Health Perspect* 108:621-629.
3. Kupfer, D (1980) Estrogenic properties of DDT and its analogs. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 14: 358-367.
4. Korach KS, Sarver P, Chae K, McLachlan JA, McKinney JD (1988) Estrogen receptor-binding activity of polychlorinated hydroxybiphenyls: conformationally restricted structural probes. *Mol Pharmacol* 33:120-126.
5. Zoeller RT, Dowling AL, Vas AA (2000) Developmental exposure to polychlorinated biphenyls exerts thyroid hormone-like effects on the expression of RC3/neurogranin and myelin basic protein messenger ribonucleic acids in the developing rat brain. *Endocrinology* 141:181-189.
6. Horiguchi T, Takiguchi N, Cho HS, Kojima M, Kaya M, Shiraishi H, Morita M, Hirose H, Shimizu M (2000) Ovo-testis and disturbed reproductive cycle in the giant abalone, *Haliotis madaka*: possible linkage with organotin contamination in a site of population decline. *Mar Environ Res* 50:223-229.
7. Krishnan AV, Stathis P, Permuth SF, Tokes L, Feldman D (1993) Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 132:2279-2286.
8. Vinggaard AM, Breinholt V, Larsen JC (1999) Screening of selected pesticides for oestrogen receptor activation in vitro. *Food Addit Contam* 16:533-542.
9. Tamura H, Maness SC, Reischmann K, Dorman DC, Gray LE, Gaido KW (2001) Androgen receptor antagonism by the organophosphate insecticide fenitrothion. *Toxicol Sci* 60:56-62.
10. Harris CA, Henttu P, Parker MG, Sumpter JP (1997) The estrogenic activity of phthalate esters in vitro. *Environ Health Perspect* 105:802-811.
11. Waller CL, Juma BW, Gray LE, Jr., Kelce WR (1996) Three-dimensional quantitative structure-activity relationships for androgen receptor ligands. *Toxicol Appl Pharmacol* 137:219-227.
12. Lambright C, Ostby J, Bobseine K, Wilson V, Hotchkiss AK, Mann PC, Gray LE, Jr. (2000) Cellular and molecular mechanisms of action of linuron: an antiandrogenic herbicide that produces reproductive malformations in male rats. *Toxicol Sci* 56:389-399.
13. Safe S, Astroff B, Harris M, Zacharewski T, Dickerson R, Romkes M, Biegel L (1991) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds as antioestrogens: characterization and mechanism of action. *Pharmacol Toxicol* 69:400-409.
14. Safe S, Wang F, Porter W, Duan R, McDougal A (1998) Ah receptor agonists as

- endocrine disruptors: antiestrogenic activity and mechanisms. *Toxicol Lett* 102-103:343-347.
15. 西村宏一, 宮本 進, 武田隆夫, 安藤幹男 (2001) 産卵鶏の体組織および卵におけるダイオキシン類の濃度. *日本家禽学会誌* 38:12.
 16. Hahn ME (1998) The aryl hydrocarbon receptor: a comparative perspective. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 121:23-53.
 17. Karchner SI, Kennedy SW, Trudeau S, Hahn ME (2000) Towards molecular understanding of species differences in dioxin sensitivity: initial characterization of Ah receptor cDNAs in birds and an amphibian. *Mar Environ Res* 50:51-56.
 18. Walker MK, Heid SE, Smith SM, Swanson HI (2000) Molecular characterization and developmental expression of the aryl hydrocarbon receptor from the chick embryo. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 126:305-319.
 19. Sawyer T, Jones D, Rosanoff K, Mason G, Piskorska-Pliszczynska J, Safe S (1986) The biologic and toxic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in chickens. *Toxicology* 39:197-206.
 20. Sanderson JT, Bellward GD (1995) Hepatic microsomal ethoxyresorufin O-deethylase-inducing potency in ovo and cytosolic Ah receptor binding affinity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: comparison of four avian species. *Toxicol Appl Pharmacol* 132:131-145.
 21. Abbott BD, Held GA, Wood CR, Buckalew AR, Brown JG, Schmid J (1999) AhR, ARNT, and CYP1A1 mRNA quantitation in cultured human embryonic palates exposed to TCDD and comparison with mouse palate in vivo and in culture. *Toxicol Sci* 47:62-75.
 22. Carlstedt-Duke JMB (1979) Tissue distribution of the receptor for 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the rat. *Cancer Research* 39:3172-3176.
 23. Carver LA, Hogenesch JB, Bradfield CA (1994) Tissue specific expression of the rat Ah-receptor and ARNT mRNAs. *Nucleic Acids Research* 22:3038-3044.
 24. Brunstrom B, Reutergardh L (1986) Differences in sensitivity of some avian species to the embryotoxicity of a PCB, 3, 3', 4, 4'-tetrachlorobiphenyl, injected into the eggs. *Environmental Pollution (Series A)* 42:37-45.
 25. Walker MK, Pollenz RS, Smith SM (1997) Expression of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) and AhR nuclear translocator during chick cardiogenesis is consistent with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced heart defects. *Toxicol Appl Pharmacol* 143:407-419.
 26. Abbott BD, Schmid JE, Brown JG, Wood CR, White RD, Buckalew AR, Held GA (1999) RT-PCR quantification of AHR, ARNT, GR, and CYP1A1 mRNA in craniofacial tissues of embryonic mice exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and hydrocortisone. *Toxicol Sci* 47:76-85.
 27. Alonso KR, Peden-Adams MM, Liu JY, Charbonneau C, Henshel D, Dickerson RL (1998) Effects of in ovo exposure to 2,3,7,8-TCDD on F1 generation adult chickens (*Gallus gallus*). *Chemosphere* 37:1873-1883.

28. Corradino RA (1993) Calbindin D28K regulation in precociously matured chick egg shell gland in vitro. *Gen Comp Endocrinol* 91:158-166.
29. Corradino RA, Smith CA, Krook LP, Fullmer CS (1993) Tissue-specific regulation of shell gland calbindin D28K biosynthesis by estradiol in precociously matured, vitamin D-depleted chicks. *Endocrinology* 132:193-198.
30. Sugiyama T, Kusuhara S (2001) Avian calcium metabolism and bone function. *Asian-Austral J Anim Sci* 14:82-90.



図 1. RT-PCR法によるダイオキシン受容体の発現

ニワトリ卵管におけるダイオキシン受容体の
発現と局在に関する研究

【要約】

内分泌攪乱化学物質は、各組織に存在するエストロゲン受容体、アンドロゲン受容体もしくはダイオキシン受容体 (AhR) を介して体内にホルモンと類似した働きを発現させると考えられている。それらは、生殖機能と行動の異常、雄の雌性化、孵化能力の低下、発癌の促進、催奇形性、上皮細胞異形性、免疫系や神経系への悪影響を引き起こすことが示唆されている。近年、野生鳥類において内分泌攪乱化学物質による卵殻の脆弱化が指摘されており、ニワトリを始めとした家禽ではダイオキシン類が餌を通じて体内の脂肪に蓄積していることが報告されている。したがって、本研究では鳥類における内分泌攪乱化学物質の作用を明らかにすることを目的とし、産卵鶏卵管におけるダイオキシン受容体の発現と局在の検出を試みた。

250-350 日齢の産卵鶏から、卵管卵白分泌部、峽部、卵殻腺部をそれぞれ採取した。各部からタンパク質を抽出し、一次抗体にヤギ抗ヒト AhR IgG ポリクローナル抗体を用いウェスタンブロットを行った。また、免疫組織化学法では、卵管各部を固定後、5 μm のパラフィン切片を作製し、一次抗体にヤギ抗ヒト AhR IgG ポリクローナル抗体を用い、ABC 法にて AhR の局在を検討した。

ウェスタンブロット法では、全ての卵管で分子量約 95 kDa を示す単一なバンドが検出された。また、免疫組織化学法では、卵管卵白分泌部、峽部および卵殻腺部のいずれにおいても粘膜上皮細胞細胞質の内腔側に AhR の局在を示す茶褐色の反応が観察された。とりわけ、卵管峽部で強い局在が観察みられ、卵殻腺部では管状腺細胞でも AhR の局在が観察された。

以上の結果より、産卵鶏卵管において AhR が発現しており、産卵鶏卵管はダイオキシン類の影響を受けることが考えられた。また、AhR の局在は卵管峽部上皮細胞、卵殻腺部上皮細胞および管状腺細胞に観察されたことから、卵殻形成に関わるデルマタン硫酸、炭酸イオンもしくはカルシウムイオンの分泌異常により、卵殻の脆弱化が起こることが推測される。

【研究の背景と目的】

現在、我々の周囲には内分泌攪乱化学物質が蔓延している。内分泌攪乱化学物質は、各組織に存在するエストロゲン受容体 (ER)、アンドロゲン受容体 (AR) あるいはダイオキシン受容体 (AhR) といったホルモン受容体を介して、生体の恒常性を司るホルモンと類似した働きを発現させると考えられている¹⁾。その結果、生殖機能と行動の異常、雄の雌性化、孵化能力の低下、発癌の促進、催奇形性、上皮細胞異形性、免疫系や神経系への悪影響を引き起こすことが示唆されている²⁾。ダイオキシン類は農薬合成時の不純物として、あるいは生活および産業廃棄物の焼却によって容易に生成されるため、地球上の至るところに存在する。その中で最も毒性の高い 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-P-dioxin (TCDD) は、AhR を介して標的細胞に作用するという³⁾。AhR はマウス、ラットなどの肝臓を始め

としたあらゆる組織で見出されており、細胞内に入ったダイオキシン類は、AhR と結合して核内に運ばれ、もうひとつの転写因子である ARNT と共に複合体を形成し、遺伝子の調節領域に存在する Xenobiotic Responsive Element (XRE ; 生体異物応答配列) と呼ばれる塩基配列に結合して遺伝子の発現を調節する^{4,5)}。

近年、野生鳥類において内分泌攪乱化学物質による卵殻の脆弱化が指摘されている²⁾。多くの野生鳥類は食物連鎖の上位に位置し、魚類および小型動物を捕食しているため、内分泌攪乱化学物質が体内に濃縮して異状をもたらすものと考えられている。また、最近では、ニワトリを始めとした家禽においてダイオキシン類が餌を通じて体内の脂肪に蓄積していることが報告されている⁶⁾。しかしながら、ダイオキシン類を始めとした内分泌攪乱化学物質の鳥類への影響が危惧されているものの、それらの作用を示す証拠ならびに作用機序は明らかではない。

したがって、本研究では鳥類における内分泌攪乱化学物質の作用を明らかにすることを目的とし、産卵鶏卵管におけるダイオキシン受容体の発現と局在の検出を試みた。

【材料および方法】

1. 供試動物

250-350 日齢の産卵鶏白色レグホン種を供試動物とし、卵管卵白分泌部、峽部、卵殻腺部をそれぞれ採取した。

2. 方法

A ウェスタンブロッティング法

採取した卵管各部位は、液体窒素下で凍結して破碎し、CellLytic™MT (シグマ) を用いてタンパク質を抽出した。次にそれらの遠心分離を行い、上清の一部でタンパク質濃度を測定し (BCA Protein Assay ; ピアス)、残りをタンパク質濃度 15 µg/lane になるよう調整し、SDS-PAGE サンプル緩衝液に融解し、95°C で 5 分間加熱処理を施した。その後、調整したサンプルは 8% ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動をいった。タンパク質を Hybond-P 膜 (PVDF 膜 ; アマシャムバイオサイエンス) にセミドライ式のプロットング装置 (バイオラド) で 180 mA、40 分間転写し、その後、トリス緩衝液 (TBS) にて洗浄し、非特異的反応を阻止するためのブロッキングを 5% スキムミルクを含む TBS にて室温で 1 時間行った。洗浄後、一次抗体はヤギ抗ヒト AhR IgG ポリクローナル抗体 (サンタクルズ) (1:200 希釈) を用いた。その後、PVDF 膜を Tween-20-TBS (TTBS) にて洗浄し、二次抗体は抗体希釈溶液にて 2 mg/ml HRP 標識ロバ抗ヤギ抗体 (ペクター) (1:2500 希釈) とした二次抗体溶液に 1 時間反応させた。TTBS にて洗浄後、ECL Plus Western Blotting Detection System (アマシャムバイオサイエンス) を用いた化学発光を行い、ルミノイメージアナライザー LAS 3000 (フジフィルム) を用いて AhR 発現の検討を行った。

B 免疫組織化学

採取した卵管各部位は 10% ホルマリン緩衝液を用いて 48 時間浸漬固定し、5 µm のパラ

フィン切片を作製した。パラフィン切片はキシレンにて脱パラフィンを行い、エタノール上昇系列にて脱水した。つづいて内因性ペルオキシダーゼ除去のため、0.3% H₂O₂・メタノール溶液に室温で30分間反応させ、0.01 M リン酸緩衝食塩水 (PBS) にて20分間洗浄した。非特異的反応を除去するため、1%ウサギ血清アルブミンを含むPBSにて30分間反応させブロッキングを行った。その後、一次抗体に1%ウサギ血清アルブミンを含むPBSにて200倍希釈したヤギ抗ヒト AhR ポリクローナル抗体 (サンタクルズ) を用い、4℃で一晩反応させた。また、対照では一次抗体の代わりに正常ヤギ IgG 抗体 (サンタクルズ) を用いた。洗浄後、1%ウサギ血清アルブミン・PBS にて200倍希釈したビオチン化ウサギ抗ヤギ IgG ポリクローナル抗体 (ベクター) を二次抗体として用いて30分間反応させた。その後、ペルオキシダーゼ標識アビジン・ビオチン複合体 (ベクター) を30分間反応させ、0.01% H₂O₂ および 0.05% DAB を含む PBS にて1分間浸漬し、染色した。また、一部の切片はヘマトキシリンの対比染色を施した。

【結果】

1. ウェスタンブロット法による AhR 発現の検討

産卵鶏の卵管における AhR のタンパク質レベルでの発現をウェスタンブロット法により検出したところ、分子量約 95kDa を示す単一なバンドが卵白分泌部、峡部および卵殻腺部のいずれにおいても確認された。また、同時に陽性対照として用いたマウス肝臓においても単一なバンドが検出された (図1)。

2. 免疫組織化学法による AhR の局在の検討

上述したウェスタンブロット法により、AhR との特異的な結合が確認された抗体を用いて、免疫組織化学的に AhR の局在を検討した。その結果、卵白分泌部、峡部、卵殻腺部のいずれにおいても粘膜上皮細胞細胞質の内腔側に AhR の局在を示す茶褐色の反応が観察された。とりわけ、卵管峡部で強い局在がみられ、卵殻腺部では上皮細胞のほかに管状腺細胞も染色された。また、一次抗体の代わりに正常ヤギ血清を用いた対照実験では、いずれの卵管の部位においても AhR の局在は観察されなかった。

【考察】

産卵鶏では、排卵された卵が約 24 時間をかけて卵管内を通過し、卵白、卵殻膜ならびに卵殻の形成を経て放卵される⁷⁾。排卵された卵は、漏斗部で捕らえられ、その後、2-3 時間をかけて卵白分泌部にて卵白成分であるオボアルブミンなどの卵白が取り囲む。その後、卵は峡部に移動し、卵殻膜が 1-2 時間をかけて形成される。卵殻膜は、卵殻形成時の炭酸カルシウムのコアとなるコラーゲンやグリコサミノグリカンであるデルマタン硫酸を主として形成される^{8,9)}。これらのタンパク質の分泌は卵殻形成に重要な役割を果たしており、卵殻の硬さと卵殻に含まれるこれらのタンパク質濃度が高い相関を示すことが明らかとなっている¹⁰⁾。卵殻膜の形成された卵は、その後、卵殻腺部に移動し、20-26 時間をかけて炭

酸カルシウムから成る卵殻が沈着する。卵殻腺部上皮細胞ならびに結合組織に存在する管状腺細胞には、炭酸脱水素酵素が存在しており、水と二酸化炭素から炭酸イオンを形成して分泌する^{11, 12)}。また、管状腺細胞では、細胞質に存在するカルシウム結合タンパク質と遊離縁側の細胞膜に局在するCa²⁺-ATPaseによって、カルシウムイオンの能動的な分泌を行っている^{13, 14)}。その後、卵殻腺管腔内で炭酸イオンとカルシウムイオンがコラーゲン架橋の隙間にデルマトン硫酸を核として炭酸カルシウムを沈着する⁸⁾。

本研究において、AhRは全ての卵管各部位に発現が観察されたが、とりわけ、卵管峽部の上皮細胞においてAhRが強く発現していた。このことは、卵管峽部の上皮細胞においてダイオキシン類の影響を受けやすいことを示している。また、峽部における上皮細胞は、炭酸カルシウムの形成に深く関与するデルマトン硫酸の分泌が行われていることから⁸⁾、ダイオキシン類の直接作用によりその分泌に異常を来し、卵殻膜の形成が不完全となり、その後の炭酸カルシウムの沈着に影響を及ぼすものと推測される。また、卵殻腺部でも、同様に上皮細胞ならびに管状腺細胞に強いAhRの発現が観察された。このことは、上皮細胞および管状腺細胞における炭酸脱水素酵素の代謝に何らかの影響を及ぼし、炭酸イオンの分泌が攪乱し、卵殻の脆弱化をもたらすものと推測される。実際、雄ウズラにエストロゲン様内分泌攪乱化学物質DDTを投与すると、卵殻腺部における炭酸脱水素酵素が減少するとともに卵殻質が低下するという¹⁵⁾。同様に、鶏胚のエストロゲン様物質への暴露が卵管卵殻腺部における炭酸脱水素酵素の局在を変化させるとともに、発現を減少させると報告されている¹⁶⁻¹⁸⁾。

一方、エストロゲン様内分泌攪乱化学物質によって、ラット子宮カルシウム結合タンパク質の発現が増加することが報告されており、現在ではカルシウム結合タンパク質の発現が内分泌攪乱化学物質による汚染の新たな指標として用いられつつある¹⁹⁾。産卵鶏においては、カルシウム結合タンパク質は卵殻腺部管状腺細胞に局在し²⁰⁾、その発現は卵殻の硬さと深く関連していることが知られている²¹⁾。本研究において、卵殻腺部の管状腺細胞の細胞質にAhRの発現が観察された。したがって、ダイオキシン類の影響により卵殻腺部管状腺細胞のカルシウム結合タンパク質の発現が攪乱され、カルシウムイオン分泌の異常が起こり、卵殻の脆弱化を引き起こすものと考えられる。

以上の結果より、産卵鶏卵管においてAhRが発現しており、産卵鶏卵管はダイオキシン類の影響を受けることが考えられた。また、AhRの局在は卵管峽部上皮細胞、卵殻腺部上皮細胞および管状腺細胞に観察されたことから、卵殻形成に関わるデルマトン硫酸、炭酸イオンもしくはカルシウムイオンの分泌異常により、卵殻の脆弱化が起こることが推測される。

【引用文献】

1. Karchner SI, Kennedy SW, Trudeau S, Hahn ME (2000) Towards molecular understanding of species differences in dioxin sensitivity: initial characterization of Ah receptor cDNAs in birds and an amphibian. *Mar Environ Res* 50:51-56.
2. Vos JG, Dybing E, Greim HA, Ladefoged O, Lambre C, Tarazona JV, Brandt I, Vethaak AD (2000) Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Crit Rev Toxicol* 30:71-133.
3. Hahn ME (2002) Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem Biol Interact* 141:131-160.
4. Poland A, Glover E, Bradfield CA (1991) Characterization of polyclonal antibodies to the Ah receptor prepared by immunization with a synthetic peptide hapten. *Mol Pharmacol* 39:20-26.
5. Safe S (2001) Molecular biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis. *Toxicol Lett* 120:1-7.
6. 西村宏一, 宮本 進, 武田隆夫, 安藤幹男 (2001) 産卵鶏の体組織および卵におけるダイオキシン類の濃度. *日本家禽学会誌*, 第 38 巻秋季大会号: 21.
7. Arias JL, Fink DJ, Xiao SQ, Heuer AH, Caplan AI (1993) Biomineralization and eggshells: cell-mediated acellular compartments of mineralized extracellular matrix. *Int Rev Cytol* 145:217-250.
8. Fernandez MS, Moya A, Lopez L, Arias JL (2001) Secretion pattern, ultrastructural localization and function of extracellular matrix molecules involved in eggshell formation. *Matrix Biology* 19:793-803.
9. Wang X, Ford BC, Praul CA, Leach RM, Jr. (2002) Collagen X expression in oviduct tissue during the different stages of the egg laying cycle. *Poult Sci* 81:805-808.
10. Panheleux M, Nys Y, Williams J, Gautron J, Boldicke T, Hincke MT (2000) Extraction and quantification by ELISA of eggshell organic matrix proteins (ovocleidin-17, ovalbumin, ovotransferrin) in shell from young and old hens. *Poult Sci* 79:580-588.
11. Gay CV, Mueller WJ (1973) Cellular localization of carbonic anhydrase in avian tissues by labeled inhibitor autoradiography. *J Histochem Cytochem* 21:693-702.
12. Gay CV, Faleski EJ, Schraer H, Schraer R (1974) Localization of carbonic anhydrase in avian gastric mucosa, shell gland and bone by immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 22:819-825.

13. Wasserman RH, Smith CA, Smith CM, Brindak ME, Fullmer CS, Krook L, Penniston JT, Kumar R (1991) Immunohistochemical localization of a calcium pump and calbindin-D28k in the oviduct of the laying hen. *Histochemistry* 96:413-418.
14. Arai T, Sugiyama T, Kusuhara S (1996) Immunohistochemical studies of Ca²⁺-ATPase and carbonic anhydrase II in the shell gland of egg-laying hens. *Japanese Poultry Science*, 33: 371-376.
15. Chang ES, Stokstad EL (1975) Effect of chlorinated hydrocarbons on shell gland carbonic anhydrase and egg shell thickness in Japanese quail. *Poult Sci* 54:3-10.
16. Holm L, Berg C, Brunstrom B, Ridderstrale Y, Brandt I (2001) Disrupted carbonic anhydrase distribution in the avian shell gland following in ovo exposure to estrogen. *Arch Toxicol* 75:362-368.
17. Berg C, Holm L, Brandt II, Brunstrom B (2001) Anatomical and histological changes in the oviducts of Japanese quail, *Coturnix japonica*, after embryonic exposure to ethynylloestradiol. *Reproduction* 121:155-165.
18. Halldin K, Holm L, Ridderstrale Y, Brunstrom B (2003) Reproductive impairment in Japanese quail (*Coturnix japonica*) after in ovo exposure to o,p'-DDT. *Arch Toxicol* 77:116-122.
19. An BS, Choi KC, Kang SK, Hwang WS, Jeung EB (2003) Novel Calbindin-D(9k) protein as a useful biomarker for environmental estrogenic compounds in the uterus of immature rats. *Reprod Toxicol* 17:311-319.
20. Striem S, Bar A (1991) Modulation of quail intestinal and egg shell gland calbindin (Mr 28,000) gene expression by vitamin D₃, 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and egg laying. *Mol Cell Endocrinol* 75:169-177.
21. Bar A, Vax E, Striem S (1992) Relationships between calbindin (Mr 28,000) and calcium transport by the eggshell gland. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol* 101:845-848.

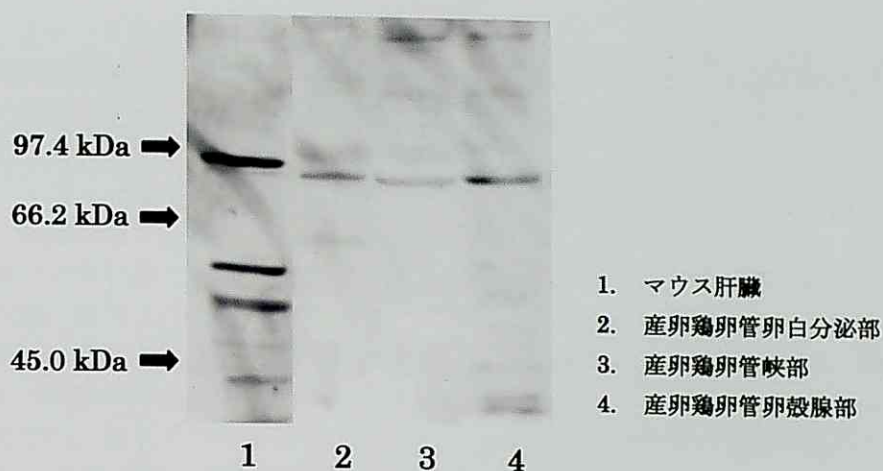


図1. ウェスタンブロット法による各卵管の AhR の発現

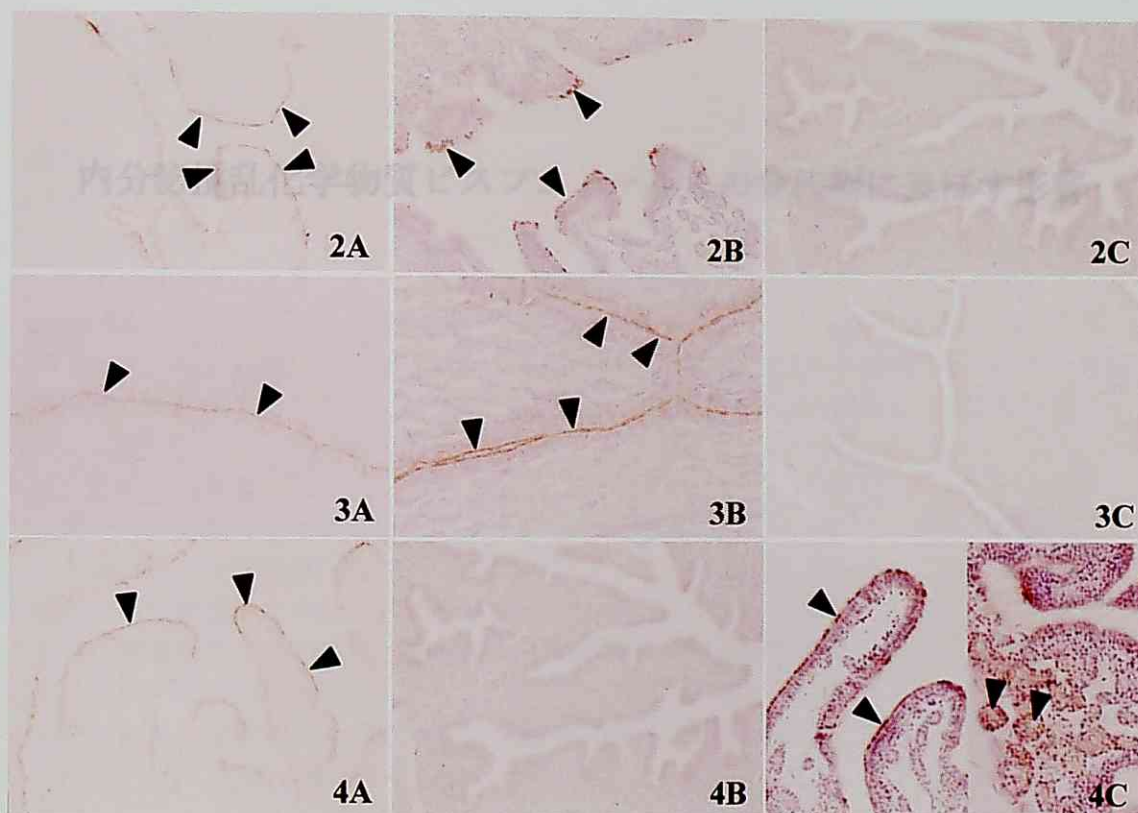


図2-4. ニワトリ卵管における AhR の局在 (×200). 図2: 卵白分泌部, 図3: 峽部, 図4: 卵殻腺部. A: AhR の局在, B: AhR の局在とヘマトキシリン染色, C: 対照.

卵管卵白分泌部, 峽部および卵殻腺部の粘膜上皮細胞細胞質に AhR の局在を示す茶褐色の発色 (矢頭) が確認できる (図2A, 2B, 3A, 3B, 4A, 4B). また, 卵殻腺部では管状腺細胞にも AhR の局在が確認された (図4B). 対照実験として, 一次抗体の代わりに対照抗体 (正常ヤギ IgG 抗体) を用いた. その結果, AhR の局在は確認できなかった (図2C, 3C, 4C).

内分泌攪乱化学物質ビスフェノールAの骨代謝に及ぼす影響

【研究の背景と目的】

内分泌攪乱化学物質とされるビスフェノール A は、プラスチックの可塑剤であり、主にカップ麺等の食品容器に使用されている。このビスフェノール A は加熱によって食品へ溶出することから、人体への影響が危惧されている。ビスフェノール A は生物に対してエストロゲン様作用を示し、エストロゲン受容体を介して生物に影響を与えているものと推測されている。

鳥類雌の特異組織である骨髄骨は、産卵期にのみ大腿骨などの骨髄腔に出現し、卵殻形成時に利用されるカルシウムの一時的な貯蔵器官として機能している。この骨髄骨は産卵期の卵胞より分泌されるエストロゲンの刺激によって形成され、雄でもエストロゲンの投与によって容易に形成される。

本研究では、雄ウズラにビスフェノール A を投与して骨髄骨の形成を観察し、ビスフェノール A の骨代謝への影響を明らかにすることを試みた。また、エストロゲン様内分泌攪乱化学物質ジエチルスチルベストロール (DES) についても同様な方法を用いて検討した。

【材料と方法】

I. 供試動物

成熟した日本雄ウズラ 20 羽を供試動物として用い、対照区、ビスフェノール A 10mg 投与区、ビスフェノール A 1mg 投与区、DES 投与区の各 5 羽ずつの 4 区を設定し、以下の実験に供した。

II. 投与方法

各区の雄日本ウズラに対し、0.1ml corn oil (対照区)、ビスフェノール A 10mg/0.1ml corn oil (ビスフェノール A 10mg 投与区)、ビスフェノール A 1mg/0.1 ml corn oil (ビスフェノール A 1 mg 投与区)、DES 1 mg/0.1ml corn oil (DES 投与区) をそれぞれ毎日浅胸筋に 7 日間注射した。7 日間の投与後、供試動物は麻酔して屠殺し、大腿骨を採取した。

III. 組織学的観察

得られた大腿骨よりデンタルカッターにて骨幹部を採取し、10%ホルマリン緩衝液を用いて 48 時間の浸漬固定後、脱灰を行い、テクノビット樹脂に包埋した。切片作成後、一般的な組織観察のためにトルイジンブルー染色を施し光学顕微鏡にて観察した。また、一部の樹脂切片については、破骨細胞の指標酵素である酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 活性を検出した。加えて、大腿骨骨幹部の一部は、10%EDTA で 4 日間の低温脱灰をした後、凍結切片を作成して、骨形成系細胞の指標酵素であるアルカリ性ホスファターゼ (ALP) 活性の検出を行った。

【結果】

各区の大腿骨の横断切片をトルイジンブルー染色して観察したところ、対照区では、これまでの報告どおり、骨髄腔は脂肪と骨髄細胞で満たされており、皮質骨骨内膜表面は紡錘形の骨内膜細胞により覆われていた (図 1A)。また、TRAP 活性を有する破骨細胞は観察されず、ALP 活性を有した骨内膜細胞が骨内膜を覆っているのみであった (図 2A)。ビスフェノール A 10mg 投与区では、一部の個体に骨髄骨の発達を観察されるとともに、骨内膜表面には肥大して立方形を呈した前骨芽細胞が観察された (図 1B および C)。また、これらの前骨芽細胞は、対照区の骨内膜細胞と比較して強い ALP 活性を示した (図 2B)。し

かしながら、ビスフェノール A 1mg 投与区では、骨髄骨の形成は観察されず、前骨芽細胞に分化した細胞層の出現も少なかった。DES 投与区では、皮質骨骨内膜から骨髄腔の中心部に向けて骨髄骨が網状に発達していた (図 1D)。また、この骨髄骨表面には骨芽細胞ならびに破骨細胞が存在するとともに、骨形成系細胞が強い ALP 活性を示し顕著な骨髄骨形成が行われていることが窺われた (図 2C)。

【考察】

本研究結果から、ビスフェノール A は雄ウズラにおいてエストロゲン様作用を示し、皮質骨骨内膜細胞から前骨芽細胞までの分化を促すことが示唆された。また、一部の個体では、骨髄骨の形成が観察された。これらことは、骨代謝、とりわけ骨形成がビスフェノール A の影響を受けて促進することが推測された。しかしながら、DES と比較して骨髄骨の形成は顕著ではないことから、ビスフェノール A のエストロゲン様作用は、他の内分泌攪乱化学物質 (DES など) ならびに生体内のエストロゲンと比較して弱いものと考えられる。

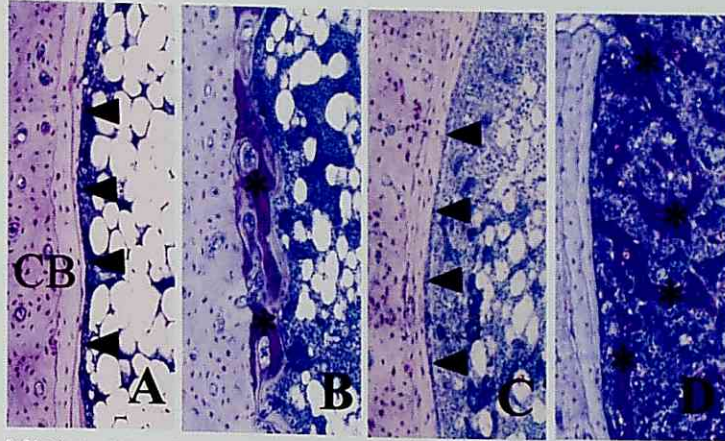


図1. 成熟雄ウズラの大腿骨. A: 対照区, B: ビスフェノールA 10mg投与区, C: ビスフェノールA 10mg投与区, D: DES投与区. トルイジンブルー染色. ×200. A: 皮質骨 (CB) 骨内膜表面に紡錘形を呈した骨内膜細胞 (矢頭) が観察される. B: 皮質骨内膜表面に骨髄骨 (星印) が観察される. C: 皮質骨骨内膜表面に肥大して立方形を呈した前骨芽細胞 (矢頭) が観察される. D: 骨髄腔内に網状に発達した骨髄骨 (星印) が観察される.

内分泌攪乱化学物質がウズラ骨髄骨形成に及ぼす影響

【要約】

現在、ヒトを含めた生物の周囲には、多くの内分泌攪乱化学物質が蔓延している。この内分泌攪乱化学物質はホルモン様作用を示し、各組織の内分泌系、免疫系および神経系の働きに異常を引き起こす。殺虫剤として使用された DDT は自然界や生体内において DDE へと代謝され、ホルモン様もしくは抗ホルモン作用を示し、野生生物をはじめとした動物の正常な内分泌機能を攪乱すると考えられている。しかしながら、DDT とその代謝物の影響は、種や性別で異なり、具体的な作用機序は明らかではない。鳥類雌の特異組織である骨髄骨の形成は、エストロジェンおよびアンドロジェンに依存しており、両ホルモンは受容体を介して皮質骨骨内膜細胞に作用し、骨内膜細胞から骨芽細胞への増殖分化を誘導し、骨髄骨形成を促進する。したがって、成熟した雄ウズラにエストロジェンを投与することによって、骨髄骨は人為的に形成される。本研究では、雄ウズラに DDE を投与して骨髄骨の形成を観察し、内分泌攪乱化学物質の骨髄骨への影響を検討した。また、肝臓での脂肪蓄積、血中アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性およびビテロゲニン濃度を測定し、骨髄骨のバイオアッセイ系としての可能性を探った。

エストロジェン投与の陽性対照区および DDE 10mg 投与区で骨髄骨形成、肝臓での脂肪蓄積、血中 ALP 活性およびビテロゲニン濃度の上昇が観察された。DDE 5mg 投与区では、骨内膜細胞の骨芽細胞への分化、肝臓での脂肪滴および血中 ALP 活性の上昇が観察されたもののビテロゲニン濃度の上昇はしていなかった。DDE 1mg 投与区では、骨髄骨は形成されずビテロゲニン濃度の上昇も示さなかった。しかしながら、肝臓での脂肪滴および ALP 活性の上昇は観察された。DDE 0.2mg 投与区では、脂肪の蓄積のみが観察された。

以上のことから、DDE はエストロジェン様作用を示す内分泌攪乱化学物質であることが明らかとなった。また、雄ウズラにおける骨髄骨形成の観察は、血中ビテロゲニン濃度と同等の高感度な内分泌攪乱化学物質バイオアッセイ法として有効であることが示唆された。

【研究の背景と目的】

現在、ヒトを含めた生物の周囲には、多くの内分泌攪乱化学物質が蔓延している。この内分泌攪乱化学物質はホルモン様作用を示し、各組織の内分泌系、免疫系および神経系の働きに異常を引き起こす¹⁾。内分泌攪乱化学物質は、殺虫剤や除草剤などの農薬、重金属やプラスチックなどの工業製品ならびに医薬品に含まれており、第二次世界大戦以降に大量に使用されてきた²⁾。また最近では、ごみの焼却時に生成されるダイオキシン類の影響が危惧されている。内分泌攪乱化学物質の中でも、殺虫剤として使用された DDT [1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane] は、自然界や生体内において、脱塩化水素化あるいは還元的脱クロル化されることにより、DDE [1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene] および DDD [1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane] へと代謝され^{3,4)}、ホルモン様もしくは抗ホルモン作用を示し、野生生物における生殖器の肥大や萎縮、繁殖能力の低下、催奇性、原因不明の死、雌の雄性化および雄の雌性化をもた

らしている 5・9)。また、鳥類においても、卵殻の脆弱化、行動異常、就巢および排卵の遅延の要因として DDT とその代謝物が考えられており、個体数の減少の原因となっている (10,11)。現在では、それらの使用は多くの国で禁止されているが、DDT の代謝物の安定性は高く、生体内の脂肪組織に蓄積しやすいため、ヒトを含めた食物連鎖の上位に位置する生物では現在でも DDT およびその代謝物の影響をこうむっていると考えられる (5,12)。しかしながら、DDT とその代謝物の影響は、種や性別で異なり、具体的な作用機序は明らかではない (13-15)。

現在、エストロゲン様作用を示す内分泌攪乱化学物質のアッセイ法として、培養細胞が用いられている。この方法は、エストロゲン受容体を有さない培養細胞に人為的にエストロゲン受容体を発現させ、様々な内分泌攪乱化学物質を添加することによって受容体への化学物質の結合解離定数を測定し、内分泌攪乱化学物質のエストロゲン様活性を推測している。この方法では、DDE のエストロゲン受容体への結合は他のジエチルstilbestrol (DES)、ビスフェノール A (Bisphenol A: BPA)、ゲニステインなどの内分泌攪乱化学物質と比較して非常に弱いものとされている (16)。しかしながら、この結果は、上述した生体内での DDE の影響と相反するものであり、受容体を介した遺伝子の発現は多様な転写調節因子の存在に依存するため、単に受容体への内分泌攪乱化学物質の結合がその影響を示すものでないことが報告されている (17)。したがって、生体を用いた感度の高い内分泌攪乱化学物質のバイオアッセイ法の確立が必要とされている。最近、感度の高いバイオアッセイ法として、血中ピテログニン濃度の測定が用いられている。ピテログニンは、鳥類、魚類、両生類および爬虫類の雌の肝臓で特異的に発現する卵黄前駆タンパク質であり、エストロゲン受容体を介して、脂肪とともに生合成されて血中に放出され、卵黄にリポピテリン、ホスピチンとして蓄積する (19,20)。そのため、生きた個体から血液を採取しなければならず、また、このアッセイ法は酵素結合免疫測定法 (ELISA) であるため、測定までの操作が煩雑であり、測定に際し高コストおよび高度な設備が必要であることから、広く普及していないのが現状である。

鳥類雌の特異組織である骨髄骨は、卵殻形成時のカルシウム供給源であり、主に大腿骨および脛骨の骨髄腔に網状に発達する。この骨髄骨は酸性粘液多糖類に富んでおり、基質表面には骨吸収を行う破骨細胞ならびに骨形成を担う骨芽細胞が存在する。この骨髄骨の形成はエストロゲンおよびアンドロゲンに依存しており、皮質骨骨内膜細胞の骨形成系細胞に存在する受容体と結合したエストロゲンおよびアンドロゲンが、受容体を介して皮質骨骨内膜細胞に作用し、骨内膜細胞から骨芽細胞への増殖分化を誘導し、骨髄骨形成を促進することが知られている (21)。したがって、成熟した雄ウズラにエストロゲンを投与することによっても骨髄骨は容易に形成される (22)。

本研究では、雄ウズラに DDE を投与して骨髄骨の形成を観察し、内分泌攪乱化学物質の骨髄骨への影響を検討するとともに、骨髄骨のバイオアッセイ系としての可能性を探った。

【材料および方法】

A. 供試動物と試験

供試動物として、11週齢の成熟した日本ウズラの雄32羽(東海有機)を使用した。各ウズラは室温24℃の日長時間14時間の条件下で個別飼育し、食餌および水は自由摂取とした。内分泌攪乱化学物質は、BPA(Aldrich)、DES(Sigma)およびp,p'-DDE(Aldrich)の3種を使用した。これらの内分泌攪乱物質は、Corn oil(Sigma)を溶媒として以下に示す濃度に懸濁した。本試験では、BPA 10mg/0.1ml区、DES 10mg/0.1ml区、DDE 10mg/0.1ml区、DDE 5mg/0.1ml区、DDE 1mg/0.1ml区およびDDE 0.2mg/ml区の6試験区を設け、各試験区4羽のウズラを用いた。また、陽性コントロールとしてエストロジェン(17- β estradiol)(Sigma) 1mg/0.1ml区を設け、Corn oilのみのものを対照区とした。調整した各物質を毎日0.1mlずつ浅胸筋に注射し、これを7日間行った。試験終了後、心臓から血液を採取し、エタノールを吸引させて屠殺し、両大腿骨および肝臓を採取した。

B. 組織切片作成

採取した右大腿骨は、ダイヤモンドカッターにて骨端を除去した後、10%ホルマリン緩衝液にて室温7日間の浸漬固定を行い、10%EDTA溶液にて7日間脱灰した。脱灰終了後、右大腿骨骨幹部は常方に従って脱水し、テクノビット7100樹脂(kulzer)およびパラフィンに包埋した。その後、骨髄骨の発達と細胞相を観察するため5 μ mの樹脂切片を作成して、トルイジンブルー染色を施し、光学顕微鏡で観察した。また一部の樹脂切片に関しては、トルイジンブルー染色とともに、破骨細胞の指標酵素である酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ(TRAP)活性をアゾ色素法にて検出して観察した。5 μ mのパラフィン切片は、アルシアンブルーおよびヘマトキシリン染色を施し、骨髄骨の発達について観察した。一方、採取した左大腿骨は、右大腿骨と同様に骨端を除去した後、10%EDTA溶液にて4℃の低温脱灰を行い、冷アセトン下でOCTコンパウンドに包埋した。その後、5 μ mの凍結切片を作成し、骨形成系細胞の指標であるアルカリフォスファターゼ(ALP)活性をアゾ染色法にて検出して観察を行った。

採取した肝臓は細切した後、10%ホルマリン緩衝液で室温7日間の浸漬固定を行い、冷アセトン下でOCTコンパウンドに包埋した。その後、15 μ mの凍結切片を作成し、ズダンIV染色を施し、肝臓に蓄積された脂肪を光学顕微鏡で観察した。

C. 血中ALP活性ならびにビテログニン濃度の測定

心臓より採取した血液は、ヘパリン処理した後、1000rpmで15分間の遠心処理を行い、血漿画分と血球画分に分離し、血漿画分を後述するALP活性とビテログニン濃度の測定に供与した。ALP活性の測定は、ラボアッセイ™ALP(和光純薬工業)を用い、採取した血漿を蒸留水にて200倍および300倍に希釈して測定した。ビテログニン濃度に関しては、Vitellogenin, Quail ELISA kit(フナコシ)を用い、血漿を付属の検体希釈液にて10倍および2000倍に希釈して測定した。

【結果】

A. 組織学的観察

各試験区の大腿骨横断樹脂切片をトルイジンブルー染色して観察したところ、Corn oil のみの対照区においては、大腿骨骨髓腔内に骨髓骨の発達は観察されず、皮質骨骨内膜において単核で細胞質の乏しい扁平な未分化骨内膜細胞が並列して存在した。一方、エストロジェンを投与した陽性対照区および DES 投与区では、皮質骨骨内膜より骨髓腔中心部に向けて骨髓骨が網状に発達していた。DDE10mg 投与区では、陽性対照区と同様に網状の骨髓骨が骨髓腔内に観察され、その骨髓骨表面には単核で肥大した骨芽細胞ならびに、多核で肥大した破骨細胞が存在していた。しかしながら、その骨髓骨の発達は陽性対照区および DES 投与区と比較して悪かった。BPA、DDE5mg、DDE 1mg および DDE 0.2mg 投与区では、陽性対照区、DES ならびに DDE 10mg 投与区で観察された骨髓骨の発現はみとめられず、骨髓腔は骨髓細胞と脂肪によって占められていた(図 1)。強拡大で観察すると、BPA、DDE 1mg および DDE 0.2mg 投与区では、皮質骨骨内膜表面は対照区と同様に未分化な骨内膜細胞によって占められていた。しかしながら、DDE 5mg 投与区では、骨内膜細胞は肥大して卵型の核を有した前骨芽細胞に分化していた(図 2)。また、大腿骨パラフィン切片をアルシアンブルー染色して観察したところ、樹脂切片のトルイジンブルー染色のものと同様に、陽性対照区、DES ならびに DDE 10mg 投与区において、酸性粘液多糖類を含む骨髓骨の発達が観察された。

各試験区の肝臓の凍結切片について、ズダンIV染色を施し脂肪の蓄積を観察したところ、陽性対照および DES 投与区の肝細胞細胞質内において、オレンジ色に染色された脂肪滴の蓄積が顕著に認められた。BPA、DDE 10mg、DDE 5mg および DDE 1mg においても、脂肪滴の存在が確認されたが、その量は陽性対照区ならびに DES 投与区と比較して少なく、またその形状は球状を呈していた。対照区ならびに DDE 0.2mg 投与区においては、脂肪の蓄積は観察されなかった(図 3)。

B. 酵素組織化学による ALP および TRAP 活性の検出

各試験区の大腿骨横断凍結切片について ALP 活性を検出して観察したところ、陽性対照区、DES および DDE 10mg 投与区において、形成された骨髓骨の周囲を取り囲むように強い ALP 活性を有する肥大した骨芽細胞が観察された。一方、対照区、DDE 1mg および DDE 0.2mg においては、骨髓骨の形成は観察されず骨内膜表面にわずかな ALP 活性を有する扁平な細胞が並列しているのみであった。しかしながら、DDE 5mg ならびに BPA 投与区では、骨髓骨の形成は観察されないものの、強い ALP 活性を有する細胞が骨内膜表面を覆うように並んでおり、その細胞は対照区と比較して肥大していた。

各試験区の大腿骨横断樹脂切片について TRAP 活性を検出したところ、陽性対照区、DES および DDE 10mg 投与区において、多核巨細胞が TRAP 活性を有し骨髓骨を取り囲むように存在した。また骨髓骨の一部も骨基質に TRAP 活性を有していた。対照区、BPA、DDE 5mg、DDE 1mg ならびに DDE 0.2mg 投与区においては、TRAP 活性は全く観察されなかった

C. 血中 ALP およびピテログニン濃度

採取した各試験区の血漿について ALP 活性を測定した結果、図 4 に示す通りとなった。対照区において ALP 活性は 1.0293 と最も低い値を示し、DES および DDE 10mg 投与区ではそれぞれ 2.426、2.0617 と高い値を示した。骨髄骨は形成されていなかったものの DDE 5mg および DDE 1mg 投与区では 1.838、1.622 と陽性対照区の 1.5351 より高い値を示した。DDE 0.2mg および BPA 投与区ではそれぞれ 1.3764、1.4314 であった。

血中ピテログニン濃度は、図 5 に示す通りとなった。BPA、DDE 5mg、DDE 1mg および DDE 0.2mg 投与区では、490nm での吸光度 0.2425、0.2405、0.2203、0.2193 をそれぞれ示し、対照区の 0.2204 と類似していた。一方、陽性対照区、DES および DDE 10mg 投与区ではそれぞれ 2.212、2.1898、2.2668 と非常に高い吸光度であった。

【考察】

内分泌攪乱化学物質は、ホルモン様および抗ホルモン作用を有し、受容体を介して様々な組織に多様な影響をもたらす。そのため、内分泌攪乱化学物質の作用を特定し、その作用機序を明らかにすることは非常に困難であった。これまで、内分泌攪乱化学物質は内因性ホルモンによって発生が巧妙に制御されている胎児期に作用して、成長後の内分泌系の正常な働きを攪乱ものと一般に考えられてきた。しかしながら、最近の野生生物および実験動物を用いた研究によると、成熟した個体においても内分泌攪乱化学物質に暴露されることで内分泌系の異常をきたすことが報告されている⁵⁾。

DES は避妊薬として使用され、DES を使用した母体から生まれた子は、生殖器の異常、受精率の低下および免疫系の異常をきたすことが報告されている¹⁾。本研究において、雄ウズラに DES を投与した結果、骨髄骨の発現が観察された。また、その発達は、エストロゲン投与の陽性対照と同程度であった。肝臓における脂肪の蓄積、血中ピテログニン濃度は陽性対照と同様に増大し、血中 ALP 活性は陽性対照以上に増加した。このことは、DES はエストロゲン様作用を有し、その作用は本研究で用いた内分泌攪乱化学物質の中で最も活性が高いものと推測される。

エストロゲン様作用を示す内分泌攪乱化学物質として、BPA が知られている²³⁾。BPA は多くの食用包装材に含まれているため、現在では厚生労働省の「内分泌攪乱作用を疑われる化学物質」の一つとしてあげられており、その作用の解明が急がれている。本研究において、BPA を投与した結果、骨髄骨の形成は観察されなかった。しかしながら、酵素組織化学的観察では骨内膜に強い ALP 活性が観察され、肥大した前骨芽細胞に分化していた。また、肝臓に若干の脂肪滴が観察され、血中ピテログニン濃度および血中 ALP 活性も対照区より上昇していた。このことは、BPA もエストロゲン様作用を有していることを示唆している。

DDE は、エストロゲン様もしくは抗アンドロゲン作用を有すると言われているものの、その作用は明らかではない。本研究において、DDE 10mg 投与で骨髄骨の形成が観察されるとともに、肝臓での脂肪蓄積、血中ピテログニン濃度と ALP 活性の増加が観察された。また、DDE 5mg 投与では、

骨内膜細胞から全骨芽細胞への分化が観察され、血中 ALP 活性の上昇もみられた。このことは DDE がエストロゲン様作用を有していることを示している。

エストロゲン受容体を発現させた細胞系の内分泌攪乱化学物質のアッセイ法では、エストロゲンよりもむしろ DES のエストロゲン様作用が高く、その結合定数 (IC_{50}) はエストロゲン (17β -estradiol) $3.2 \pm 0.5 \times 10^{-9} M$ に対して (DES) $2.5 \pm 0.6 \times 10^{-9} M$ を示し 130% エストロゲン受容体に結合しやすいと考えられている。BPA は、結合定数 $7.3 \pm 1.9 \times 10^{-9} M$ を示し、エストロゲンの 0.044% しかエストロゲン受容体への結合が起これないと考えられている。DDE にいたっては、このアッセイ系ではエストロゲン受容体への結合は観察されず、DDE のエストロゲン様作用は非常に低いものと推測されている¹⁶⁾。また、ラット子宮膜腺癌由来の樹立細胞を用いた実験でも、エストラジオール、BPA、DDT の順でエストロゲン受容体への結合が高く、BPA および DDT の結合は、エストラジオールと比較して 1,000 倍以上、受容体への結合が弱いことが明らかにされている¹⁷⁾。しかしながら、本研究では、BPA 投与区では骨髄骨は形成されず、DDE 10mg 投与区で骨髄骨の形成が観察された。このことは、標的細胞のエストロゲン受容体への結合が弱くても、DDE は骨髄骨形成を誘導しており、内分泌攪乱化学物質の影響を一概に受容体との結合で論ずることはできないことを示唆している。

現在、高感度の内分泌攪乱化学物質のバイオアッセイ法として血中ビテロゲニン濃度の測定が用いられており、雄のメダカ、マスなどの生息環境中に存在するエストロゲン様内分泌攪乱化学物質のバイオアッセイ法として用いられている。本研究において、血中ビテロゲニン濃度について検討を行った結果、陽性対照区、DES および DDE 10mg 投与区においてビテロゲニン濃度の著しい上昇が観察され骨髄骨の形成と一致していた。このことは、骨髄骨形成が肝臓でのビテロゲニン生成と同程度にエストロゲンに反応しており、骨髄骨形成が内分泌攪乱化学物質の高感度なバイオアッセイ法として有効であることを示唆している。しかしながら、肝臓での脂肪蓄積および血中 ALP 活性は、骨内膜細胞の分化さえも観察されない DDE 1mg 投与においてもその作用が確認された。肝臓での脂肪蓄積は、鳥類では産卵期に発達する卵胞より分泌されるエストロゲンに依存しており、卵黄リポタンパク質の前駆物質であることが知られている²⁴⁻²⁶⁾。また、この蓄積は、雄ウズラにおいては、外因性エストロゲンならびに DES 投与で誘導されることがすでに報告されており、エストロゲン様作用を知る上での有効な指標とされている。血中 ALP 活性は骨および肝臓から由来しており、骨形成の増加ならびに肝機能障害と高い相関を示すとされている。本研究により、肝臓での脂肪蓄積および血中 ALP 活性の測定はビテロゲニンおよび骨髄骨形成よりもエストロゲン様作用に対し高い感受性を有している可能性が示唆された。したがって、今後、肝臓での内分泌攪乱化学物質の代謝機序を詳細に検討する必要がある。

以上のことから、ウズラ骨髄骨の形成において、DDE はエストロゲン様作用を示す内分泌攪乱化学物質であることが明らかとなった。また、雄ウ

ズラにおける骨髄骨形成の観察は、血中ピテロゲニン濃度と同等の高感度な内分泌攪乱化学物質バイオアッセイ法として有効であることが示唆された。

【引用文献】

1. 立花隆・東京大学教養学部立花隆ゼミ。(1998) 環境ホルモン入門. 新潮社
2. Swartz,W.J. (1984) Effects of 1,1-bis(p-chlorophenyl)-2,2,2-trichloroethane(DDT) on gonadal development in the chick embryo: a histological and histochemical study. *Environ Res.* 35:333-345.
3. Furusawa,N. Transferring and distributing profiles of p,p'-(DDT) in egg-forming tissues and eggs of laying hens following a single oral administration. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 49:334-336. (2002)
4. Kitamura,S., Shimizu,Y., Shiraga,Y., Yoshida,M., Sugihara,K. and Ohta,S. (2002) Reductive metabolism of p,p'-DDT and o,p'-DDT by rat liver cytochrome P450. *Drug Metab Dispos.* 30:113-118.
5. Colborn,T., vom Saal,F.S. and Soto,A.M. (1993) Developmental effects of Perspect. 101:378-384.
6. Lillie,R.J., Denton,C.A., Cecil,H.C., Bitman,J. and Fries,G.F. (1972) Effect of p,p'-DDT, o,p'-DDT and p,p'-DDE on the reproductive performance of caged White Leghorns. *Poult Sci.* 51:122-129.
7. Danzo,B.J., Shappell,H.W., Banerjee,A. and Hachey,D.L. (2002) Effects of and pentachlorophenol on the adult female guinea pig reproductive tract. *Reprod Toxicol.* 16:29-43.
8. Kelce,W.R., Stone,C.R., Laws,S.C., Gray,L.E., Kemppainen,J.A. and Wilson,E.M. (1995) Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature.* 375:581-585.
9. Beard,J., Marshall,S., Jong,K., Newton,R., Triplett-McBride,T., Humphries,B. and Bronks,R. (2000) 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)-ethane (DDT) and reduced bone mineral density. *Arch Environ Health.* 55:177-180.
10. Oestreicher,M.I., Shuman,D.H. (1971) and Wurster,C.F. DDE reduces medullary bone formation in birds. *Nature.* 229:571.
11. Halldin,K., Holm,L., Ridderstrale,Y. and Brunstrom,B. (2003) Reproductive impairment in Japanese quail (*Coturnix japonica*) after in ovo exposure to o,p'-DDT. *Arch Toxicol.* 77:116-122.
12. Shabbir,A., Distasio,S., Zhao,J., Cardozo,C.P., Wolff,M.S. and Caplan,A.J. (2005) Differential effects of the organochlorine pesticide DDT and its metabolite p,p'-DDE on p-glycoprotein activity and expression. *Toxicol Appl Pharmacol.* 203:91-98.
13. Peakall,D.B. and Lincer,J.L. Do PCBs cause eggshell thinning? *Environ Pollut.* 91(1):127-129.(1996)
14. Cecil,H.C., Fries,G.F., Bitman,J., Harris,S.J., Lillie,R.J. (1972) and Denton,C.A. Dietary p,p'-DDT, o,p'-DDT or p,p'-DDE and changes in egg shell characteristics and pesticide accumulation in egg contents and body fat of caged White Leghorns. *Poult Sci.* 51:130-139.
15. Davison,K.L. (1978) Calcium-45 uptake by shell gland, oviduct, plasma and

- eggshell of DDT-dosed ducks and chickens. *Arch Environ Contam Toxicol.* 7:359-367.
16. Matthews, J., Celius, T., Halgren, R. and Zacharewski, T. (2000) Differential estrogen receptor binding of estrogenic substances: a species comparison. *J Steroid Biochem Mol Biol* 74:223-234.
 17. Strunck, E., Stemmann, N., Hopert, A., Wunsche, W., Frank, K. and Vollmer, G. (2000) Relative binding affinity does not predict biological response to xenoestrogens in rat endometrial adenocarcinoma cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 74:73-81.
 18. Deeley, R.G., Udell, D.S., Burns, A.T., Gordon, J.I. and Goldberger, R.F. (1977) Kinetics of avian vitellogenin messenger RNA induction. Comparison between primary and secondary response to estrogen. *J Biol Chem.* 252:7913-7915.
 19. Burley, R.W., Evans, A.J. and Pearson, J.A. (1993) Molecular aspects of the synthesis and deposition of hens' egg yolk with special reference to low density lipoprotein. *Poult Sci.* 72:850-855.
 20. Burns, A.T., Deeley, R.G., Gordon, J.I., Udell, D.S., Mullinix, K.P. and Goldberger, R.F. (1978) Primary induction of vitellogenin mRNA in the rooster by 17beta-estradiol. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75: 1815-1819.
 21. Kusuhara, S. and Schraer, H. (1982) Cytology and autoradiography of estrogen-induced differentiation of avian endosteal cells. *Calcif Tissue Int.* 34:352-358.
 22. Sugiyama, T. and kusuhara, S. (2001) Avian calcium metabolism and bone function. *Asian-Aust.J.anim.sci. Special Issue.* 14:82-90.
 23. Berg, C., Halldin, K. and Brunstrom, B. (2001) Effects of bisphenol A and tetrabromobisphenol A on sex organ development in quail and chicken embryos. *Environ Toxicol Chem.* 20:2836-2840.
 24. Britton, W.M. (1975) Influence of high levels of DDT in the diet on liver microsomal estrogen metabolism in the laying hen. *Bull Environ Contam Toxicol.* 13:698-702.
 25. Courtney, S., Talbot, S. and Manning, R. (1988) Early effects of oestrogen treatment on lipogenesis de novo and on biosynthesis of triacylglycerol from fatty acids in male chick liver. *Int J Biochem.* 20:73-78.
 26. Lin, C.T. and Chan L. (1980) Effects of estrogen on specific protein synthesis in the cockerel liver: an immunocytochemical study on major apoproteins in very low density and high density lipoproteins and albumin. *Endocrinology.* 107:70-75.

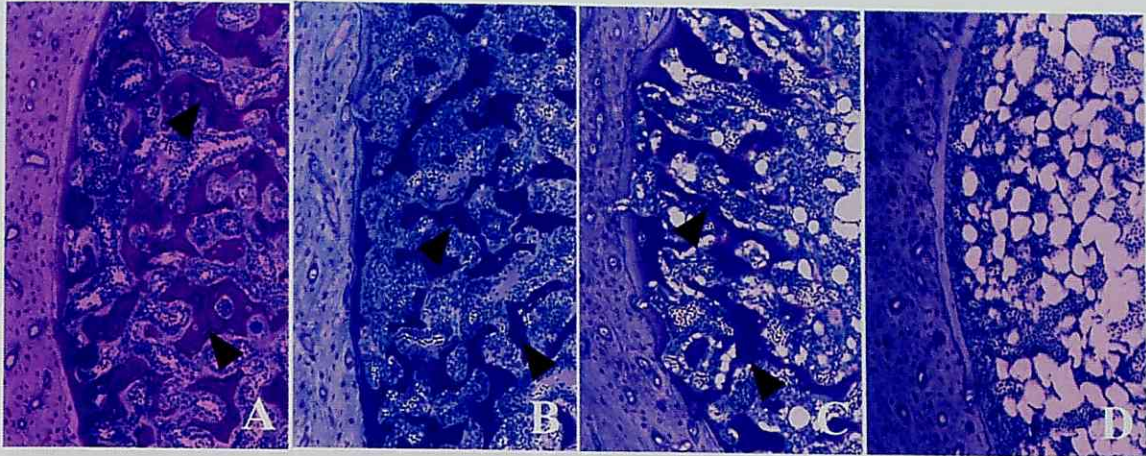


図 1：骨髓骨形成．トルイジンブルー染色．×100．

- A. エストロジェン投与区(陽性対照)：骨髓骨(矢頭)が皮質骨から骨髓腔中心部に向けて顕著に形成されている。
- B. DES 投与区：陽性対照区と同様に骨髓骨(矢頭)は顕著に形成されている。
- C. DDE 10mg 投与区：上記の 2 区よりは劣るものの骨髓骨(骨髓骨)は形成されている。
- D. 対照区：骨髓骨は全く形成されていない。

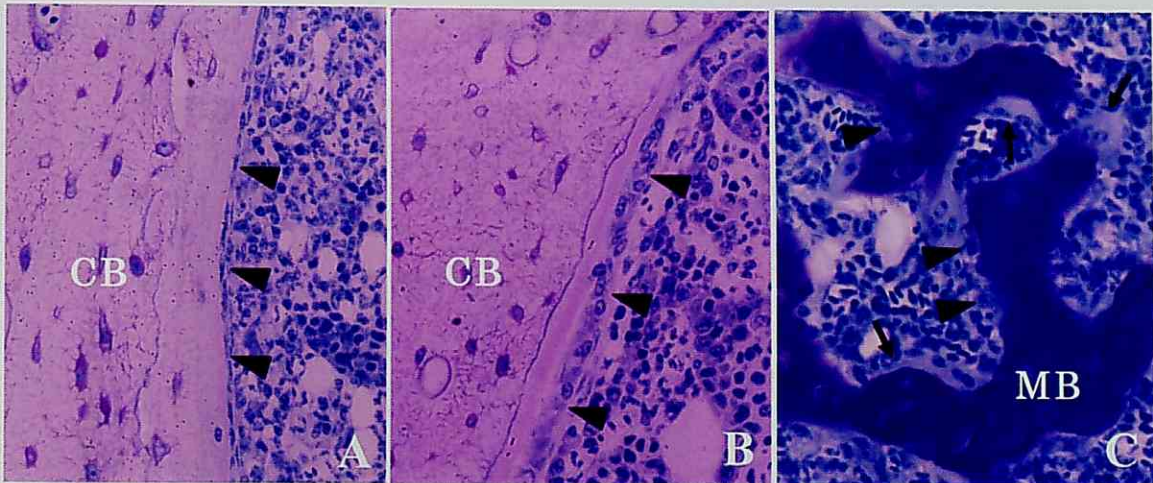


図 2：大腿骨横断切片．トルイジンブルー染色．×400．

CB:皮質骨, MB:骨髓骨.

- A. 対照区：骨内膜表面を扁平な核を有する骨内膜細胞が覆っている。
- B. DDE 5mg 投与区：扁平であった骨内膜細胞が肥大し前骨芽細胞へと分化している。
- C. DDE 10mg 投与区：骨髓骨の周辺に肥大した骨芽細胞(矢頭)および多核で巨大な破骨細胞(矢印)が存在しており，骨形成ならびに骨吸収を行っている。

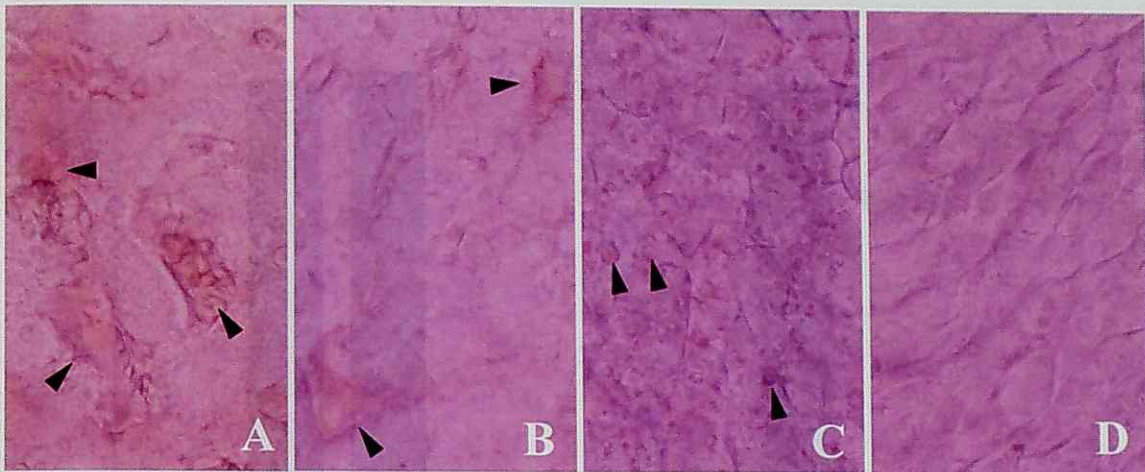


図 3：肝臓脂肪組織の蓄積．ズダンIV染色．×400．

- A. エストロジェン投与区(陽性対照)：肝臓脂肪組織(矢頭)が蓄積されている。
- B. DES 投与区：陽性対照区と同様に脂肪組織(矢頭)が蓄積されている。
- C. DDE 10mg 投与区：脂肪組織(矢頭)は球状の脂肪滴として蓄積されている。
- D. 対照区：脂肪組織の蓄積は観察されない。

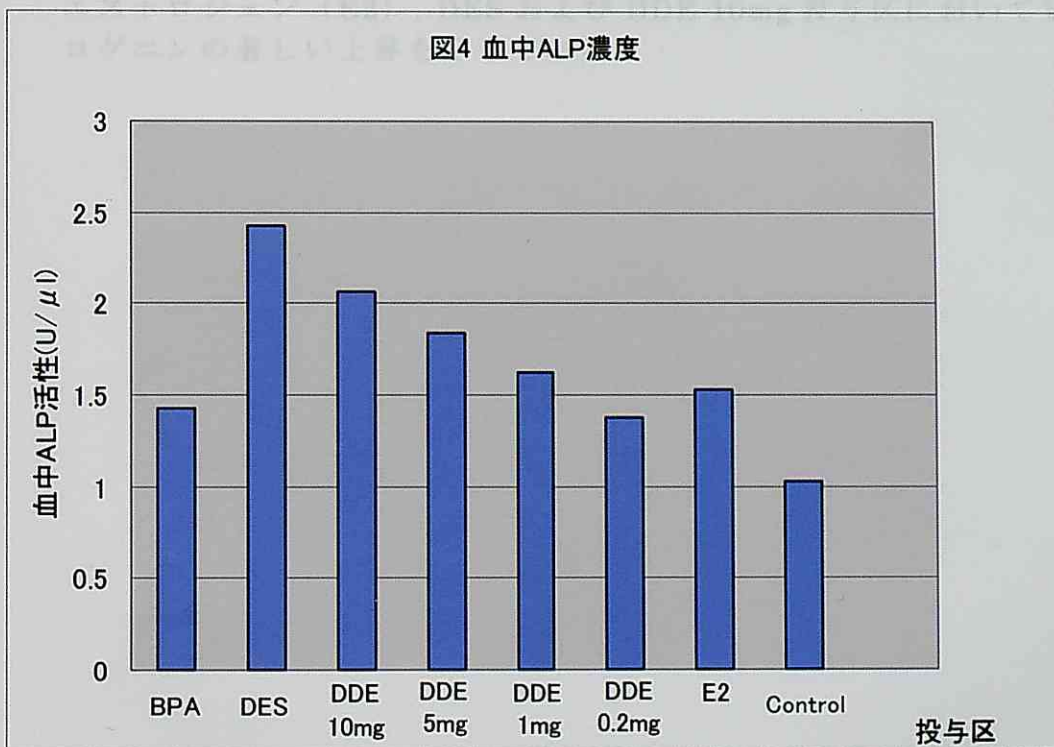


図 4：血中 ALP 活性．

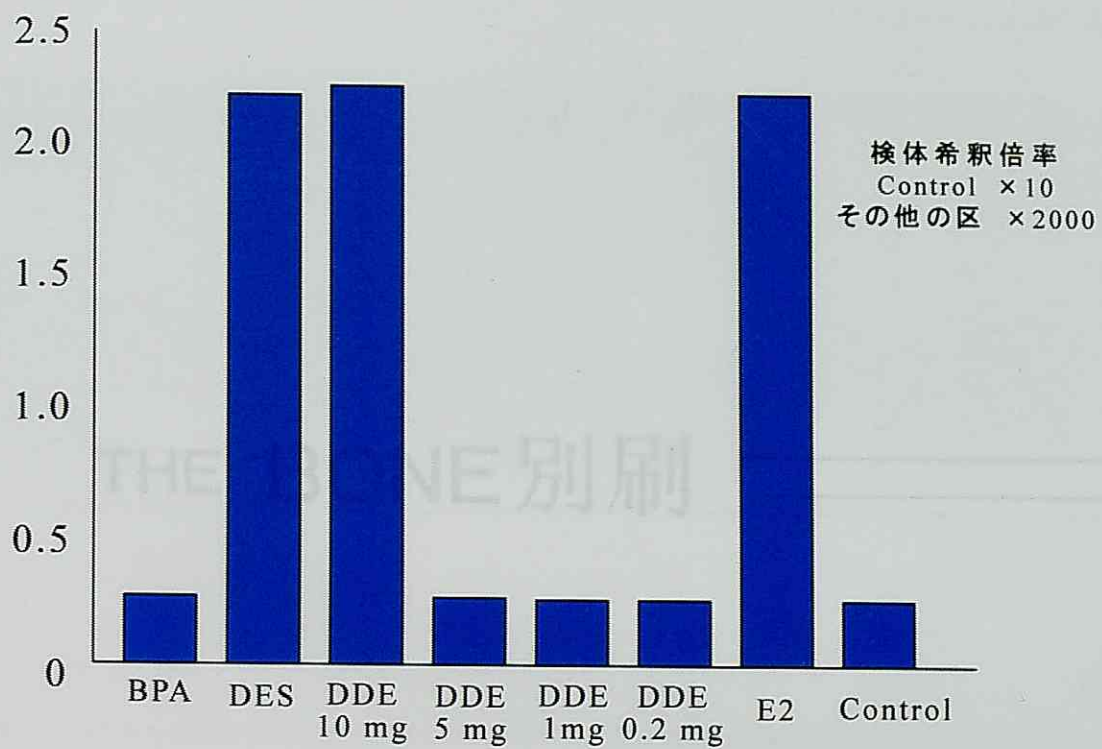


図 5 : 血中ビテロゲニン濃度。
 エストロジェン (E2) , DES および DDE 10mg 投与区においてビテロゲニンの著しい上昇を示している。