

博士論文

鳥類胚を用いた化学物質の
抗アンドロジェン性内分泌攪乱作用評価系の
構築に関する研究

平成 22 年 9 月

広島大学大学院生物圏科学研究科

生物資源科学専攻

内 海 透

目 次

第1章 緒論	1
第2章 ウズラ胚組織に対する化学物質の男性ホルモン攪乱作用の組織学的評価法	
緒言	9
第1節 アンドロジェン物質に対する高感受性のウズラ胚組織の検索	11
第2節 アンドロジェンおよび抗アンドロジェン物質投与に伴うクロアカ腺の 組織構造的変化の定量的解析	22
第3節 クロアカ腺におけるアンドロジェン受容体発現の解析	28
第4節 クロアカ腺におけるトランスフォーミング成長因子- β 発現の解析	38
考察	44
要約	48
第3章 ウズラ胚クロアカ腺を標的としたレクチン組織化学による化学物質の 男性ホルモン攪乱作用の評価法	
緒言	50
実験1 胚クロアカ腺細胞内糖鎖に結合するレクチンの検索とその糖鎖の 特性の同定	51
実験2 ウズラ胚へのアンドロジェンおよび抗アンドロジェン物質投与に伴う クロアカ腺における VVA レクチン反応産物量の変化の定量的解析	59
考察	62
要約	65
第4章 ウズラ胚クロアカ腺を標的とした細胞増殖活性解析による化学物質の 男性ホルモン攪乱作用の評価法	
緒言	67
材料と方法	68
結果	70
考察	73
要約	75

第5章	ウズラ胚クロアカ腺を指標とした化学物質の男性ホルモン攪乱作用評価法の汎用性の実証	
緒言	76
材料と方法	77
結果	80
考察	89
要約	91
第6章	総合考察	92
第7章	総括	99
	引用文献	105
	謝辞	121

第1章 緒論

内分泌攪乱物質とは、ホメオスタシスの維持や発生/発達過程の制御に関与する生体内の内因性ホルモンの産生、放出、移動、代謝、結合、作用あるいは排出に干渉する外因性物質のことである (Kavlock *et al.*, 1996)。外因性化学物質による内分泌攪乱問題は既に半世紀以上にわたる歴史をもっている。すなわち、1950年初頭以降の *o,p'*-ジクロロジフェニルトリクロロエタン (DDT) をはじめとする有機塩素系殺虫剤の広範囲な自然環境への分布と、食物連鎖を介した生物濃縮、肉食性鳥類の卵殻菲薄と次世代繁殖への障害がその発端となった (宮本, 2001)。Ratcliffe (1967, 1970) は、当時英国で認められていたワシやタカなど猛禽類の個体数減少に着目し、1900~1970年におけるハヤブサの卵殻の厚さを調べ、1940年代の後半から薄くなり始めたことを示し、DDTの局所的大量使用開始と相関があることを示した。Bitman *et al.* (1968) は、DDTが実際にエストロゲン様作用を有し、多くの種における卵殻菲薄の原因であることを立証した。また、DDT曝露によってオス胚の雌性化、性比や繁殖パターンの変化、奇形および異常行動が誘発されることも示された (Fry and Toone, 1981 ; Fry *et al.*, 1987)。一方、米国五大湖に関する研究において、食魚性鳥類における内分泌攪乱の別の原因物質としてポリ塩化ビフェニル類 (PCBs) が同定された。鳥類における生体内蓄積の程度は、同族体の含量や餌動物の組成、性別や年齢、PCBs汚染地域における個々の動物の滞在時間のような因子によって左右される (Struger and Weseloh, 1985)。PCBsは半減期が長く、卵黄中に存在することから (Frank *et al.*, 2001)、その同族体は重大な懸念となり、鳥類に PCBs を曝露することで「五大湖胚死亡・浮腫・奇形症候群 (GLEMEDS: Great Lake Embryo Mortality, Edema and Deformity Syndrome)」が誘発され (Henshel *et al.*, 1995)、ならびに肝酵素活性変化のような他の影響が生じること (Barron *et al.*, 1995) も明らかにされた。また、PCBs汚染によって、マガモ (*Anas platyrhynchos*) やアオサギ (*Ardea cinerea*) における卵破壊行動、セグロカモメ (*Larus argentatus*) やシロカモメ (*Larus hyperboreus*)、ハヤブサ (*Falcon columbarius*) およびソウゲンハヤブサ (*Falcon mexicanus*) における営巣行動の低下、雄モリバト (*Streptopelia risoria*) における攻撃的行動の長期化および亢進、チョウゲンボウ (*Falcon sparverius*) における雄性求愛行動頻度の上昇とその結果としてヒナ孵り開始の遅延を来す鳥類の異常行動が誘発されることが報告された (Milstein *et al.*, 1970 ; Fyfe *et al.*, 1976 ; Fox *et al.*, 1978 ; Fox and Donald, 1980 ; McArthur *et al.*, 1983 ; Henshel *et al.*, 1995 ; Fisher *et al.*, 2001 ; Boustnes *et al.*, 2001)。これら野

生鳥類での変化が次第にカナダカワウソ (*Lutra canadensis*) やアメリカミンク (*Mustela vison*) の数の減少 (Wren, 1991)、ミシシッピーワニ (*Alligator mississippiensis*) のペニス異常 (Guillette *et al.*, 1996, 1999)、バルチックアザラシ (*Phoca hispida botnica*) やハイイロアザラシ (*Halichoerus grypus*) の数の激減 (ICES, 1992)、各種軟体動物でのインポセックス (メスにおけるペニスおよび輸精管を含むオス性器の出現) の発生頻度増加 (Bryan *et al.*, 1986 ; Smith and McVeagh, 1991) など、全世界的に多くの生物種における生殖・繁殖の異常、免疫不全や脳の発育不良を疑わせる異常の出現の報告へとつながっていった。

一方、ヒトにおいても合成女性ホルモンのジエチルstilbestロール (DES) を投与された妊娠女性より生まれた女兒における膣がん (Herbst *et al.*, 1971)、男児における停留精巣や尿道下裂 (Orth, 1984) をはじめとして、男性における精子数の減少と劣化 (Carlsen *et al.*, 1992) や前立腺がんの増加 (Huff *et al.*, 1991a, 1991b)、女性における乳がんの増加 (Kelsey and Bernstein, 1996)、子宮内膜症の増加 (Gerhard and Runnebaum, 1992 ; Koninckx, 1999) などが報告されるようになった。このような報告例が一般化し、ヒトから野生生物にわたる各種の異常の原因が、当該環境下に見出される DDT、PCBs、テトラクロロジベンゾジオキシン (TCDD) などの残留性有機汚染物質 (POPs: Persistent Organic Pollutants) による動物における内分泌攪乱作用と関連していると次第に論じられるようになった。さらに、以上のような POPs 以外にも、ノニルフェノール、ビスフェノール A、フタル酸エステル類のような汎用化学物質、アトラジンやビンクロゾリンをはじめとするいくつかの農薬を含む数十の化合物に内分泌系に影響を与える可能性が指摘された (宮本, 2001)。上述したように化学物質の内分泌系に対する悪影響は、地球上の全生物種の将来を危うくするものとみなされ、Colborn *et al.* (1992) による「Our Stolen Future (邦訳: 奪われし未来)」の出版によって社会的にさらに大きな反響と混乱を引き起こすことになった。

内分泌攪乱問題に対する各国の対応状況

内分泌攪乱化学物質による環境汚染は、科学的には未解明な点が多く残されているものの、それが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恐れがあることから環境保全上の重要課題として、多くの科学研究・調査がなされてきた。また、化学品安全のための政府間フォーラム (IFCS) 第二回会合 (1997年) での様々な勧告に呼応して、世界保健機関/国連環境計画/国際労働機関 (WHO/UNEP/ILO) による国際化学物質安全計画 (IPCS) と経済協力開発機構 (OECD) が、研究課題の各国分担な

らびに協調的な試験・評価・管理戦略の開発など、国際的懸案への対処に向けた協調・支援を行い、その動向を踏まえ、米国、欧州連合、OECDなどで様々な取り組みがなされている。

米国環境保護庁（EPA）では、1996年に制定された食品品質保護法（FQPA）および飲料水安全法に基づき、内分泌攪乱物質スクリーニング・試験諮問委員会（EDSTAC）を設立した。1998年にはヒト健康に有害な影響を及ぼすようなエストロゲン作用をもつ農薬やその他の化学物質のスクリーニングを行うプログラムの方針を策定し、当プログラム（EDSP: Endocrine Disruptor Screening Program）が進行中である（US EPA, 2009）。EDSPでは、Tier 1 スクリーニングと Tier 2 テストの2段階の試験体制を採用している。Tier 1 スクリーニングは、生物の内分泌系に対する化学物質の作用の検出を目的とした5種類の試験管内試験と6種類の動物試験より構成されている。これまでに試験法の妥当性の検証が行われ、2009年末までに試験法ガイドラインが公表された。Tier 2 テストは、化学物質の生物に対する有害な影響を確認するための試験である。その妥当性検証は現在実施中であり、2011年末までに完了し、採用する試験法が決定される見込みである。Tier 2 テストには、ラット2世代繁殖性試験の他、鳥類2世代繁殖性試験などが候補としてあがっている。

欧州委員会（EC）は、1996年から内分泌攪乱化学物質に対する取り組みを開始している。1999年には、内分泌攪乱化学物質に対する戦略（COM(1999)706）が採択され、以降順次見直しが行われてきている。この戦略においては、短期的取組み（情報の集約による優先検討対象物質の選定）、中期的取組み（試験法の開発や研究の実施）および長期的取組み（リスク評価手法およびリスク管理手法の検討）が継続して実施されており、2010年末までに内分泌攪乱化学物質に対する戦略の実施に関する報告書を作成することが見込まれている。また、2007年に発効した欧州連合（EU）における化学物質の登録・評価・認可および制限に関する「REACH 規則」においては、当局の特別な認可が必要な高懸念物質（SVHC: Substance of Very High Concern）の要件の一つに「内分泌攪乱作用」を挙げ、ヒトや環境に対する深刻な影響をもたらす恐れがあるとの科学的認識に立脚した対応策を検討中である。さらに、生態系に対し潜在的に内分泌攪乱作用など深刻なリスクを及ぼす化合物の使用も新規登録も禁止する一律の基準「cut-off criteria」を農薬登録規制に導入する法律が発効された（EU Official Journal, 2009）。

OECD では、化学物質の試験法ガイドラインプログラムの一環として、1998年に内分泌攪乱化学物質の試験および評価に関するタスクフォース（EDTA: Endocrine Disruptors

Testing and Assessment) が設立され、加盟国への情報提供と活動間の調整、化学物質の内分
泌攪乱作用を検出するための新規試験法の開発と既存の試験法の改訂、有害性やリスク評
価の手法の調和などを目的に活動してきている。生態毒性分野では、魚類、両生類、無脊
椎動物を用いた試験法の開発検討などが行われた。このほか、哺乳類を対象とする試験や、
鳥類 2 世代繁殖性試験、試験管内 (*in vitro*) 試験の手法の検討および開発などが幅広く行
われている。

日本では、1998 年に内分泌攪乱化学物質問題についての具体的な対応方針「環境ホルモ
ン戦略計画 SPEED'98」が策定され、環境中での検出状況、野生生物などに係る実態調査の
推進、試験研究および技術開発の推進、環境リスク評価、環境リスク管理および情報提供
の推進、ならびに国際的なネットワーク強化を、対応方針の枠組みとして取組んできた。
この SPEED'98 における取組みにより得られた知見を踏まえ、2005 年以降は、化学物質の
内分泌攪乱作用問題に関する対応として、野生生物の観察、環境中濃度の実態把握および
曝露の測定、基盤的研究の推進、影響評価、リスク評価、リスク管理、ならびに情報提供
とリスク情報交換などの推進を基本的な柱とし、ExTEND2005 (Enhanced Tack on Endocrine
Disruption) と名づけて関連の研究・調査などが進められている。

内分泌攪乱作用に関する鳥類と哺乳類の違い

生殖事象に関して、鳥類と哺乳類の内分泌系はホルモンやホルモン受容体、フィードバ
ック機構など多くの共通点を有する。一方で、本質的な形態および機能上の違いがある。
その相違点の一つに生殖腺の分化に関する違いがある。鳥類や哺乳類では、受精した時の
性染色体の組合せによって遺伝的な性が決定され、遺伝的性は一生涯変化しない。鳥類で
はオス ZZ、メス ZW の性染色体構成で、一方の哺乳類ではヘテロ配偶子はオスの XY、メ
スは XX である。哺乳類ではよく研究が進み、生殖腺の性決定遺伝子が Y 染色体上に載っ
ており (Koopman *et al.*, 1991)、未分化な生殖腺を精巣に誘導し、アンドロジェンを産生さ
せてオス特有な生殖腺付属器官の形成を促す (森, 1995 ; 小清水, 1995)。鳥類では未だ性決
定遺伝子はみつかっていないが、性ホルモンが関与する点では哺乳類と同じで、鳥類の場
合その役割をエストロジェンが担う (水野, 2001 ; Shimada, 2002)。すなわち、これら性ホ
ルモンが過剰であったり欠乏したりする条件では、現れる形態変化が哺乳類と鳥類とで異
なる場合がある。例えば、生殖腺分化の時期におけるエストロジェンの過剰状態では、哺
乳類のメス胎児では特段の形態変化はみられないが、鳥類のメス胚では右側卵管遺残など

といった奇形を呈す (Rissmann *et al.*, 1984 ; Berg *et al.*, 2001a ; OECD, 2006 ; Biau *et al.*, 2007)。また、卵生か胎生かと言う違いがある。鳥類は卵生、哺乳類は一部 (カモノハシやハリネズミなど) を除いては胎生である。すなわち、生殖腺の発生・分化を含む胚発生期が、卵という閉鎖環境で行われるか、代謝や排泄による無毒化を含む様々な変化がなされる母体内で行われるかの違いであり、卵内の鳥類胚にとっては苛酷な発生条件とも言える。有機塩素系化合物のいくつかによる鳥類胚の奇形発生がこのような要因によるものと論じられている (OECD, 2006)。他にも、鳴き鳥の求愛行動や営巣行動も内分泌系の制御下にあり、*p,p'*-ジクロロジフェニルジクロロエチレン (DDE) による卵殻薄弱化 (Cooke, 1973) も鳥類に特徴的な内分泌攪乱作用に関連する所見と考えられている。これらのように、哺乳類の結果からでは予測し得ない変化が鳥類に発現する可能性があり、鳥類での内分泌攪乱作用を正しく見極めるには、鳥類を供試生物にした実験系が必要と考えられている (OECD, 2006 ; EFSA, 2009)。

内分泌攪乱作用に関する鳥類での試験法

上述の通り、鳥類と哺乳類の本質的な違いを背景に、OECD が主体となって鳥類に対する潜在的な内分泌攪乱作用を検出し特徴付ける *in vivo* 法として鳥類 2 世代繁殖性試験の開発が進められている (OECD, 2006)。これは、農薬などの登録要件として求められる既存の鳥類 1 世代繁殖性試験 (OECD Guideline No.206, 1984 ; US EPA OPPTS 8500.2300, 1996) の拡充型と言える。鳥類 1 世代繁殖試験は、親世代の生殖機能から次世代の孵化直後の成長までを評価するもので、約 5 ヶ月間の生物実験期間が必要である。評価指標としては、親世代は死亡、症状、体重、摂餌量、剖検、受精能、産卵能および卵殻厚、次世代は胚の生存性および孵化率ならびに雛の生存性および体重で、評価指標の設定範囲が限られ、内分泌攪乱作用を検出するには充分ではないと考えられている。そこで、OECD が開発中の 2 世代試験法では、観察を 2 世代に延長した約 11 ヶ月間の生物実験期間の中、1 世代試験法の評価指標に加え、性比、性成熟、交尾行動、クロアカの発達、生殖腺などの病理組織学的検査、精子検査、ビテロゲニン・性ホルモン・コルチコステロン・甲状腺ホルモンなどの測定を行うことが検討され、それら評価指標の妥当性の検証が行われている。

ところで、鳥類ではメスにおいてエストロジェンが性分化に重要な役割を果たすため、性分化期にエストロジェン合成が阻害されるなら、遺伝的なメス鳥はオスの表現型で発達する可能性が示唆されている (Elbrecht and Smith, 1992)。また、野生生物においてオスの雌

性化を来し、鳥類の性分化に影響しうる潜在的な作用もエストロゲンが有しているため、鳥類におけるエストロゲン作用の内分泌攪乱は、生態系レベルでの懸念になりうる。

一方、アンドロジェンは全ての脊椎動物のオス生殖能の機能維持において中心的な役割を担い、鳥類においてもオスの生殖器官の発達や精子形成 (Mizushima *et al.*, 2006)、求愛行動や営巣行動などの二次性徴 (OECD, 2006)、さらには免疫機能 (Quinn *et al.*, 2006) などがアンドロジェンの制御下にあることから、アンドロジェンの過剰あるいは欠乏した状態の場合、鳥類の生理機能に悪影響を及ぼす可能性は容易に想定される。しかし、エストロゲン関連物質と比べてアンドロジェンの作用に焦点をあてた鳥類の研究は少ない (OECD, 2006)。開発中の OECD 2 世代繁殖性試験の評価指標の候補として検討されていた Liang *et al.* (2004) の方法は、性成熟に達したニホンウズラのオスを供試生物として男性ホルモンの標的組織である総排泄隆起 (クロアカ腺) の大きさを評価指標とし、化学物質のアンドロジェン様作用または抗アンドロジェン様作用の有無や程度を把握しようとするものである。しかし、去勢手術を必要とし、被験物質の投与を 7~8 日間連日行う必要があるため、特殊な実験操作と実験施設・設備の確保、実験処理の簡易性への改善が必要である。また、クロアカ腺の発達が照明時間や飼料など施設環境や飼養条件の違いに影響を受けやすいため、実験環境を常に一定の基準に設定できる評価システムの開発が必要である。

ニホンウズラのクロアカ腺の構造と機能

ニホンウズラのオスは、繁殖期になるとクロアカの背側部が暗赤色に肥大し、交尾や排糞時にクロアカから白色の泡沫液を分泌する。Coli and Wetherbee (1959) は、クロアカ背壁に発達した腺組織を見出し、これをクロアカ腺 (cloacal gland) と命名し、この泡沫液はその腺に由来すると報告した。Fujii and Tamura (1967a) は、繁殖期のオスのクロアカ腺は肛門洞固有の重層扁平上皮で覆われ、その部の粘膜下組織部を完全に占めること、腺は独立した長囊状単位腺で、腺腔には一次および二次の腺上皮ヒダを形成すること、腺上皮は単層の腺細胞から成ることを述べた。クロアカ腺の分泌物はその組織化学的観察の結果、硫酸性粘液多糖類であることも報告された (Fujii and Tamura, 1967b)。クロアカ腺が雌雄ともに性成熟前まではほとんど発達していないが、性成熟に達するとオスのみで急速に発達し分泌機能が亢進する。ニホンウズラのクロアカ腺はアンドロジェンに応答して発達する二次性徴組織である (Ottinger and Brinkley, 1979a, 1979b)。

アンドロジェン受容体と内分泌攪乱物質

アンドロジェン受容体は核内受容体と細胞膜受容体に大別される。核内受容体を介するアンドロジェン作用は、遺伝子発現を介して細胞増殖、組織の発達または分泌物産生などを調節する (Lamont and Tindall, 2010)。細胞膜受容体は細胞膜機能を調節して、カルシウムイオン透過性の制御などにより、即時的な細胞機能の調節を行う (Foradori *et al.*, 2008)。クロアカ腺の肥大をもたらすアンドロジェン作用は核内受容体を介するものである。アンドロジェン性内分泌攪乱物質が組織の形態や機能に及ぼす影響の多くは、核内受容体との結合に対して内因性アンドロジェンと競合するものであると考えられる。

研究の目的

以上のように、エストロジェンと同様、鳥類の生体機能の維持に重要な役割を担うアンドロジェン作用の内分泌攪乱は、個体のみならず個体群、延いては生態系レベルでの懸念になりうる。従って、鳥類のアンドロジェン攪乱作用を検出するための評価手法の構築は必須で、国際的にも重要な課題として取り上げられている。しかし、これまでの鳥類のアンドロジェン作用に焦点を絞った研究は数も少なく、また、あっても脳内アルギニン-バゾトシン分泌の障害 (Mura *et al.*, 2009) やファブリキウス囊の障害 (Quinn *et al.*, 2006) といった定性的評価にとどまったものか、抗アンドロジェン物質によるウズラ総排泄腔の大きさを指標に定量評価できるウズラクロアカテスト法においても (Liang *et al.*, 2004)、成体を飼育し去勢手術を施す必要があるなど、実験施設や設備の確保と特殊な実験操作が必要である。また、実験処理の簡易化、さらには試験結果の誤差を最小限にするような改善策が必要である。

そこで本研究では、鳥類における化学物質のアンドロジェンおよび抗アンドロジェン性内分泌攪乱作用の簡易評価法を構築することを目的とした。このために、ニホンウズラ受精卵にアンドロジェンあるいは抗アンドロジェン作用物質を投与し、胚時期における高感受性評価指標を見出して内分泌攪乱作用評価手法に適用すると共に、評価指標の発現の機構を追究した。

第2章ではウズラ胚に対する化学物質の男性ホルモン攪乱作用の組織学的評価法を確立するために、まず、ニホンウズラの受精卵内への投与 (*in ovo*) 法を用いてアンドロジェン物質に対する高感受性ウズラ胚組織を検索した。続いて、アンドロジェンおよび抗アンドロジェン物質投与に伴う標的組織の組織構造的変化を定量的に解析した。その作用発現の

機構を追究するために標的組織におけるアンドロジェン受容体の発現とトランスフォーミング成長因子- β の発現をそれぞれ解析した。

第 3 章では、前章においてクロアカ腺細胞ではアンドロジェン作用を受けると粘液が増加することを見出したため、この粘液内の糖鎖の発現量から化学物質のアンドロジェンと抗アンドロジェン作用を評価することを検討した。糖鎖の発現量はレクチン組織化学により定量的に解析した。

第 4 章ではウズラ胚クロアカ腺の細胞増殖活性による化学物質のアンドロジェン性攪乱作用評価系への適用性を検討するために、アンドロジェンおよび抗アンドロジェン作用物質投与に伴うクロアカ腺の増殖細胞核抗原の発現によりこれを定量的に解析した。

第 5 章では、前章までに開発した 3 つの評価法の汎用性を検証するために、別の抗アンドロジェン物質を用いて、クロアカ腺の組織構造的変化の定量的解析、クロアカ腺のレクチン結合物質の定量的解析、クロアカ腺の細胞増殖活性の定量的解析をそれぞれ実施した。

第 6 章では以上の結果をまとめ、今回開発したウズラ胚を用いた化学物質の抗アンドロジェン性内分泌攪乱作用の評価手法の有用性について総合的に考察した。

第 2 章 ウズラ胚組織に対する化学物質の男性ホルモン攪乱作用の組織学的評価法

緒言

鳥類の受精卵内に化学物質を投与し、その物質の内分泌系への影響を調べる報告はこれまで多数なされているが、そのほとんどが化学物質のエストロジェン作用に関する研究であった。例えば、エストラジオールベンゾエイトを孵卵 10 日のニホンウズラ卵内に投与すると、成熟したメス成体に右側卵管遺残や左卵管の小型化、さらには産卵数の低下が認められた (Rissmann *et al.*, 1984)。他のジエチルスチルベストロールなどのエストロジェン様物質のウズラ卵内投与では、ミューラー管や卵管の形態異常、産卵抑制が成熟メスにみられ (Berg *et al.*, 1999, 2001a, 2001b ; Holm *et al.*, 2001 ; Yoshimura and Fujita, 2005 ; Biau *et al.*, 2007)、卵殻厚の菲薄も観察された (Berg *et al.*, 2004 ; Holm *et al.*, 2006 ; Kamata *et al.*, 2006a, 2006b)。オスにおいては、エストラジオールベンゾエイトを孵卵 9 日のウズラ卵内に投与すると、成熟個体になった時に性行動の雌性化やクロアカ腺の発達の遅れが認められた (Schumacher *et al.*, 1989)。他のエストロジェン様物質でもウズラ卵内投与により、オス胚で卵精巢の出現やミューラー管の形態異常、成体になって性行動の雌性化やクロアカ腺の発達の抑制がみられた (Berg *et al.*, 1998 ; Halldin *et al.*, 1999 ; Berg *et al.*, 1999, 2001a ; Shibuya *et al.*, 2004, 2005 ; Blomqvist *et al.*, 2006 ; Kamata *et al.*, 2006a ; Biau *et al.*, 2007)。

一方、アンドロジェン物質 5 β -ジヒドロテストステロンをニホンウズラ受精卵の孵卵 9 日に卵内投与した結果、成体オスの行動や形態には異常は観察されなかった (Schumacher *et al.*, 1989)。メチルテストステロンを孵卵直前のウズラ胚に投与しても、孵卵 16 日胚では性分化や性腺の構造に対する影響は認められなかった (Shibuya *et al.*, 2004)。最近、アンドロジェン物質の酢酸トレンボロンを孵卵 4 日のウズラ胚に投与したところ、成熟オスにクロアカ腺の発達の抑制、ファブリキウス囊の小型化および濾胞減少が観察されている (Quinn *et al.*, 2007a, b)。抗アンドロジェン物質の *p,p'*-ジクロロジフェニルジクロロエチレン (DDE) を孵卵 1 日のウズラ卵内に投与した結果では、孵化 1 日令のオスにおいてファブリキウス囊の大型化および濾胞減少が認められている (Quinn *et al.*, 2006)。これらの報告からアンドロジェンや抗アンドロジェン物質がウズラ生体の機能に及ぼす影響は一部で検出されているが、その影響の程度を数値化した客観的な評価法は確立されていない。

クロアカ腺や性腺、尾腺にはアンドロジェン受容体が発現している (Massa *et al.*, 1980 ;

Amet *et al.*, 1981 ; Abalain *et al.*, 1984 ; Kaku *et al.*, 1993 ; Suzuki *et al.*, 1996 ; Mizushima *et al.*, 2006)。肝臓や腎臓は多くの毒性物質によって影響を受けるため、化学物質の一般毒性影響を病理学的に評価するのに有用な標的臓器である。アンドロジェン受容体が発現する臓器と同時に肝臓や腎臓への影響を解析すれば、一般毒性ではないアンドロジェンと抗アンドロジェン作用を評価できると期待される。Liang *et al.* (2004) は、成熟オスウズラを去勢してクロアカ腺を退行させ、これにテストステロンと抗アンドロジェン物質のフルタミドを投与し、クロアカ腺の発達程度からアンドロジェンや抗アンドロジェン作用を評価した。しかし、この方法は、去勢手術を伴い、飼育施設環境を整える必要があるため、特殊な実験操作と実験施設・設備の確保を必要とし、また、クロアカ腺が施設環境や飼育条件に敏感に反応するため試験機関の間で試験結果の誤差を生じやすい。

そこで本章では、ウズラ胚を用いて化学物質の男性ホルモン攪乱作用の組織学的評価法を確立することを目的として行った。ウズラ胚は孵卵により維持するため、成体の実験とは異なって、試験機関の間で共通的な一定の基準で実験条件設定が可能である。第1節ではニホンウズラの受精卵内へアンドロジェンを投与してアンドロジェン物質に対して感受性が高い胚組織の検索を行った。第2節ではアンドロジェンおよび抗アンドロジェン物質投与に伴う標的組織の組織構造的変化を定量的に解析した。また、アンドロジェンの作用発現の機構を追究するため、第3節では標的組織においてアンドロジェン受容体が発現することを実証した。第4節ではクロアカ腺の細胞分化を誘導する要因を検討するために、トランスフォーミング成長因子- β (TGF- β) の発現を解析した。

第1節 アンドロジェン物質に対する高感受性のウズラ胚組織の検索

本節では、実験1としてニホンウズラの受精卵内へアンドロジェン物質を投与するにあたり適切な溶媒、投与液量、投与量、投与時期および胚の摘出時期を検討した。実験2では、最適化した投与方法を用いて、アンドロジェン物質に対する高感受性ウズラ胚組織の検索を行った。アンドロジェン物質にはプロピオン酸テストステロン (Testosterone propionate、以降 TP と略) を用いた。TP は以下の化学構造式を有する化合物である (図1)。

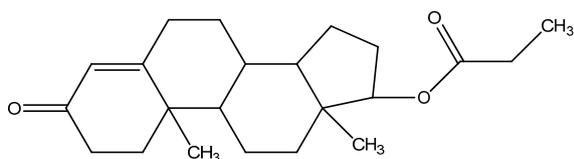


図1. プロピオン酸テストステロンの化学構造式

材料と方法

実験1 被験物質投与方法の検討

(1) 供試卵と孵卵

本実験にはニホンウズラの受精卵を291個供試した。親鳥の飼育環境は14時間明期：10時間暗期の下、飼料と水は自由摂食、自由飲水とした。卵は孵卵器 (株昭和フランキ、東京) を用い、37.5℃で加湿条件下、1回/時間の転卵で孵卵した。なお、孵卵開始日を孵卵0日とし、胚を摘出する孵卵16日 (孵化予定日の前日) まで孵卵を継続した。

(2) 被験物質

TP は和光純薬 (株) (大阪) のロット番号 KLP2023 のものを使用した。また、溶媒検討には、エタノール、アセトン、DMSO (Dimethyl sulfoxide)、コーンオイル (いずれも和光純薬 (株)、大阪) を使用した。

(3) 卵内投与 (*in ovo*) 法

卵に複数回投与することを想定して、投与液の気室内投与を検討した。以下の手順で行った。

- ①消毒用 80%アルコール綿で投与部位（卵殻鈍端部）を消毒後、電動マイクログラインダー（ミニタージェット、浦和工業㈱、埼玉）を用いて、卵殻膜を破らないよう注意しながら直径約 2 mm の小穴を卵殻に開けた。
- ②80%アルコール綿で小穴周辺の卵殻の微粉を除いた。
- ③マイクロピペット（ピペットマン、Gilson Inc, 米国）を用いて、所定量の投与液を採取し、ピペットチップの先で卵殻膜内膜を破らないよう卵殻膜外膜のみを突き破り、気室内に投与液を注入した。
- ④滅菌済み止血パッチ（ブラットバン、祐徳薬品工業㈱、佐賀）を用いて小穴を塞ぎ、塞いだ部位を上にして孵卵器に戻した。

(4) 投与液量の検討

被験物質の高脂溶性（例：TP のオクタノール/水分配係数 $\text{LogPow} = 4.77$ 、米国環境保護局の公開ソフトウェア EPI-Suite により試算）を考慮し、毒性試験分野での汎用溶媒であるエタノール、アセトン、DMSO およびコーンオイルの当該実験系への適用性と至適投与液量を、孵卵 16 日胚の生存性を評価指標に検討した。単回投与は 10、20 および 50 μL /卵/回の液量で、2 日連日投与は孵卵 8 日と 9 日、11 日と 12 日あるいは 12 日と 13 日に 10、15 および 20 μL /卵/日の液量で行い、16 日胚の生存性を評価した。比較対照として、無処理の孵卵 16 日胚の生存性を観察した。

(5) 被験物質投与の至適時期、至適濃度の検討

最適溶媒と考えられたコーンオイル中での TP の溶解性を予備検討した結果、溶解上限が 40,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 付近と考えられたため、TP の 0.25~32,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 液を孵卵 3、6、9、12、13 あるいは 14 日のいずれかに投与し（投与液量：10 または 20 μL /卵）、孵卵 15 日または 16 日における胚の生存性および形態変化（外表および主要臓器の肉眼的変化、一部は組織変化）を観察した。比較対照として、無処理の孵卵 16 日胚を同様に観察した。

実験 2 アンドロジェン物質投与に伴う胚組織構造の変化の解析

(1) 供試卵と被験物投与

供試卵にはニホンウズラの受精卵 133 個を用いた。親鳥の飼育および孵卵の条件は実験 1 と同様とした。被験物質には実験 1 と同じロット番号の TP および溶媒としてコーンオイル

を用いた。孵卵 12 日に卵重量を測定後、卵 1 個あたり 2 度、すなわち孵卵 12 日にコーンオイルと 13 日にコーンオイルまたは TP を投与した。卵内投与法は実験 1 と同様とし、卵は投与後、孵卵器に戻した。

TP 投与液濃度は実験 1 の結果に基づき 2,000 または 20,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とし、コーンオイルを溶媒として、TP の 20,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 液を 3 時間の転倒混和により調製し、2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 液は TP 20,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 液を溶媒で 10 分の 1 に希釈して調製した。投与液は、調製後 1 時間以内に使用した。処理区は表 1 のように対照のコーンオイル投与区も含めて計 3 区とした。

表 1. 各処理区において受精卵に処理されたプロピオン酸テストステロン (TP) の投与量、投与液量、投与液濃度

処理区の 名称	TP 投与量 ($\mu\text{g}/\text{卵}$)		投与液量 ($\mu\text{L}/\text{卵}/\text{日}$)	投与液濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	孵卵 12 日	孵卵 13 日		孵卵 12 日	孵卵 13 日
対照	0 *	0 *	15	0 *	0 *
TP-L	0 *	30	15	0 *	2,000
TP-H	0 *	300	15	0 *	20,000

*)：コーンオイルを投与

TP: Testosterone propionate、溶媒: コーンオイル

(2) 剖検

孵卵 16 日に胚を摘出し、生存胚は CO_2 吸入により屠殺後、外形の異常の有無を観察した後、実体顕微鏡下で胸部および腹部の主要臓器を剖検すると共に、性腺の形態から性判別した。その後、各処理区とも雌雄各 10 例を無作為に抽出し、肝臓、腎臓、精巣または卵巣、尾腺、ファブリキウス嚢およびクロアカを 10% リン酸緩衝ホルマリン液に固定した。

(3) 組織標本の作製

① パラフィン切片の作製

3~5 日間の固定後、定法に従い流水による水洗、70%~100% アルコール系列での脱水およびキシレンでの透徹を経てパラフィン (Tissue Prep、Fisher Scientific 社、米国) に包埋した。包埋したパラフィンプロックをスライディングマイクロトーム (大和光機工業株、埼玉) で 2 μm の切片に薄切し、40°C の温浴により伸展後、スライドガラス (MAS コート、松浪

硝子工業㈱、大阪) に貼付した。

② ヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色

パラフィン切片をキシレンおよび 100%~70%のアルコール系列で脱パラフィンした後、流水で水洗し、脱塩水に浸漬した。Hansen のヘマトキシリン液で 3 分間染色した後、再び流水で 10 分間色出しを行い、脱塩水に浸漬した。30 秒間ほどエオシン液で染色した後、脱塩水で軽く洗浄した。70%~100%のアルコール系列で脱水し、キシレンで透徹した後、標本封入剤 (NEW M・X、松浪硝子工業㈱、大阪) を用いて封入し、光学顕微鏡により標本を観察した。

③ 過ヨウ素酸 Shiff 反応ーヘマトキシリン (PAS-H) 染色

パラフィン切片を②と同じ方法で脱パラフィンした後、流水で水洗し、脱塩水に浸漬した。0.5%過ヨウ素酸水溶液に 10 分間浸漬し、流水で水洗後、Shiff 試薬に 10 分間浸漬した。0.5%ピロ亜硫酸ナトリウム水溶液に 3 分間×3 回浸漬し、流水で 10 分間水洗後、核対比染色を行うため Hansen のヘマトキシリン液で 20 秒間染色した後、流水で色出しを行った。脱塩水に浸漬した後、②と同じ方法で脱水、透徹および封入を行い、光学顕微鏡により標本を観察した。

(4) クロアカ腺の組織構造的変化の定量的解析

クロアカ腺に明らかな変化が認められたため、さらなる観察を行った。すなわち、クロアカ腺は発達あるいは未発達な腺細胞で内腔を覆われた多くの腺単位 (管状構造) から構成されていた。1 切片中における全部の腺単位の数と発達した腺細胞 (細胞の丈が高く細胞質に粘液様物質を有するもの) からなる腺単位の数をカウントし、全腺単位数に対する発達した腺単位の数の割合を算出した。腺単位のカウントと割合の計算は、1 個体の異なる 3 切片から行い、その平均値を当該個体の値とした。

(5) 統計学的処理

対照区と TP 処理区間の有意差検定を行った。全腺単位に対する発達した腺単位の割合について、雌雄ごとに Kruskal-Wallis 検定を行い、差がある場合には Steel の多重比較検定を行った。また、雌雄間の比較を Student の t-検定で行った。さらに、胚の生存率を Fisher

の直接確立計算法で検定した。P<0.05 を有意差ありとした。

結果

実験 1 被験物質投与法の検討

胚発生がみられない無精卵を除く供試受精卵のうち、孵卵 16 日の剖検時に生存していた例を生存胚として、各溶媒の胚の生存性に及ぼす影響を検討した結果、孵卵 16 日胚の生存率は、無処理区、コーンオイルおよび DMSO 投与区で各々 80%以上であったのに対し、エタノール投与区で 30%以下、アセトン投与区で 25%以下であり、エタノールおよびアセトンは胚の生存性を著しく低下させた。DMSO はその刺激臭の孵卵器内への漏出が問題となった。このことから、本研究に用いる溶媒にはコーンオイルを選択した。

コーンオイルを孵卵各日に単回投与した結果、10 および 20 $\mu\text{L}/\text{卵}/\text{回}$ で胚生存率 80%以上、50 $\mu\text{L}/\text{卵}/\text{回}$ で 50%であった。2 日間連日投与では 10 および 15 $\mu\text{L}/\text{卵}/\text{日}$ で胚生存率 75%以上、20 $\mu\text{L}/\text{卵}/\text{日}$ で 50%であった。これらのことから、単回投与では 20 $\mu\text{L}/\text{卵}/\text{回}$ 、2 日間反復投与では 15 $\mu\text{L}/\text{卵}/\text{日}$ までが許容投与液量と考えられた。

コーンオイルに溶解した TP の 0.25~32,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 液を孵卵各日に投与後、孵卵 16 日胚の生存性および形態変化を観察した結果、いずれの濃度区にも胚致死作用は認められず、一方、16,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上かつ孵卵 9 日以降の投与でクロアカ背側部に明らかな肉眼的変化（肥大）がみられた。TP の 16,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 液を孵卵 9~14 日に投与後、孵卵 16 日胚のクロアカ背側部を組織学的に観察したところ、孵卵 13 日に投与した胚のクロアカ腺が最も明確な形態変化を示した。なお、孵卵 15 日胚のクロアカ腺についても同様の組織学的観察を行ったが、胚発生が充分でないためクロアカ腺自体の発生も充分でなく、TP 高濃度投与によるクロアカ腺の有意な変化は発現しなかった。これらのことから、TP の投与は最高濃度を 20,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、投与時期を孵卵 13 日、胚摘出を孵卵 16 日に設定するのが適当であることが示された。

実験 2 アンドロジェン物質投与に伴う胚組織構造の変化の解析

剖検所見

対照（孵卵 12 日と 13 日にコーンオイル）、TP-L（孵卵 12 日にコーンオイルと 13 日に TP 30 $\mu\text{g}/\text{卵}$ ）および TP-H（孵卵 12 日にコーンオイルと 13 日に TP 300 $\mu\text{g}/\text{卵}$ ）の各処理区における孵卵 16 日の剖検の結果、胚の生存率は対照区、TP-L 区および TP-H 区でそれぞれ

92.1%、95.2%および86.8%で、いずれの TP 区も対照区との間に統計学的な有意差はなかった（表 2）。生存胚の外形観察の結果、クロアカ背側部の肥大が TP-H 区の雌雄で認められた（図 2）。その他の処理区の胚に外形の異常はみられなかった。剖検では、いずれの処理区の生存胚にも内臓の異常は認められなかった。

組織学的所見

クロアカ腺はクロアカ背側部の粘膜下組織に存在し、腺の外側はクロアカ背側部の緻密な筋層に達し、内側はクロアカ内腔の粘膜上皮に被われていた。クロアカ腺は発達あるいは未発達な腺細胞で内腔を覆われた多くの腺単位（管状構造）から構成されていた。発達した腺細胞は細胞の丈が高く細胞質に粘液様物質を有していた。未発達な腺細胞では細胞の丈は低く細胞質の粘液様物質も少なかった（図 3）。発達した腺細胞からなる腺単位は TP-H 区の雌雄いずれの胚にも認められ、対照および TP-L 区ではみられなかった。

発達した腺細胞には、強い PAS 陽性反応が細胞質核上部に認められ、HE 染色で認められた粘液様物質の存在部位と一致した。PAS 陽性反応は未発達な腺細胞にも認められたが、その反応物質の反応強度は発達した腺よりも弱かった（図 3）。肝臓、腎臓、精巣または卵巣、尾腺、ファブリキウス嚢には対照区と TP 区との間に組織形態上の差は認められなかった（図 4）。

全腺単位に対する発達した腺単位の割合は、オスでは対照区、TP-L 区および TP-H 区でそれぞれ 0%、0%および 71.3%で、対照区と比較して TP-H 区での発現割合は統計学的に有意に高値であった。メスでは対照区、TP-L 区および TP-H 区でそれぞれ 0%、0%および 55.4%と、オスと同様に TP-H 区での発現割合が有意に高値であった。また、各 TP 濃度区内でその割合の雌雄間の比較を行ったところ、いずれの処理区にも有意差はなかった（表 3）。

表 2. 対照区およびプロピオン酸テストステロン (TP) 区のウズラ胚の生存率

処理区	使用した 受精卵数	孵卵 16 日の生存胚数		生存率 (%) ^{a)}
		オス	メス	
対照	38	17	18	92.1
TP-L	42	23	17	95.2
TP-H	53	26	20	86.8

^{a)} 孵卵 16 日の生存胚数 / 使用した受精卵数 × 100

各区の間で胚の生存率に有意差なし (Fisher の直接確立計算法)。

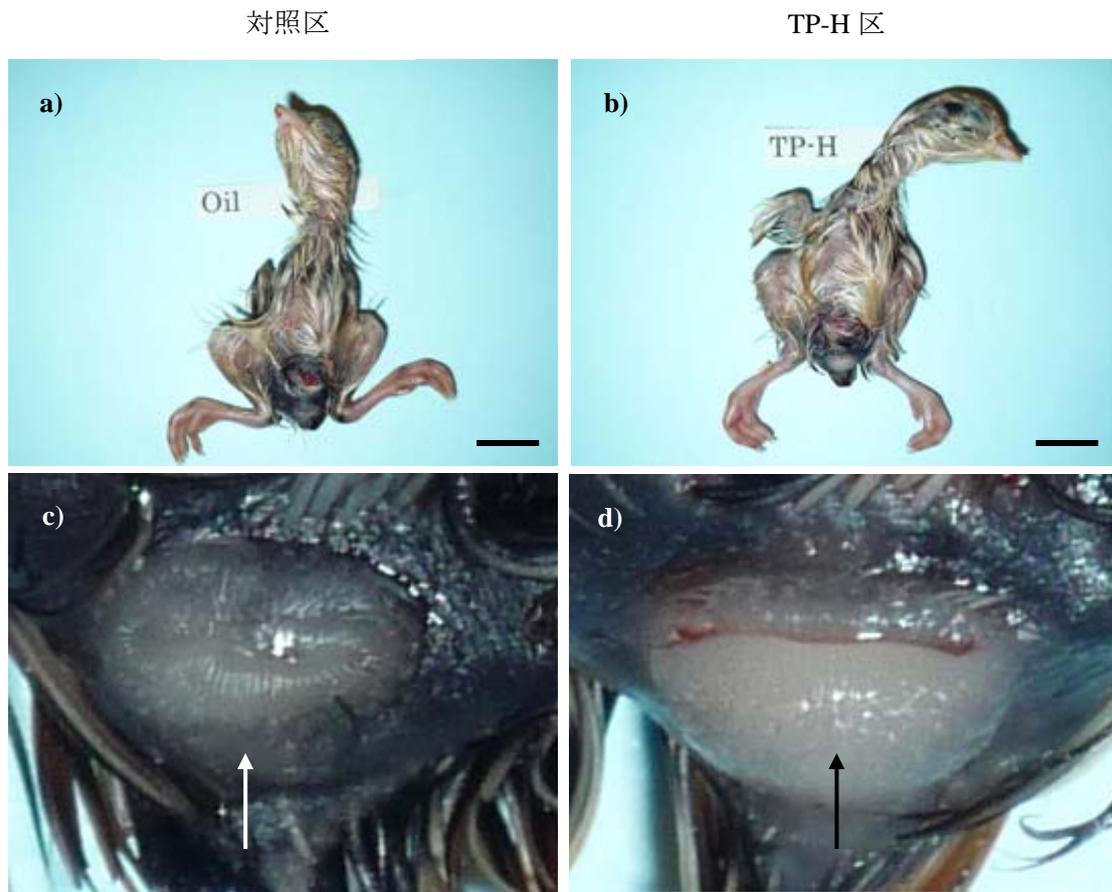


図2. ウズラ胚およびクロアカ腺部のマクロ像

a, c: 対照区の胚（オス）、b, d: TP-H 区の胚（オス）、a, b: 弱拡大像、c, d: クロアカの拡大像。

対照区(c)に比べ TP-H 区(d)のクロアカ背側部が肥大している（矢印）。スケールバーは 1 cm を示す。

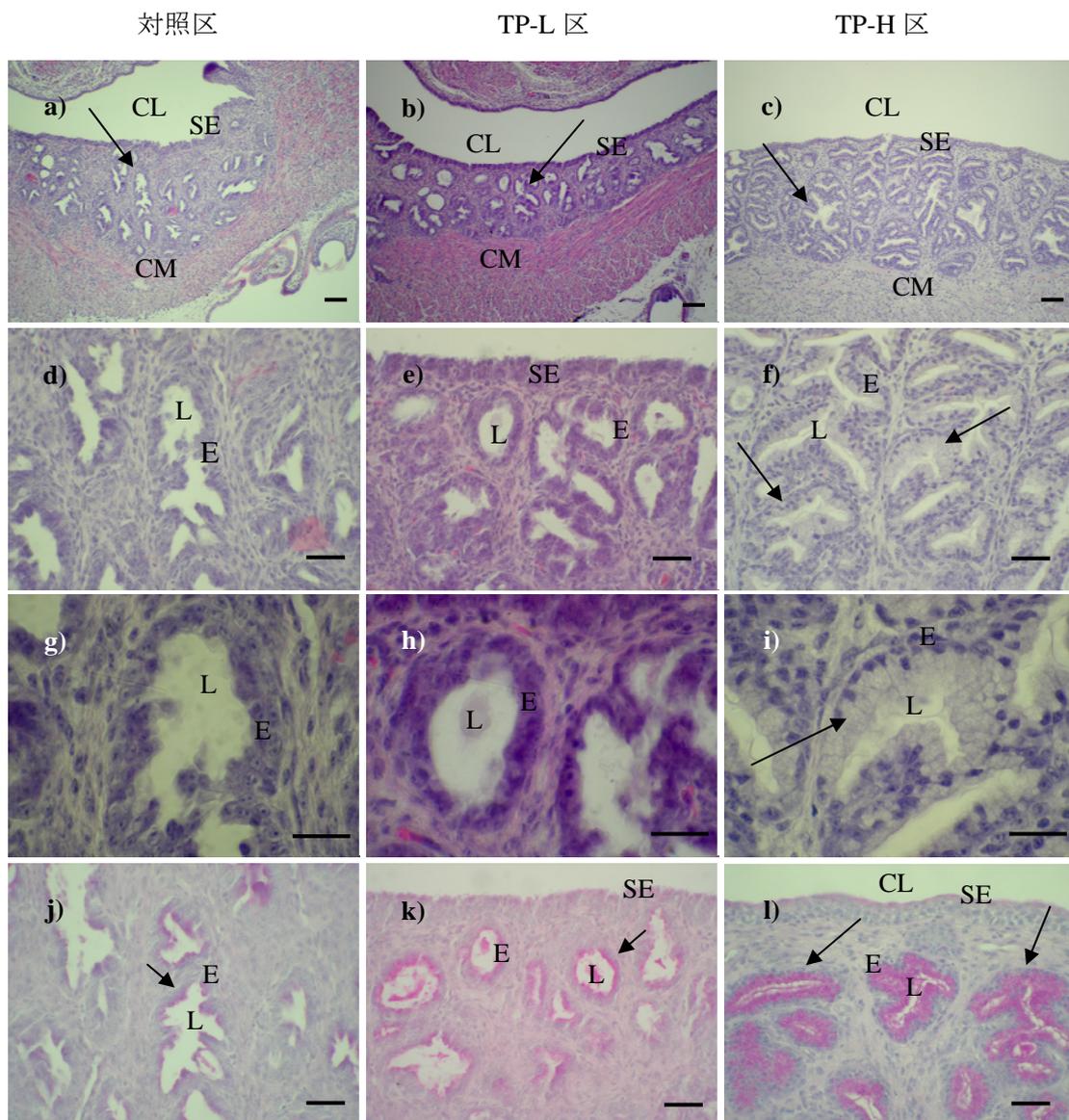


図 3. 対照（コーンオイル）およびプロピオン酸テストステロン（TP）を投与したウズラ胚のクロアカ腺の組織像

a~i: HE 染色像、j~l: PAS-H 染色像。a, d, g, j: 対照区、b, e, h, k: TP-L 区、c, f, i, l: TP-H 区。

a~c: 低倍率像。矢印は腺単位（管状構造）の例。TP-H 区(c)で腺単位は対照区(a)や TP-L 区(b)より発達している。

d~f: 腺単位の拡大像。腺単位は腺細胞で内腔を覆われている。発達した腺細胞は細胞の丈が高く細胞質に粘液様物質を有している（TP-H 区(f)の矢印）。対照区(d)の細胞の丈は低い。

g~i: 腺単位の高倍率像。対照区(g)に比べて TP-H 区(i)（矢印）では細胞の丈は高く粘液様物質がある。

j~l: HE 染色で認められた粘液様物質の存在部位と PAS 陽性反応が一致する（TP-H 区(l)の長い矢印）。PAS 陽性物質の量は対照区(j)および TP-L 区(k)で少ない（短い矢印）。

CL = クロアカ腔、CM = クロアカ背側筋、E = クロアカ腺上皮、L = クロアカ腺腔、SE = 粘膜上皮。スケールバーは a~c は 70 μ m、d~f は 30 μ m、g~i は 20 μ m、j~l は 30 μ m を示す。

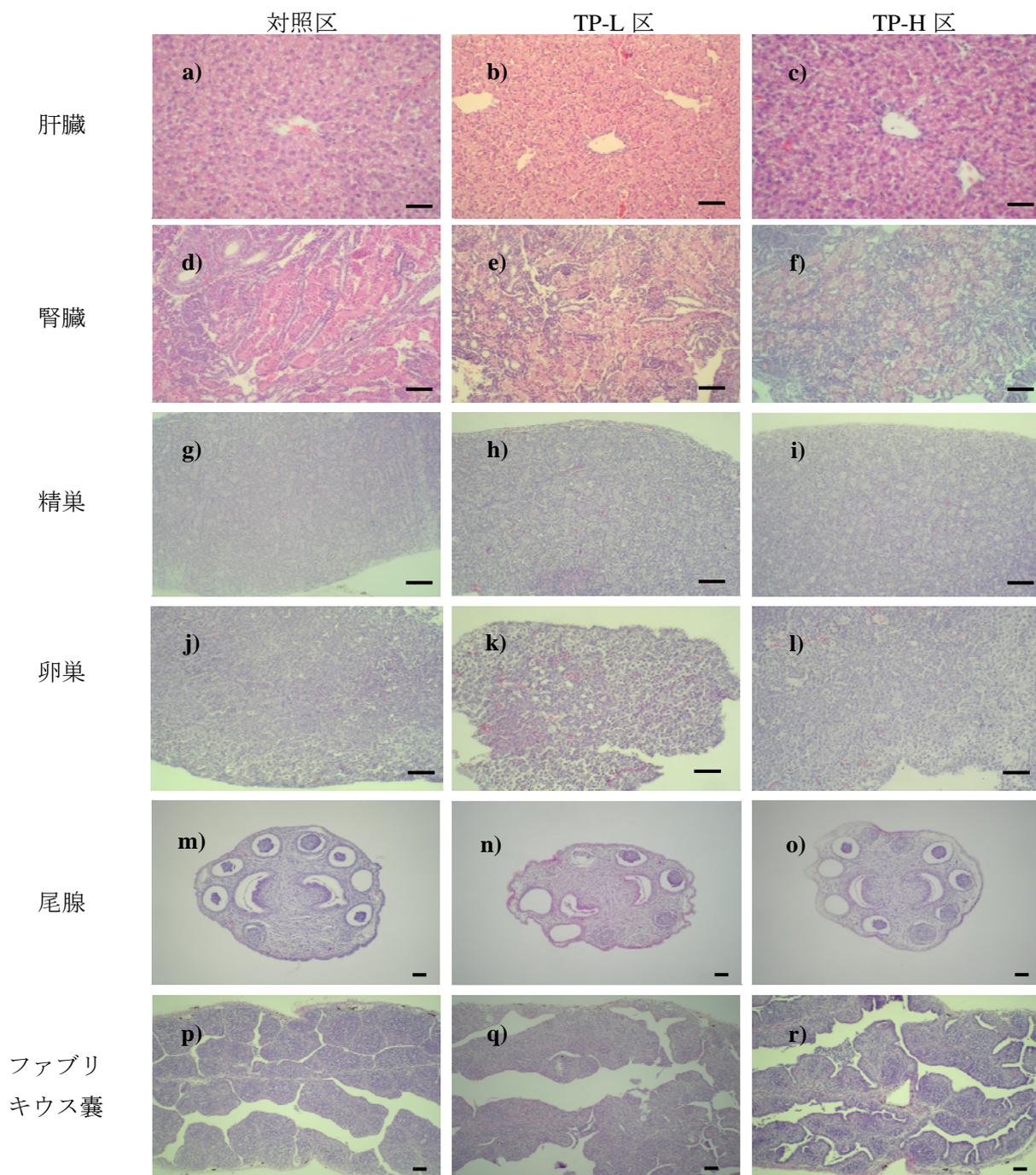


図 4. 対照（コーンオイル）およびプロピオン酸テストステロン（TP）を投与したウズラ胚の各種臓器の組織像

a, d, g, j, m, p: 対照区、b, e, h, k, n, q: TP-L 区、c, f, i, l, o, r: TP-H 区。

いずれの臓器にも対照区と TP 処理区との間に組織形態上の変化の差は認められない。

スケールバーは a~l は 60 μ m、m~r は 70 μ m を示す。HE 染色。

表 3. 対照区およびプロピオン酸テストステロン (TP) 区のウズラ胚クロアカ腺における発達した腺単位の割合

処理区	発達した腺単位の割合 (%)	
	オス	メス
対照	0	0
TP-L	0	0
TP-H	71.3 ± 17.2 **	55.4 ± 22.1 **

数値は平均値 ± SD (n = 10)。

(発達腺単位数 / 総腺単位数 × 100)

対照区と TP 処理区の間で全腺単位に対する発達した腺単位の割合について、雌雄ごとに Kruskal-Wallis 検定を行い、差がある場合には Steel の多重比較検定を行った。また、雌雄間の比較を Student の t-検定で行った。P < 0.05 を有意差ありとした。

**：対照区との間に有意差あり (P < 0.01)。

第 2 節 アンドロジェンおよび抗アンドロジェン物質投与に伴うクロアカ腺の組織構造的変化の定量的解析

第 1 節で、ニホンウズラではクロアカ腺が他の組織よりアンドロジェンに対して高感度に反応して、組織の発達を示すことが明らかとなった。哺乳類では酢酸シプロテロン (Neumann and Berswordt-Wallrabe, 1966) が抗アンドロジェン作用を有することが知られている。酢酸シプロテロン (Cyproterone acetate、以降 CA と略) は以下の化学構造式を有する化合物である (図 5)。

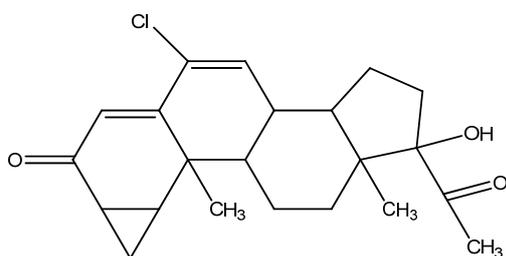


図 5. 酢酸シプロテロンの化学構造式

CA はアンドロジェン受容体に結合して内因性アンドロジェンの作用を競合的に抑制する。本節では、ウズラ胚のクロアカ腺の発達を指標とした化学物質のアンドロジェンおよび抗アンドロジェン作用の評価法を検討することを目的とした。このため、受精卵にプロピオン酸テストステロン (TP) および抗アンドロジェン作用がある CA を投与してクロアカ腺の発達を定量的に解析した。

材料と方法

(1) 供試卵と被験物質投与

ニホンウズラの受精卵を 93 個供試した。親鳥の飼育および孵卵の条件は第 1 節と同様とした。孵卵 12 日に卵重量を測定後、孵卵 12 日に CA、13 日に TP を投与した。卵内投与法は第 1 節と同様とし、卵は投与後、孵卵器に戻した。CA にはシグマアルドリッチジャパン (株) (東京) のロット番号 034K1068 のものを使用した。また、第 1 節と同じロット番号の TP および溶媒としてコーンオイルを用いた。

投与液を調製するには、コーンオイルを溶媒として、CA の 5,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 投与液を 3 時間の転倒混和により溶解調製し、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 投与液は CA 5,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度液を溶媒で 10 分の

1に希釈して調製した。TPは第1節と同様に調製した。投与液は、調製後1時間以内に使用した。

CAの投与液濃度はコーンオイルへの溶解性の予備検討の結果に基づき、その溶解上限付近を最高濃度とし、CAの最終濃度を500または5,000 µg/mLに調整した。処理区の構成は以下の表4のように比較対照のTP-H区も含め計3区とした。

表4. 各処理区において受精卵に処理されたプロピオン酸テストステロン (TP) および酢酸シプロテロン (CA) の投与量、投与液量、投与液濃度

処理区の 名称	投与量 (µg/卵)		投与液量 (µL/卵/日)	投与液濃度 (µg/mL)	
	孵卵 12 日	孵卵 13 日		孵卵 12 日	孵卵 13 日
TP-H	0 *	TP 300	15	0 *	TP 20,000
CA-L + TP-H	CA 7.5	TP 300	15	CA 500	TP 20,000
CA-H + TP-H	CA 75	TP 300	15	CA 5,000	TP 20,000

*)：コーンオイルを投与

TP: Testosterone propionate、CA: Cyproterone acetate、溶媒: コーンオイル

(2) 剖検と組織標本の作製

孵卵 16 日に第 1 節と同様に屠殺、剖検および性判別後、各処理区とも雌雄各 10 例を無作為に抽出し、肝臓、腎臓、精巣または卵巢、尾腺、ファブリキウス嚢およびクロアカを 10%リン酸緩衝ホルマリン液で 3~5 日間固定した。その後、第 1 節と同様に厚さ 2 µm のパラフィン切片を作製した。これに、HE 染色と PAS 反応-ヘマトキシリン (PAS-H) 染色を施した。

(3) クロアカ腺の組織構造的変化の定量的解析と統計学的処理

第 1 節と同様にクロアカ腺の全腺単位の数に対する発達した腺単位の数の割合を算出した。TP-H 区と CA 処理区との有意差検定を第 1 節と同様に行った。

結果

剖検所見

各処理区における孵卵 16 日の剖検の結果、胚の生存率は TP-H 区、CA-L + TP-H 区および CA-H + TP-H 区でそれぞれ 86.8%、89.7%および 79.6%で、いずれの CA 区も TP-H 区との間に統計学的な差はなかった（表 5）。生存胚の外形観察の結果、クロアカ背側部の肥大が TP-H 区の雌雄に認められた。その他の処理区の胚に外形の異常はみられなかった。剖検では、いずれの処理区の生存胚にも内臓の異常は認められなかった。

組織学的所見

CA 投与の有無やその濃度にかかわらず、全処理区の胚において、細胞の丈が高く細胞質に粘液様物質を有する発達した腺構造が認められた。腺単位の発達は TP-H 区、CA-L + TP-H 区および CA-H + TP-H 区の雌雄いずれの胚にも認められた。PAS 陽性反応が細胞質核上部に認められたが、その反応物質の反応強度は TP-H 区に比べ CA 区で弱かった（図 6）。クロアカ腺以外の肝臓、腎臓、精巣または卵巣、尾腺、ファブリキウス嚢には TP-H 区と CA を投与した区との間に組織形態上の変化の差はなかった。

全部の腺単位に対する発達した腺単位の割合は、オスでは TP-H 区、CA-L + TP-H 区および CA-H + TP-H 区でそれぞれ 71.3%、39.4%および 28.9%で、TP-H 区と比較して CA の投与区で統計学的に、また、用量依存的に有意な低値であった。メスでは TP-H 区、CA-L + TP-H 区および CA-H + TP-H 区でそれぞれ 55.4%、25.4%および 16.1%と、オスと同様に CA の投与区で統計学的に、また、用量依存的に有意な低値であった。また、その割合の雌雄間の比較を行ったところ、CA-L + TP-H 区で雌の方が有意に低値であった（表 6）。

表 5. プロピオン酸テストステロン (TP) 区および酢酸シプロテロン (CA) 区のウズラ胚の生存率

処理区	使用した 受精卵数	孵卵 16 日の生存胚数		生存率 (%) ^{a)}
		オス	メス	
TP-H	53	26	20	86.8
CA-L + TP-H	39	16	19	89.7
CA-H + TP-H	54	21	22	79.6

^{a)} 孵卵 16 日の生存胚数 / 使用した受精卵数 × 100

各区の間で胚の生存率に有意差なし (Fisher の直接確立計算法)。

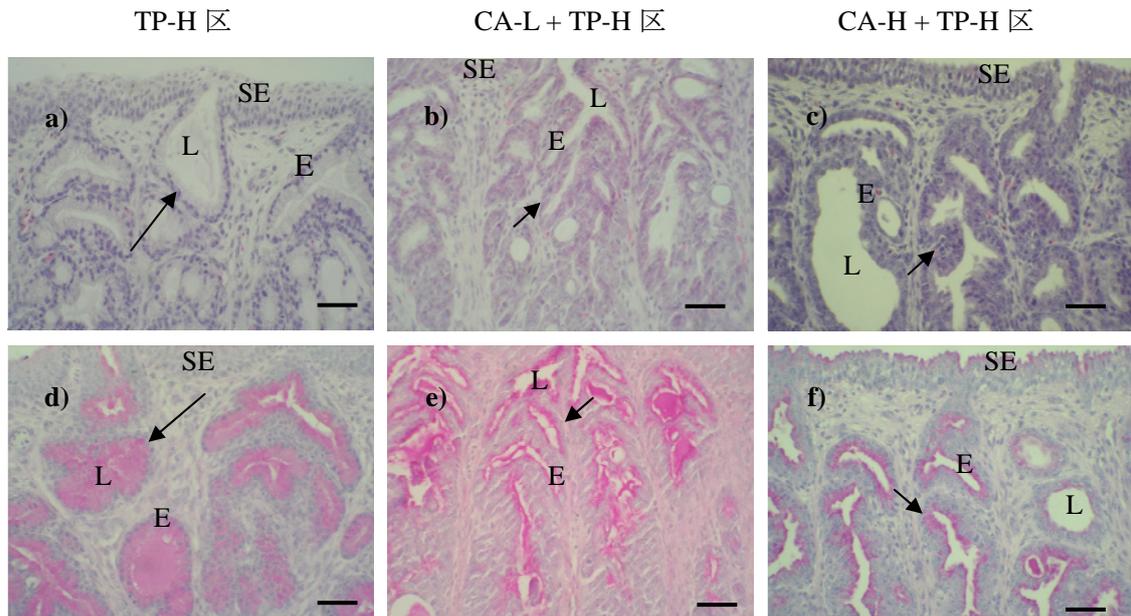


図 6. プロピオン酸テストステロン (TP) あるいは酢酸シプロテロン (CA) を投与したウズラ胚のクロアカ腺の組織像

a, d: TP-H 区、b, e: CA-L + TP-H 区、c, f: CA-H + TP-H 区。

a~c: HE 染色像。TP-H 区(a)の腺細胞の多くは発達した腺細胞（細胞の丈が高く細胞質に粘液様物質を有す、矢印）で、CA 投与区(b, c)の腺単位は未発達な腺（細胞の丈が低く細胞質の粘液様物質も少ない、短い矢印）も認められる。

d~f: PAS-H 染色像。PAS 陽性反応が細胞質核上部に認められるが、その反応物質の量は TP-H 区(d)に比べ CA-L + TP-H 区(e)および CA-H + TP-H 区(f)で少ない。

E = クロアカ腺上皮、L = クロアカ腺腔、SE = 粘膜上皮。スケールバーは 30 μm を示す。

表 6. プロピオン酸テストステロン (TP) 区および酢酸シプロテロン (CA) 区のウズラ胚クロアカ腺における発達した腺単位の割合

処理区	発達した腺単位の割合 (%)	
	オス	メス
TP-H	71.3 ± 17.2	55.4 ± 22.1
CA-L + TP-H	39.4 ± 12.8 ##	25.4 ± 14.2 # +
CA-H + TP-H	28.9 ± 27.8 ##	16.1 ± 13.2 ##

数値は平均値 ± SD (n = 10)。

(発達腺単位数 / 総腺単位数 × 100)

TP-H 区と CA 処理区の間で全腺単位に対する発達した腺単位の割合について、雌雄ごとに Kruskal-Wallis 検定を行い、差がある場合には Steel の多重比較検定を行った。また、雌雄間の比較を Student の t-検定で行った。P < 0.05 を有意差ありとした。

#, ##: TP-H 区との間に有意差あり (P < 0.05, 0.01)。

+: 雌雄間に有意差あり (P < 0.05)。

第3節 クロアカ腺におけるアンドロジェン受容体発現の解析

アンドロジェンや抗アンドロジェン物質が作用発現するためには、標的組織にアンドロジェン受容体 (AR) が発現しなければならない。第2節までに、12日胚に抗アンドロジェン物質の酢酸シプロテロン (CA)、13日胚にプロピオン酸テストステロン (TP) を投与すると、クロアカ腺の肥大とその抑制が認められた。この作用が AR を介することを示すために、12日および13日胚のクロアカ腺に AR が既に発現することを実証する必要がある。

本節では、アンドロジェンおよび抗アンドロジェン物質投与によってクロアカ腺が組織構造的に変化するメカニズムの一つとして、AR の関与を明らかにするため、RT-PCR 法による AR mRNA 発現の解析を行った。実験1では、12日胚と被験物質を投与した16日胚のクロアカ腺および背側筋層などを含むクロアカ背側部全組織、対照組織としてのファブリキウス嚢、肝臓および腎臓の各種臓器における AR mRNA 発現を解析した。実験2では AR mRNA がクロアカ腺上皮に発現することを実証するため、レーザーマイクロダイセクションにより得たクロアカ腺上皮組織を用いて解析した。

材料と方法

ニホンウズラの受精卵はクウェールコスモス社 (愛知) から購入した 207 個を供試した。孵卵の条件および卵内投与 (*in ovo*) 法は第1節と同様とした。

TP は東京化成工業 (株) (東京) のロット番号 Y5VLF の、CA はシグマアルドリッチジャパン (株) (東京) のロット番号 025K1270 のものを使用した。溶媒にはコーンオイルを用いた。各処理区における被験物質の投与量を表7に示す。

表7. 各処理区において受精卵に処理されたプロピオン酸テストステロン (TP) および酢酸シプロテロン (CA) の投与量、投与液量、投与液濃度

処理区の 名称	投与量 (μg/卵)		投与液量 (μL/卵/日)	投与液濃度 (μg/mL)	
	孵卵 12 日	孵卵 13 日		孵卵 12 日	孵卵 13 日
対照	0 *	0 *	15	0 *	0 *
TP-H	0 *	TP 300	15	0 *	TP 20,000
CA-H + TP-H	CA 75	TP 300	15	CA 5,000	TP 20,000

*) : コーンオイルを投与

TP: Testosterone propionate、CA: Cyproterone acetate、溶媒: コーンオイル

孵卵 12 日胚では、被験物質を投与しない無処理（対照）の組織を用いた。孵卵 16 日胚では、対照区、TP-H 区および CA-H + TP-H 区の計 3 区の組織を採取した。孵卵 12 日または 16 日に胚は、第 1 節と同様に屠殺、剖検および性別判別した。

実験 1 における各種臓器での AR mRNA 解析用に孵卵 12 日胚は雌雄別にクロアカ腺部（クロアカ腺および背側筋層などを含むクロアカ背側部全組織）、ファブリキウス嚢、肝臓および腎臓を、孵卵 16 日胚は各処理区とも雌雄別にクロアカ腺部をそれぞれ採取し、使用まで -80°C で冷凍保存した。なお、実体顕微鏡下ではクロアカ腺と他の組織とを分離できなかったため、クロアカ腺部はこれら組織を含むものとした。解析には、サンプリングした各組織の 4~5 個体分をまとめて 1 サンプルとし、各処理区とも雌雄別に 4 サンプルを供試した。

実験 2 でのクロアカ腺上皮における AR mRNA 発現解析では、レーザーマイクロダイセクション法に供試するため、孵卵 12 日胚および孵卵 16 日胚の対照区の雌雄各 2 例を無作為に抽出して、クロアカ腺部を凍結切片作製用包埋剤（ティシュー・テック O.C.T コンパウンド、サクラファインテックジャパン(株)、東京）に包埋し、使用まで -80°C で保存した。

実験 1 各種臓器での AR mRNA 解析

(1) total RNA の抽出

各組織は解凍後、50~100 mg に切り出し、セパゾール RNA I Super（ナカライテスク(株)、京都）を 1 mL 加えた 2 mL 容量のマイクロチューブに加えた。マイクロチューブは氷の中で冷却させながら、RNase AWAY（Molecular BioProducts, Inc.、San Diego、米国）をスプレーしたホモジナイザー（Kinematica AG, Luzern Switzerland）で組織片をホモジナイズした。

室温で 5 分間転倒混和した後、クロホルムを 200 μL 加え 3 分間静置後、高速冷却遠心機 PS-18W（株トミー精工、東京）で 4°C 冷却のもと 14,000 g で 10 分間遠心分離を行った。上層（水層）と下層（フェノール層）に分離され、水層から 500 μL を別のマイクロチューブに移し、イソプロパノール 500 μL を加えた後、室温で 10 分間転倒混和した。その後、 4°C 冷却のもと 14,000 g で 10 分間遠心分離を行い、上澄みを取り除き、得られた沈殿物に 75% エタノールを 1 mL 加えて、さらに 4°C 冷却のもと 14,000 g で 5 分間遠心分離を行った。

上澄みを取り除き、得られた沈殿物（RNA）をエタノールが除去される程度に乾燥させた。最後に、沈殿物（RNA）を約 50~150 μL の TE 緩衝液（0.01M Tris-HCl、pH 8.0、1 mM EDTA）で溶解させ、使用まで -80°C で保存した。

(2) DNase 処理

サンプルは解凍後、Gene Quant pro RNA/DNA Calculator (Gene Quant 社、英国) を用いて 260 nm の波長で total RNA 濃度を測定した。その後、サンプル中の DNA 混入の可能性を排除するため、DNase 処理を行った。反応液 10 μ L 中の組成は以下の通りとした: RNA sample 1 μ g、RNase-free DNase I (Promega 社、WI、米国) 1 μ L、DNase 10 \times Reaction Buffer (Promega 社、WI、米国) 1 μ L、H₂O で反応液の総量を 10 μ L になるよう調整した。この反応液を Programmable Thermal Controller PTC-100TM (MJ Research Inc.、MA. 米国) を用いて 37 $^{\circ}$ C で 30 分間、65 $^{\circ}$ C で 10 分間処理した。

(3) Reverse Transcript (RT)

サンプルの total RNA を用いて相補的 DNA (cDNA) を作製するため、ReverTraAce- α TM キット (TOYOBO Ltd, 大阪) を用いて RT を行った。反応液 10 μ L 中の組成は以下の通りとした: 5 \times RT Buffer 2.0 μ L、dNTP mixture 1.0 μ L、RNase inhibitor 0.5 μ L、Primer oligo(Oligo dT 20) 0.5 μ L、Rever Trance Ace(RT Ace) 0.5 μ L、total RNA sample 5.5 μ L。

次いで、Programmable Thermal Controller PTC-100TM を用いて、42 $^{\circ}$ C で 30 分間、99 $^{\circ}$ C で 10 分間、4 $^{\circ}$ C で 5 分間のプログラムで逆転写を行い、cDNA を作製した。

(4) Polymerase Chain Reaction (PCR) 増幅

RT によって作製した cDNA をテンプレートとして、TaKaRa TaqTM キット (TAKARA CO.Ltd、三重) を用いて以下の濃度配分になるよう反応液を調製した: 10 \times PCR Buffer 2.5 μ L、dNTP mixture 2.0 μ L、TaKaRa Taq 0.125 U、H₂O 18.875 μ L、Primer-F 10 μ Mol 0.5 μ L、Primer-R 10 μ Mol 0.5 μ L、cDNA sample 0.5 μ L。

PCR の反応条件は、はじめの熱変性 94 $^{\circ}$ C で 1 分間の後、熱変性 94 $^{\circ}$ C で 30 秒間、アーニリング 58 $^{\circ}$ C で 30 秒間および伸長反応 72 $^{\circ}$ C で 1 分間のサイクルを 35 サイクル、サイクル終了後の伸展反応 72 $^{\circ}$ C で 10 分間というプログラムで行った。各プライマーの塩基配列は次の通りであった。

AR プライマー (Acc # ; AB18828, Nakamura *et al.*, 2008)

Forward: 5'-AGATCACACCCCAGGAGTTTC-3'

Reverse: 5'- TGGTGAGCTGGTAAAATCGTC -3'

β アクチンプライマー (Wilaison and Mori, 2009)

Forward: 5'- ACAATCGTACCCTGGCATTGCT -3'

Reverse: 5'- TCGTCTTGTTTTATGCGCATT -3'

(5) アガロース電気泳動

PCR 増幅後、Mupid-2 電気泳動槽 (ADVANCE CO. Ltd、東京) 内の TBE 緩衝液中で 2% アガロースゲルを用い 28 分間電気泳動した。その後、トランスイルミネーター NTM-10 (フナコシ(株)、東京) を用いて写真撮影した。

実験 2 レーザーマイクロダイセクションにより採取したクロアカ腺上皮の AR mRNA 解析

(1) 凍結組織標本の作製

凍結切片作製用包埋剤 (ティッシュ・テック O.C.T コンパウンド、サクラファインテックジャパン(株)、東京) に包埋した凍結ブロックを凍結マイクロトーム (CM3050S、ライカマイクロシステムズ(株)、東京) で 10 μm の切片に薄切し、フویل付スライドガラス (90FOIL-SL25、ライカマイクロシステムズ(株)、東京) 1 枚につき 2 切片を貼付した。1 個体から可能な限りの凍結切片標本を作製した。切片は使用まで -80℃ で保存した。

(2) レーザーマイクロダイセクション

① トルイジンブルー染色

凍結切片を氷冷したエタノール/酢酸 = 19 : 1 溶液に 3 分間浸漬し固定後、RNase-free 氷冷水で 1 分間水洗し、0.05% トルイジンブルー溶液で 30 秒間染色した。その後、RNase-free 氷冷水で 1 分間水洗を 2 度行い、ドライヤーの冷風により乾燥させた。乾燥後、切片標本は直ちにレーザーマイクロダイセクションに供した。

② レーザーマイクロダイセクション法

レーザーマイクロダイセクションシステム (Leica AS LMD system、ライカマイクロシステムズ(株)、東京) を用いた。切り取った組織からの RNA 抽出には DNase 処理を連続して行う専用キット (RNeasy Micro Kit 74004、(株)キアゲン、東京) を使用した。乾燥させた切

片標本中のクロアカ腺単位をレーザー光の照射で切り取る操作で、当システムにセットした 0.5 mL 容量のマイクロチューブ中のキット付属 Buffer RLT の 50 μ L に 1 個体分のクロアカ腺単位を回収した。なお、1 切片標本からの組織切取りは 30 分間以内とした。サンプルは使用まで -80°C で保存した。

(3) total RNA の抽出と DNase 処理

各サンプルは解凍後、 β -メルカプトエタノール 3.5 μ L およびキット付属のキャリアー RNA(poly-A)20 ng を加え、Buffer RLT で総容量 350 μ L にし、15 秒間スピンドウンした。その後、キットの指示に従って、DNase I 処理し、精製 RNA サンプルを得た。RNA サンプルには RNase-free の水に溶解し、分光光度計 (Nano Drop ND-1000、(株)バイオメディカルサイエンス、東京) を用いて 260 nm の波長で濾液サンプル 2 μ L 中の total RNA 濃度を測定した。

(4) Reverse Transcript (RT)

濾液サンプル中の total RNA 濃度を測定した結果、いずれのサンプルも 10 ng/ μ L 程度と低濃度であったため、total RNA サンプルとしてはいずれの個体ともほぼ全量である 10 μ L の濾液を RT に用いた。RT 反応液の組成は以下の通りとし、実験 1 の各種臓器での逆転写と同じ条件で RT を行った: 5 \times RT Buffer 2.0 μ L、dNTP mixture 1.0 μ L、RNase inhibitor 0.5 μ L、Primer oligo(Oligo dT 20) 0.5 μ L、Rever Trance Ace(RT Ace) 0.5 μ L、total RNA sample 10 μ L。

(5) Polymerase Chain Reaction (PCR) 増幅と電気泳動

実験 1 の各種臓器での解析と同様に PCR 増幅とアガロース電気泳動を行った。

結果

実験 1 各種臓器における AR mRNA 発現の解析

孵卵 12 日胚

AR の mRNA 発現を示す約 190 bp のバンドが雌雄ともクロアカ腺部、ファブリキウス囊および腎臓において認められたが、肝臓にはバンドはみられなかった。一方、 β アクチンの発現を示すバンドは肝臓を含めた全ての組織で認められた (図 7)。

孵卵 16 日胚

対照区、TP-H 区および CA-H + TP-H 区の雌雄いずれのクロアカ腺部にも、AR の mRNA 発現を示す約 190 bp のバンドが認められた。β アクチンの発現を示すバンドは雌雄いずれのクロアカ腺部にも認められた (図 8)。

実験 2 レーザーマイクロダイセクションにより採取したクロアカ腺上皮の AR mRNA 発現の解析

孵卵 12 日胚

レーザーマイクロダイセクションによりクロアカ腺上皮組織だけを採取することができた (図 9)。採取したクロアカ腺上皮細胞において、AR の mRNA 発現を示す約 190 bp のバンドが雌雄ともに認められた。β アクチンの発現を示すバンドも雌雄いずれのクロアカ腺上皮細胞に認められた (図 10)。

孵卵 16 日胚

雌雄のクロアカ腺において、AR の mRNA 発現を示す約 190 bp のバンドが認められた。β アクチンの発現を示すバンドも雌雄のクロアカ腺上皮細胞に認められた (図 10)。

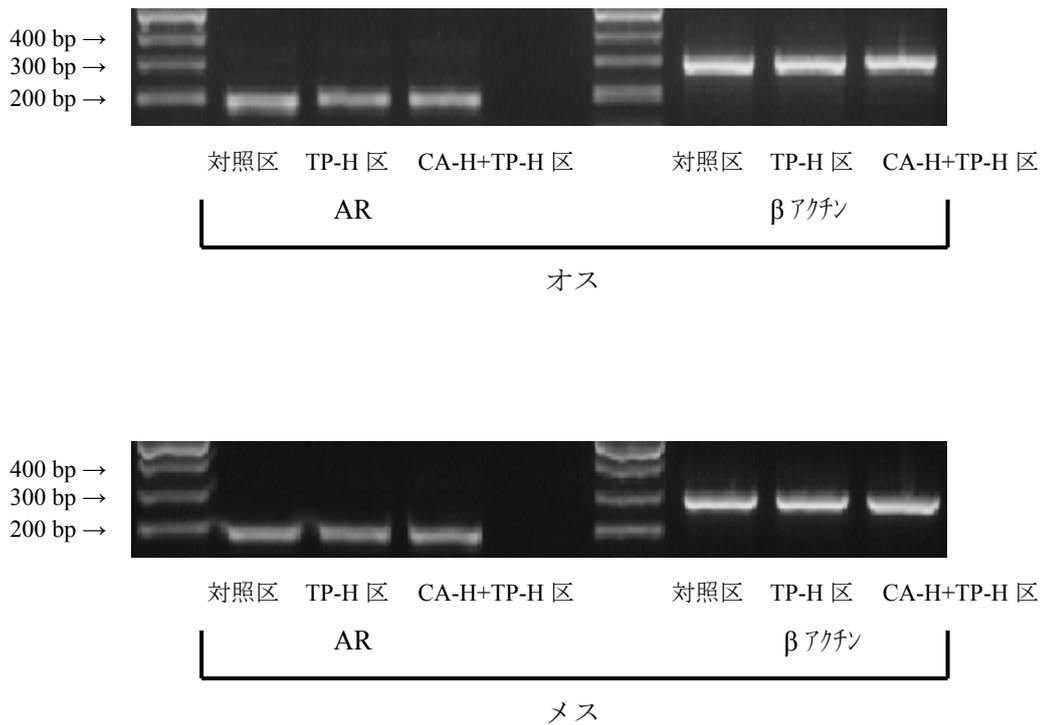


図 8. 対照（コーンオイル）、プロピオン酸テストステロン（TP）または酢酸シプロテロン（CA）を投与した孵卵 16 日ウズラ胚のクロアカ腺部におけるアンドロジェン受容体（AR） mRNA 発現の RT-PCR 解析

対照区、TP-H 区および CA-H + TP-H 区の雌雄いずれのクロアカ腺部にも、AR の mRNA 発現を示す約 190 bp のバンドが認められる。

β アクチンの発現を示すバンドが雌雄いずれのクロアカ腺部にも認められる。

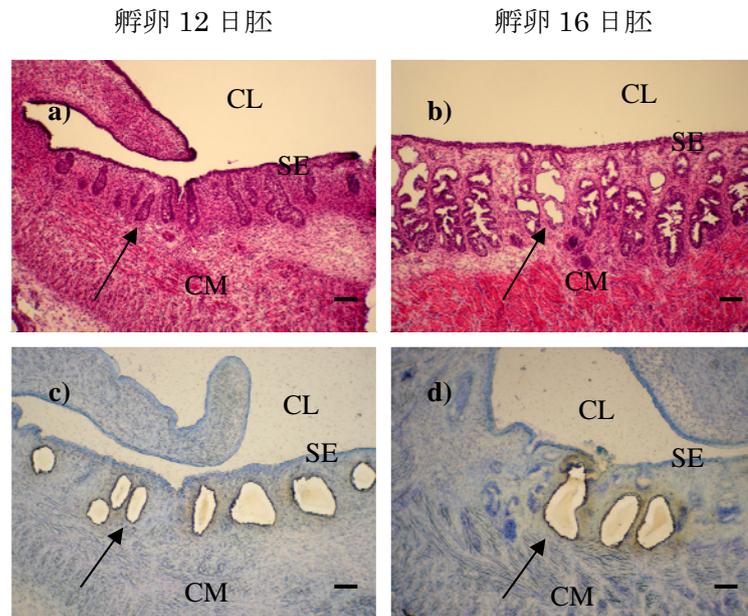


図9. 孵卵12日の無処理区および孵卵16日の対照（コーンオイル）区のウズラ胚クロアカの、レーザーマイクロダイセクションの組織像

a, c: 孵卵12日胚、b, d: 孵卵16日胚。

a, b: HE染色像。矢印は腺単位（管状構造）の例。孵卵12日胚の腺構造は少ない。

c, d: トルイジンブルー染色像。レーザーマイクロダイセクションで腺単位を切り取った痕（矢印）。

CL = クロアカ腔、CM = クロアカ背側筋、SE = 粘膜上皮。スケールバーは70 μmを示す。

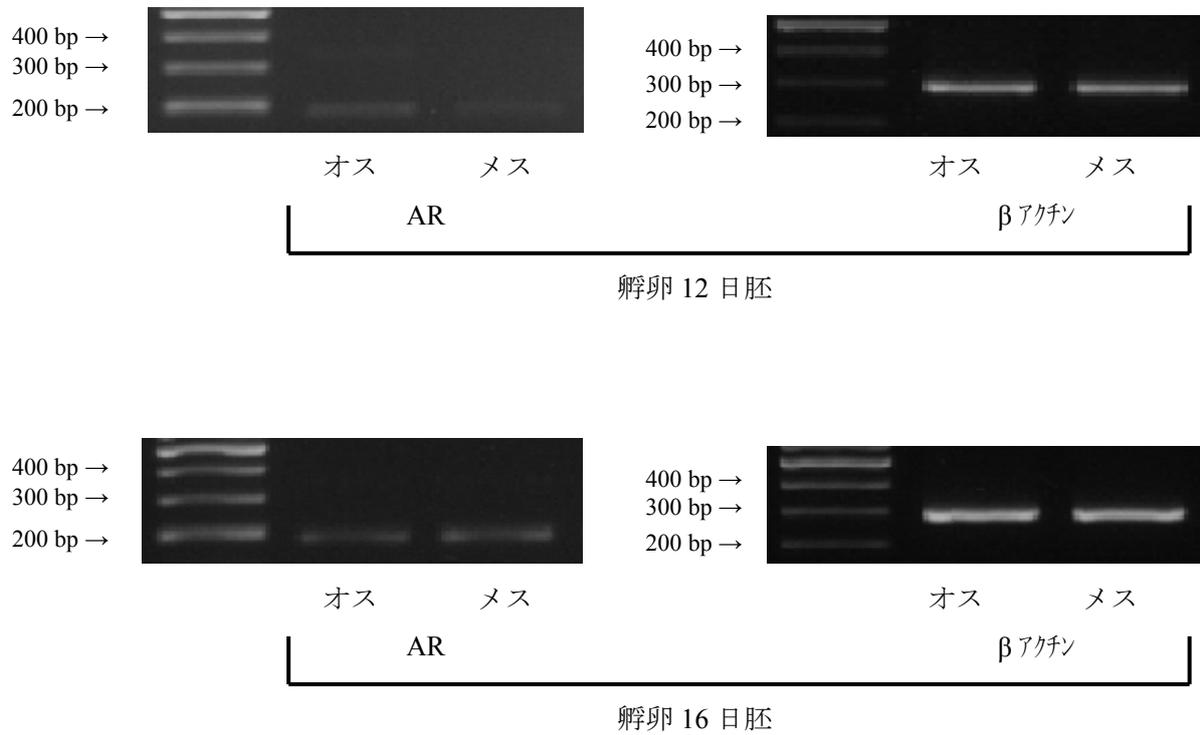


図 10. 孵卵 12 日および 16 日ウズラ胚のレーザーマイクロダイセクションで切り取ったクロアカ腺上皮細胞におけるアンドロゲン受容体 (AR) mRNA 発現の RT-PCR 解析

孵卵 12 日胚および 16 日胚の雌雄いずれのクロアカ腺上皮細胞にも、AR の mRNA 発現を示す約 190 bp のバンドが認められる。

β アクトリンの発現を示すバンドが雌雄いずれのクロアカ腺上皮細胞に認められる。

第4節 クロアカ腺におけるトランスフォーミング成長因子- β 発現の解析

第2節でアンドロジェンを投与すると、クロアカ腺上皮の丈の伸長を伴い細胞質内に粘液様物質が出現するという細胞分化が認められ、これに抗アンドロジェン物質を投与すると、この変化が抑制されることが示された。第3節では12日胚からアンドロジェン受容体がクロアカ腺上皮に発現することが明らかとなったため、アンドロジェンのクロアカ腺上皮細胞の分化誘導はこの受容体を介するものと考えられる。しかし、アンドロジェンが受容体と結合した後に、その下流で細胞分化を誘導する要因は明らかではない。トランスフォーミング成長因子- β (TGF- β) は、多機能性のサイトカインで生体内に広く発現する。鳥類ではTGF- β 2、TGF- β 3 および TGF- β 4 の3分子が同定されている。これらは胚の形態形成 (Levin, 1998) や性腺の機能調節 (Thurston and Korn, 2000 ; Onagbesan *et al.*, 2009)、下垂体前葉細胞の分化 (Chowdhury *et al.*, 2003)、免疫機能の制御 (Das *et al.*, 2006) など多様な機能の調節に関わる。TGF- β はニワトリ胚においては、上皮細胞の形態と機能の分化、増殖、細胞間基質の分化などを制御して、胚体の発達に寄与する (Samders and Wride, 1997)。

本節では、アンドロジェンによる胚クロアカ腺細胞の発達にも TGF- β が関与する可能性を検討することを目的とした。このために、実験1では孵卵12日に酢酸シプロテロン (CA)、13日にプロピオン酸テストステロン (TP) を投与した16日胚のクロアカ腺部におけるTGF- β 2、TGF- β 3 および TGF- β 4 の遺伝子発現を検証した。実験2では、TGF- β 3 蛋白がクロアカ腺に局在することを検証するために、免疫組織化学的解析を行った。

材料と方法

供試卵にはクウェールコスモス社 (愛知) から購入したニホンウズラの受精卵148個を用いた。孵卵の条件および被験物質の卵内投与 (*in ovo*) 法は第1節と同様とした。

被験物質のプロピオン酸テストステロン (TP) は東京化成工業株 (東京) のロット番号 Y5VLF を用い、酢酸シプロテロン (CA) はシグマアルドリッチジャパン株 (東京) のロット番号 025K1270 のものを使用した。溶媒にはコーンオイルを用いた。

処理区は対照区、TP-H 区および CA-H + TP-H 区の計3区とした。各処理区における被験物質の投与量を表8に示す。

表 8. 各処理区において受精卵に処理されたプロピオン酸テストステロン (TP) および酢酸シプロテロン (CA) の投与量、投与液量、投与液濃度

処理区の 名称	投与量 (μg/卵)		投与液量 (μL/卵/日)	投与液濃度 (μg/mL)	
	孵卵 12 日	孵卵 13 日		孵卵 12 日	孵卵 13 日
対照	0 *	0 *	15	0 *	0 *
TP-H	0 *	TP 300	15	0 *	TP 20,000
CA-H + TP-H	CA 75	TP 300	15	CA 5,000	TP 20,000

*) : コーンオイルを投与

TP: Testosterone propionate、CA: Cyproterone acetate、溶媒: コーンオイル

実験 1 のために、孵卵 16 日胚を用いて、性腺の形態から性別判別し、RT-PCR 解析用に各処理区とも雌雄各 3~5 例のクロアカ腺部を採取して、使用まで -80°C で冷凍保存した。なお、サンプリングしたクロアカ組織は 3~5 個体分をまとめて 1 サンプルとし、各処理区とも雌雄別に 2 サンプルを供試した。

また、実験 2 で免疫組織化学染色に供するため、各処理区とも孵卵 16 日胚の雌雄各 4 例を無作為に抽出して、クロアカ腺部を 10% リン酸緩衝ホルマリン液で 3~5 日間固定した。

実験 1 胚クロアカ腺部における TGF-β mRNA 発現の解析

クロアカ腺部組織を解凍し、第 3 節と同様にセパゾール RNA I Super (ナカライテスク株、京都) を用いて total RNA を抽出し、Programmable Thermal Controller PTC-100™ を用いて 37°C で 30 分間、65°C で 10 分間 DNase 処理した。この RNA から第 3 節と同様に、ReverTraAce-α™ キット (TOYOBO Ltd, 大阪) と Programmable Thermal Controller PTC-100™ を用いて、42°C で 30 分間、99°C で 10 分間、4°C で 5 分間のプログラムにより逆転写を行い、cDNA を作製した。

次いで、この cDNA を用いて第 3 節と同様の PCR 反応液を調製し、PCR による TGF-β2、TGF-β3 および TGF-β4 遺伝子の増幅を行った。

PCR の反応条件は、はじめの熱変性が 94°C で 1 分間の後、熱変性が 94°C で 30 秒間、アーニリング 56°C で 30 秒間および伸長反応 72°C で 1 分間のサイクルを 35 サイクル、サイク

ル終了後の伸展反応 72°Cで 10 分間というプログラムで行った。TGF- β の各プライマーの塩基配列は次の通りであった。 β アクチンの解析には、第 3 節と同じプライマーを用いた。

TGF- β 2 プライマー (Acc # ; NM001031045, Das *et al.*, 2006)

Primer Forward: 5'-AGGAATGTGCAGGATAATT-3'

Primer Reverse: 5'-ATTTTGGGTGTTTTGCCAA-3'

TGF- β 3 プライマー (Acc # ; S46000, Das *et al.*, 2006)

Primer Forward: 5'-CAGATCCTGGCGCTCTACA-3'

Primer Reverse: 5'-GAGGCCCTGGATCATGTCA-3'

TGF- β 4 プライマー (Sugi and Markwald, 2003)

Primer Forward: 5'-ATGAGTATTGGGCCAAAG-3'

Primer Reverse: 5'-ACGTTGAACACGAAGAAG-3'

得られた PCR 産物は第 3 節と同様にアガロース電気泳動し、写真撮影した。

実験 2 胚クロアカ腺部における TGF- β 3 蛋白の免疫組織化学的同定

各処理区のクロアカ腺部を第 2 節と同様に 2 μ m のパラフィン切片とし、一部は HE 染色し、他は免疫染色に供した。

TGF- β 3 免疫組織化学染色のためには、切片を脱パラフィンした後、流水で水洗し、脱塩水に浸漬した。0.01M クエン酸溶液 (pH6.0) で抗原賦活 (121°C-20 分間のオートクレーブ処理) した。PBS (和光純薬株、大阪) で 5 分間 \times 3 回洗浄し、PBS で 15 μ L/mL に希釈したヤギ血清 (Vector Laboratories Inc., CA, 米国) を滴下し、30 分間ブロッキング反応を行った。15 μ L/mL ヤギ血清で 50 倍 (4 μ g IgG/mL 相当) に希釈したウサギ抗ヒト TGF- β 3 ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, 米国) を切片に滴下し、4°C で終夜反応させた。次いで、PBS で 5 分間 \times 3 回洗浄後、PBS で 15 μ L/mL に希釈したビオチン標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Vector Laboratories Inc., CA, 米国) を滴下して室温で 3 時間反応させた。PBS で 5 分間 \times 3 回洗浄後、25 倍希釈したアビジン - ビオチン - ペルオキシダーゼ複合体 (Vector Laboratories Inc., CA, 米国) を滴下し、室温で 3 時間反応させた。さらに PBS で 5 分間 \times 3 回洗浄した後、発色基質 DAB-H₂O₂ (DAB TRIS Tablet、和光純薬株、大阪) の滴下により適度な発色を顕微鏡で観察し、発色がみられた時点で PBS による洗浄を行って発色を停止させた。コントロール染色として、抗 TGF- β 3 抗体の代わりに、PBS で 4 μ g IgG/mL 相当に調整した正常ウサギ IgG を用いて反応させた後、上記と同様の操作を行った。

発色後、流水による水洗を行い、脱塩水に浸漬して、核対比染色を行うため Hansen のヘマトキシリン液で 20 秒間染色した後、流水で色出しを行った。脱塩水に浸漬した後、脱水、透徹および封入を行い、光学顕微鏡により標本を観察した。

結果

対照区、TP-H 区および CA-H + TP-H 区の雌雄いずれのクロアカ腺部にも、TGF- β 2 および TGF- β 3 の mRNA 発現を示すそれぞれ約 280 bp および約 150 bp のバンドが認められた。各区のサンプルで β アクチンの発現は検出されたが、同じサンプルで TGF- β 4 の発現を示すバンドは認められなかった (図 11)。

組織学的には、対照区のクロアカ腺上皮は単層で上皮細胞の丈は低く、細胞質の粘液様物質も少なかった。粘膜上皮は 2~3 層であった。固有層には腺単位を形成するまでには至っていない腺細胞の小塊が散在していた。TP-H 区では、対照区と比べてクロアカ腺上皮の丈が高くなり、細胞質に粘液様物質も認められた。CA-H + TP-H 区では腺単位の発達は TP-H 区より劣り、対照区に似た像を呈した (図 12)。

TGF- β 3 の免疫染色の結果、対照区ではクロアカ腺上皮細胞、腺細胞小塊および粘膜上皮細胞に免疫反応産物が検出された。クロアカ腺上皮においては、反応産物は上皮細胞の細胞質の基底側に多く局在していた。TP-H 区と CA-H + TP-H 区でもこれと同様の免疫反応産物の局在が認められた (図 12)。

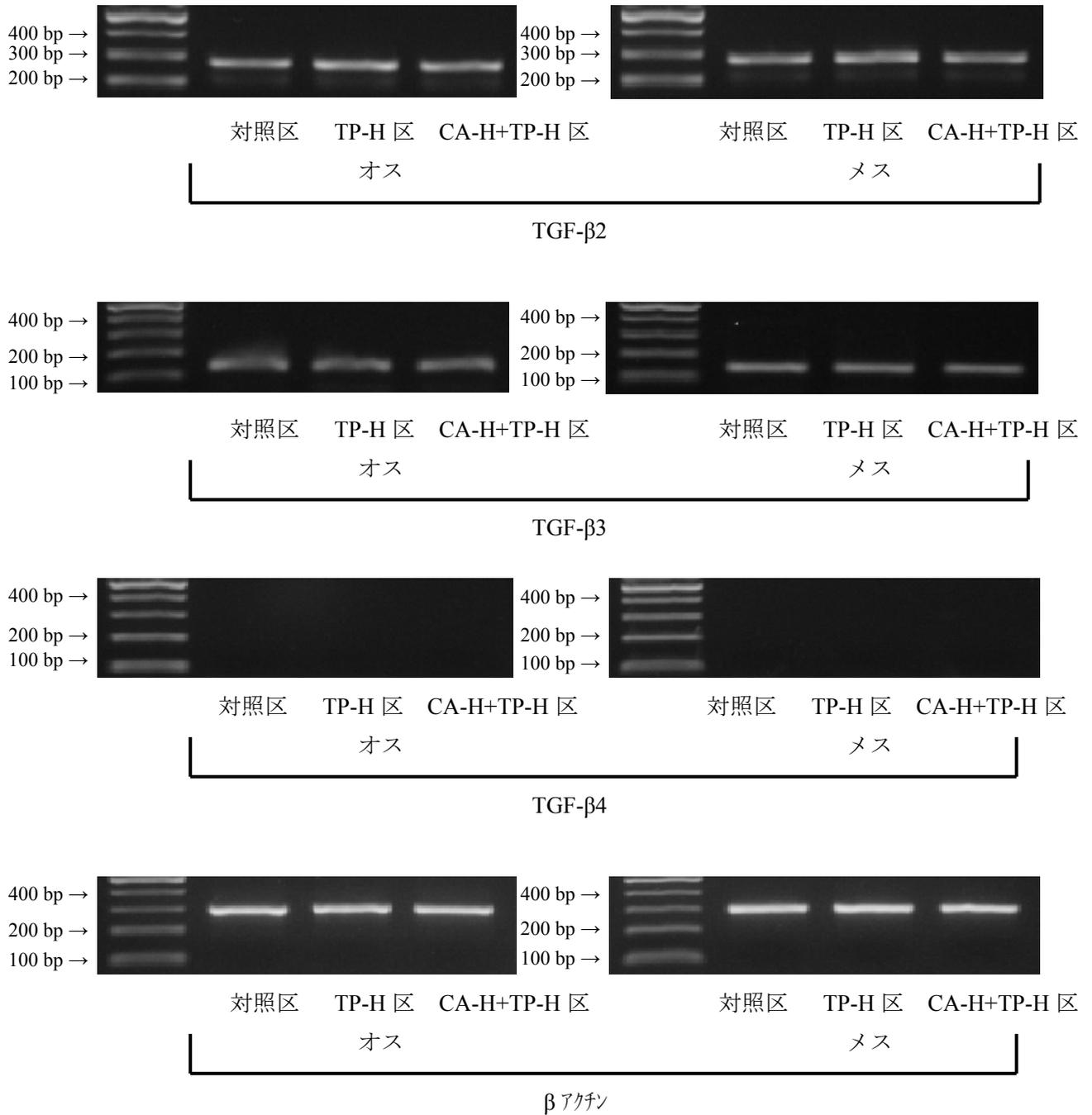


図 11. 対照（コーンオイル）、プロピオン酸テストステロン（TP）または酢酸シプロテロン（CA）を投与した孵卵 16 日ウズラ胚のクロアカ腺部における TGF-β アイソマー mRNA 発現の RT-PCR 解析

対照区、TP-H 区および CA-H + TP-H 区の雌雄いずれのクロアカ腺部にも、TGF-β2 および TGF-β3 の mRNA 発現を示すそれぞれ約 280 bp および約 150 bp のバンドが認められる。TGF-β4 の mRNA のバンドは、対照区、TP-H 区および CA-H + TP-H 区の雌雄いずれにも認められない。β アクチンの発現を示すバンドが雌雄いずれのクロアカ腺部に認められる。

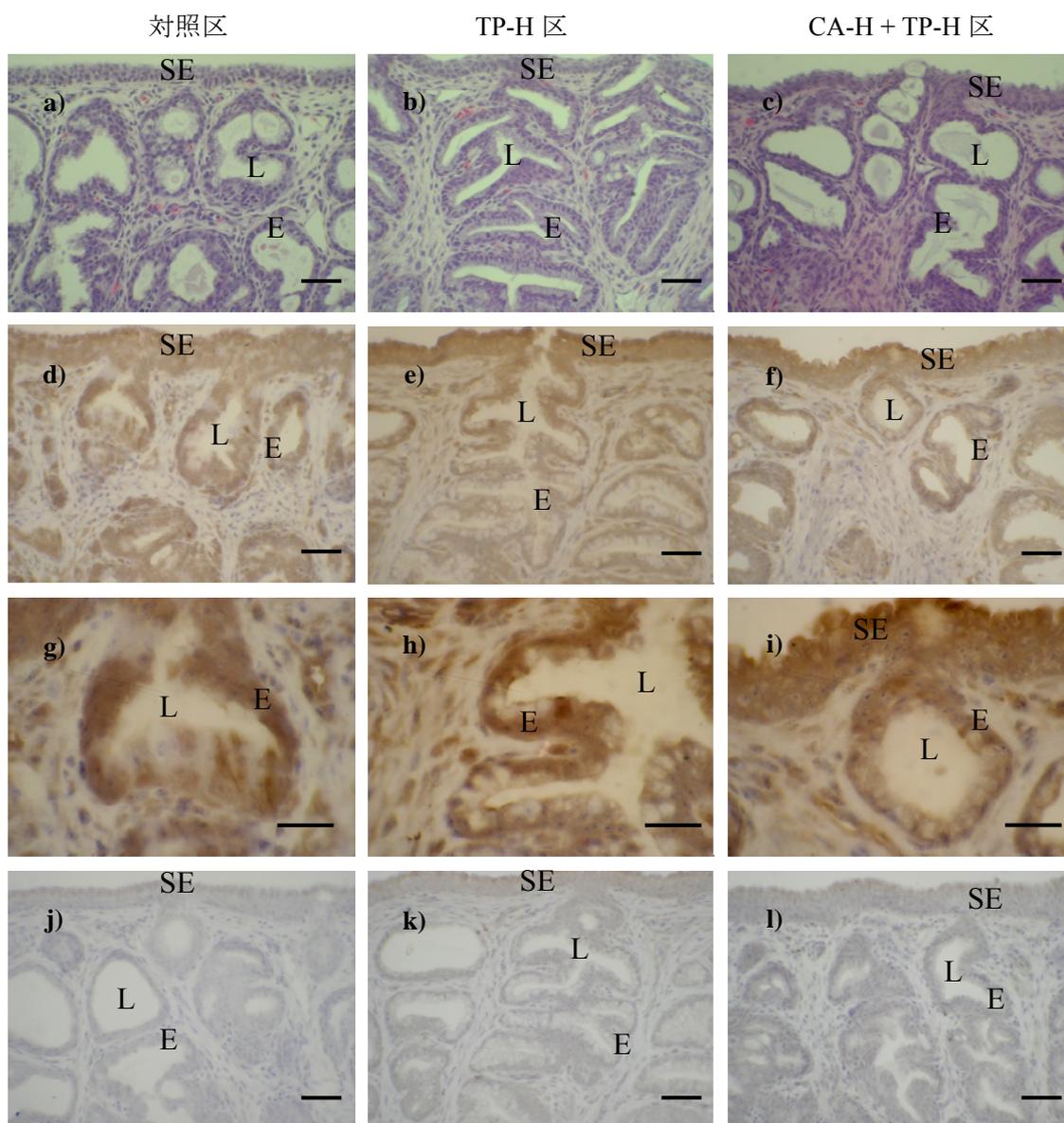


図 12. 対照 (コーンオイル)、プロピオン酸テストステロン (TP) あるいは酢酸シプロテロン (CA) を投与したウズラ胚のクロアカ腺における TGF- β 3 の免疫組織化学染色

a, d, g, j: 対照区、b, e, h, k: TP-H 区、c, f, i, l: CA-H + TP-H 区。

a~c: HE 染色像。TP-H 区(b)で腺単位はより発達している。

d~i: 抗 TGF- β 3 免疫組織化学染色像。対照(d, g)、TP-H(e, h)および CA-H + TP-H(f, i)のいずれの処理区にも、クロアカ腺部の粘膜上皮と、クロアカ腺細胞の細胞質基底側に陽性反応産物が認められる。処理区間での産物の局在には差は認められない。

j~l: コントロール染色像。いずれの処理区も陽性反応は認められない。

E = クロアカ腺上皮、L = クロアカ腺腔、SE = 粘膜上皮。スケールバーは a~f, j~l は 30 μ m、g~i は 20 μ m を示す。

考察

本章は、ウズラ胚を用いて化学物質の男性ホルモン攪乱作用を組織学的に評価する方法を確立することを目的に行った。第1節の実験1では、従来から受精卵への化学物質投与方法として用いられている卵気室内投与方法で(Glick, 1986; Wheler *et al.*, 1990; Andersson *et al.*, 1991; King *et al.*, 1993; Sanderson and Bellward, 1995; Janz and Bellward, 1996a, 1996b)、被験物質の至適投与条件を検討した。溶媒には胚の生存性が高いことからコーンオイルが適切であることが示された。コーンオイルは植物性エストロゲン物質が少ないことから、従来の内分泌攪乱作用に関連する研究でも用いられている (Gildersleeve *et al.*, 1987; Bryan *et al.*, 1989; McMurry and Dickerson, 2001; McGary *et al.*, 2001; Hasegawa *et al.*, 2004)。その結果、至適投与量は単回投与では 20 μL /卵/回、2日間反復投与では 15 μL /卵/日に定められた。アンドロジェン刺激するための TP 投与は、最高 TP 用量を 300 μg /卵として 13 日胚に投与し、16 日胚クロアカ腺を解析するのが最適であることが示された。この最適化した投与方法を用い、孵卵 16 日胚の様々な臓器の組織構造に対する TP の効果を調べた第1節/実験2から、クロアカ腺が最も顕著な組織構造的変化を示し、クロアカ腺の発達を指標にアンドロジェン物質の効果を組織学的に、かつ、数値的に評価できることが示された。また、第2節から、TP 投与前日の孵卵 12 日に抗アンドロジェン物質 CA を投与することで、クロアカ腺の発達を抑制させることも示すことができた。

TP を 300 μg /卵の割合でウズラ受精卵に投与するとクロアカ腺は発達し、組織学的観察から腺細胞の丈と細胞質の粘液様物質が増したため、TP の当用量はクロアカ腺細胞の成長や分化を強く誘導することが示された。HE 染色で薄く染まった細胞質の粘液様物質が PAS 反応で陽性であったことから、TP の作用で分化したクロアカ腺上皮細胞は多糖類を含んでいると考えられた。TP 300 μg /卵を孵卵 13 日に投与した TP-H 区では、クロアカ腺は明確に発達するが、肝臓、腎臓、精巣、卵巣、尾腺およびファブリキウス嚢には肉眼的にも組織学的にも対照区との差は認められなかった。これらの結果は、クロアカ腺が TP 投与に最も鋭敏に反応する臓器であることを示している。さらに、病理組織学的な変化がいずれの臓器にも認められなかったことから、TP の 300 μg /卵の投与は、ウズラ胚において毒性を示すことなく、アンドロジェン作用を評価できる実験系として有用であると考えられた。クロアカ腺の発達を誘発するには TP の 30 μg /卵 (TP-L 区) は充分ではないが、300 μg /卵 (TP-H 区) は効果的な用量であることも明らかとなった。

第3節から、孵卵 12 日胚および孵卵 16 日胚のクロアカ腺部においてアンドロジェン受

容体の mRNA の発現が認められ、レーザーマイクロダイセクションにより切り出されたクロアカ腺上皮細胞にも mRNA が発現していた。これらのことから、抗アンドロジェン物質の投与時期である孵卵 12 日には、既にアンドロジェン受容体 mRNA がクロアカ腺上皮細胞に発現していることを明らかにした。クロアカ組織におけるアンドロジェン受容体の mRNA の発現は 6~9 週令のオスウズラにおいて報告されている (Mizushima *et al.*, 2006)。Kaku *et al.* (1993) は、性成熟に達したオスウズラのみならず孵卵 15 日胚でもウズラクロアカ腺細胞にアンドロジェン受容体蛋白が存在することを免疫組織学的に明らかにしている。去勢したオスウズラにアンドロジェンを投与するとクロアカ腺が発達することが報告されている (Massa *et al.*, 1980)。このことから本研究で示された TP によるクロアカ腺細胞の発達と分化もアンドロジェン受容体への TP の直接的作用により惹起されたと考えられる。

孵卵 16 日胚のファブリキウス嚢および腎臓にもアンドロジェン受容体の mRNA の発現が認められたが、第 1 節の観察ではこれら臓器に肉眼的および組織学的な変化は認められず、これら臓器の胚時期におけるアンドロジェン受容体発現の意義や機能は明らかではなかった。

第 4 節から、孵卵 16 日胚のクロアカ腺部に TGF- β 2 および TGF- β 3 の mRNA の発現が認められ、TGF- β 3 抗体を用い免疫組織化学染色の結果、クロアカの粘膜上皮とクロアカ腺細胞の細胞質基底側に陽性反応が認められた。TGF- β は多機能なサイトカインの一つで、哺乳類の胚発生過程において内胚葉細胞の増殖や中胚葉の誘導、体軸の形成、脳や心臓などの臓器の形成、種々の臓器や組織を構成する細胞の分化や血管新生などの調節に必須の役割を果たしている (加藤, 2003)。鳥類では、TGF- β 2、TGF- β 3 および TGF- β 4 の mRNA 発現がニワトリ胚の軟骨細胞や筋細胞、さらには脳、心臓、筋肉、肝臓、腎臓などで認められている (Jacowlew *et al.*, 1991, 1992, 1994)。TGF- β 2、TGF- β 3 および TGF- β 4 が発現していたニワトリ下垂体では TGF- β 3 のみが制限給餌に関連してその発現量を変化させたことから、下垂体前葉の腺細胞の増殖や分化の制御に重要な役割を果たしているという報告がある (Chowdhury *et al.*, 2003)。また、ウズラでは初期胚における心臓複側中胚葉の心臓内前駆細胞への形成に TGF- β 2、TGF- β 3 および TGF- β 4 が関与するとの報告がある (Sugi *et al.*, 2003)。今回の実験結果は、TGF- β アイソマーのウズラクロアカ腺部での発現を示す最初の知見であるが、TGF- β の発現は胚発生期のクロアカの粘膜上皮とクロアカ腺細胞の増殖あるいは分化に TGF- β が一つの因子となっていることを示唆している。TGF- β 4 の mRNA の

発現が認められなかったことについては、この時期のウズラのクロアカでは TGF- β 4 を発現していないか、発現していてもその量は極めて少ない可能性が考えられた。

これまでの研究では、アンドロジェン物質を受精卵に投与しても、ニホンウズラの行動、形態および性分化への影響は認められなかった (Schumacher *et al.*, 1989 ; Shibuya *et al.*, 2004)。しかし、最近、合成アンドロジェンの酢酸トレンボロンの 0.05~50 μ g を孵卵 4 日のウズラ胚に投与したところ、成体になったオスにクロアカ腺の発達抑制とファブリキウス囊の小型化と濾胞減少が観察された (Quinn *et al.*, 2007a, b)。この成体時期のクロアカ腺発達の遅れは、発情期の発動の遅れも同時に報告されていることから、胚時期に投与されたアンドロジェン物質によって引き起こされた繁殖関連ホルモンの失調による可能性もある。一方、これら報告の中でファブリキウス囊に変化が認められ、この臓器も孵化後の観察においてはアンドロジェン作用の評価指標の一つとして有用であることを示している。しかし、本章の結果は、ファブリキウス囊が変化を示す前にクロアカ腺に構造的変化を誘発することを示したため、ウズラ胚を用いてアンドロジェン作用を評価するのにクロアカ腺が最も合理的な臓器であると考えられる。

クロアカの発達に対する TP の効果を全部のクロアカ腺単位の数に対する発達した腺単位の数の割合を解析することによって統計学的に評価した。対照区と比べて、その割合は TP 30 μ g/卵処理区 (TP-L 区) では差はなかったが、TP 300 μ g/卵処理区 (TP-H 区) では有意に増加し、発達した腺単位の割合に用量依存性がみられた。一方、TP 300 μ g/卵を投与する前日に抗アンドロジェン物質の CA を 7.5 あるいは 75 μ g/卵投与すると (各々 CA-L + TP-H 区、CA-H + TP-H 区)、雌雄ともに発達した腺単位の割合が減少し、さらに、CA の用量依存性がメスにも認められた。本実験で構築した、発達したクロアカ腺単位の割合の解析は、影響の程度を数値で示し、その有意性を統計学的に解析することを可能にするもので、ウズラ胚における化合物のアンドロジェンと抗アンドロジェン作用を評価するのに有用であることが示された。また、CA-L + TP-H 区での割合に性差が認められたことから、解析は雌雄を別々に行うべきと考えられた。

抗アンドロジェン物質のビクロゾリンを孵卵 4 日のウズラ卵内に 50 μ g/g 卵の用量で投与したところ、45 日令の成体オスにおいてクロアカ腺の発達と繁殖行動の抑制が認められた (McGary *et al.*, 2001)。また、抗アンドロジェン物質 *p,p'*-ジクロロジフェニルジクロロエチレン (DDE) を孵卵 1 日のウズラ卵内に 20~40 μ g/卵の用量で投与した結果、孵化 1 日令のオスにおいてファブリキウス囊が大型化し、また、濾胞が減少した (Quinn *et al.*,

2006)。これらの報告は、抗アンドロゲン物質のみを投与した際の投与の影響をみたものである。本章での実験では、CA に続いて TP を卵内に投与しているため、クロアカ腺におけるアンドロゲン受容体への TP 結合能に対する抗アンドロゲン物質の抑制効果が評価できていると思われる。このように、抗アンドロゲン物質の単回投与での解析と比較して、本章での方法は化学物質の抗アンドロゲン作用をより理論的に評価していると考えられる。

以上のことから、ウズラ胚に対するアンドロゲン作用の最も鋭敏な評価指標は、クロアカ腺における腺細胞の丈と細胞質の粘液様物質の増加を伴う構造的変化であった。このクロアカ腺単位の発達の割合を解析することは、アンドロゲンおよび抗アンドロゲン物質を評価するのに有用であると考えられた。

要約

本章では、ウズラ胚を用いて化学物質の男性ホルモン攪乱作用の組織学的に評価する方法を確立することを目的に行った。まず、ニホンウズラの受精卵内へアンドロジェンを投与してアンドロジェン物質に対して感受性が高い胚組織の検索を行った。次に、ウズラ胚のクロアカ腺の発達を指標とした化学物質のアンドロジェンおよび抗アンドロジェン作用の評価法を検討した。また、アンドロジェンおよび抗アンドロジェン物質投与によってクロアカ腺が組織構造的に変化するメカニズムの一つとして、アンドロジェン受容体の関与を検証すると共に、アンドロジェンによる胚クロアカ腺の分化にトランスフォーミング成長因子が関与するかを解析した。

1. アンドロジェン物質に対する高感受性ウズラ胚組織の検索

ニホンウズラの受精卵を供試し、受精卵内へアンドロジェン物質を投与する適切な溶媒、投与液量、アンドロジェン物質プロピオン酸テストステロン (TP) の投与量、投与時期および胚の摘出時期を、胚の生存性を評価指標に検討した結果、溶媒としてコーンオイルを選択し、単回投与では 20 μ L/卵/回、2 日間連日投与では 15 μ L/卵/日までが許容投与液量であった。TP の投与は最高濃度を 20,000 μ g/mL、投与時期を孵卵 13 日、胚摘出を孵卵 16 日に設定するのが最適であった。

最適化した投与法に基づき、対照 (孵卵 12 日と 13 日にコーンオイル)、TP-L (孵卵 12 日にコーンオイル、13 日に TP 30 μ g/卵) および TP-H (孵卵 12 日にコーンオイル、13 日に TP 300 μ g/卵) の各処理区におけるウズラ胚組織構造を組織学的に解析した結果、TP-H 区ではクロアカ腺が発達し、発達した腺細胞は細胞の丈が高く細胞質に粘液様物質を有していた。発達した腺細胞からなる腺単位は TP-H 区の雌雄いずれの胚にも認められ、対照区および TP-L 区ではみられなかった。発達した腺細胞には、強い PAS 陽性反応が細胞質核上部に認められた。肝臓、腎臓、精巣または卵巣、尾腺、ファブリキウス嚢には対照区と TP 区との間に組織形態上の差は認められなかった。クロアカ腺の全部の腺単位の数に対する発達した腺単位の数の割合は、対照および TP-L 区と比較して TP-H 区の雌雄胚で有意に高かった。また、その割合に雌雄の差はなかった。

2. アンドロジェンおよび抗アンドロジェン物質投与に伴うクロアカ腺の組織構造的変化の定量的解析

抗アンドロゲン物質として酢酸シプロテロン (CA) を用い、TP-H (孵卵 12 日にコーンオイル、13 日に TP 300 $\mu\text{g}/\text{卵}$)、CA-L+TP-H (孵卵 12 日に CA 7.5 $\mu\text{g}/\text{卵}$ 、13 日に TP 300 $\mu\text{g}/\text{卵}$) および CA-H+TP-H (孵卵 12 日に CA 75 $\mu\text{g}/\text{卵}$ 、13 日に TP 300 $\mu\text{g}/\text{卵}$) の各処理区におけるウズラ胚組織構造を組織学的に解析した。発達した腺細胞からなる腺単位は TP-H 区、CA-L+TP-H 区および CA-H+TP-H 区の雌雄いずれの胚にも認められたが、クロアカ腺の全部の腺単位の数に対する発達した腺単位の数の割合は、TP-H 区と比較して CA 区の雌雄胚で CA 用量依存的に有意に低かった。また、その割合は CA-L+TP-H 区で雌の方が少なかった。肝臓、腎臓、精巣または卵巣、尾腺、ファブリキウス嚢には TP-H 区と CA 区との間に組織形態上の差は認められなかった。

3. クロアカ腺におけるアンドロゲン受容体発現の解析

標的組織におけるアンドロゲン受容体 (AR) の mRNA を RT-PCR 法により解析した結果、孵卵 12 日胚および孵卵 16 日胚のクロアカ腺部においてアンドロゲン受容体の mRNA の発現が認められ、レーザーマイクロダイセクションにより切り出されたクロアカ腺上皮細胞にも mRNA が発現していた。抗アンドロゲン物質の投与時期である孵卵 12 日には既にアンドロゲン受容体 mRNA がクロアカ腺上皮細胞に存在していることが明らかとなった。

4. クロアカ腺におけるトランスフォーミング成長因子- β (TGF- β) 発現の解析

クロアカ腺部組織における TGF- β 2、TGF- β 3 および TGF- β 4 の mRNA を RT-PCR 法により解析し、TGF- β 3 蛋白がクロアカ腺上皮細胞に発現が局在することを免疫組織化学的に検証した結果、孵卵 16 日胚のクロアカ腺部に TGF- β 2 および TGF- β 3 の mRNA の発現が認められ、TGF- β 3 抗体による免疫組織化学染色ではクロアカの粘膜上皮とクロアカ腺上皮細胞の細胞質基底側に陽性反応がみられた。TGF- β が胚発生期のクロアカの粘膜上皮とクロアカ腺細胞の増殖あるいは分化に関与していることが示唆された。

本章の結果から、ウズラ胚に対するアンドロゲン作用の最も鋭敏な評価指標は、クロアカ腺における腺細胞の丈と細胞質の粘液様物質の増加を伴う構造的変化であった。この発達したクロアカ腺単位の割合は、アンドロゲンおよび抗アンドロゲン物質を評価するのに有用であると考えられた。

第 3 章 ウズラ胚クロアカ腺を標的としたレクチン組織化学による化学物質の男性ホルモン攪乱作用の評価法

緒言

これまで鳥類において化学物質の内分泌系への影響を調べた報告のほとんどが外因性エストロゲン作用に焦点をあてた研究であった (Bryan *et al.*, 1989 ; E. Adkins-Regan *et al.*, 1995 ; Wada *et al.*, 1997 ; Yoshimura *et al.*, 2002 ; Maeda and Yoshimura, 2002a, 2002b ; Fujita *et al.*, 2004 ; Halldin *et al.*, 2005 ; Viglietti-Panzica *et al.*, 2005)。第 2 章では化学物質を受精卵に投与して、アンドロジェンおよび抗アンドロジェン作用の組織学的評価法を検討した。その結果、ウズラ受精卵にアンドロジェンあるいは抗アンドロジェン物質を投与した際の高感受性胚組織がクロアカ腺で、クロアカ腺の全腺単位に対する発達した腺単位の割合を解析することで、化学物質のアンドロジェンおよび抗アンドロジェン作用を数値的に評価することが可能であることが示された。

ニホンウズラのクロアカ腺は、アンドロジェンの標的組織の一つで、アンドロジェン受容体およびその mRNA が発現し (第 2 章 ; Kaku *et al.*, 1993 ; Mizushima *et al.*, 2006)、精巣の発達と血中テストステロンに関連して発達・肥大し、交尾や排糞の際に泡沫液を分泌する (Coli and Wetherbee, 1959 ; Fujii and Tamura, 1967a ; McFarland *et al.*, 1968 ; Fujihara, 1992)。アンドロジェン投与によってもクロアカ腺は発達するため、この泡沫液の産生もアンドロジェン依存的であると考えられている。クロアカ腺の分泌物の組織化学的解析によると、粘液多糖類であることが報告されている (Fujii and Tamura, 1967b)。第 2 章では胚においてもプロピオン酸テストステロン (TP) がクロアカ腺の発達と腺上皮細胞内の粘液様物質の増加をもたらすことが示された。

レクチンは糖結合蛋白質で、多種存在する。それぞれのレクチンは、オリゴ糖やマンノース、ガラクトース、*N*-アセチルガラクトサミン、*N*-アセチルグルコサミン、フコースおよびシアル酸などの単糖類と特異的に結合する。そのため、組織や細胞内、細胞表面の糖鎖の種類や構造特性の解析のためにレクチンを用いた組織化学、ウェスタンブロット、アフィニティ精製は有用な手段である (Osawa and Tsuji, 1987 ; Szentkuti and Enss, 1998)。第 2 章で認められたアンドロジェン刺激で増加したクロアカ腺上皮細胞内の糖質にもある種のレクチンが特異的に結合することが予想される。レクチン組織化学的にこの結合が発色してシグナルが検出されれば、これを顕微鏡画像解析できるため、化学物質のアンドロジェ

ンおよび抗アンドロジェン作用を客観的に評価する上で有用な手法となると期待される。

本章では、ウズラ胚クロアカ腺上皮細胞内の糖鎖を標的にしたレクチン組織化学による化学物質の男性ホルモン攪乱作用評価を確立することを目的とした。実験 1 ではウズラ胚のクロアカ腺細胞に発現する糖鎖と特異的に結合するレクチンの検出を行った。実験 2 ではアンドロジェンおよび抗アンドロジェン作用物質投与に伴うクロアカ腺細胞内のレクチン反応産物の量的変化を定量的に解析した。

実験 1 胚クロアカ腺細胞内糖鎖に結合するレクチンの検索とその糖鎖の特性の同定

ウズラ胚クロアカ腺細胞に発現する糖鎖に対して特異的に結合するレクチンを確定するために、14 種類のレクチンを用いた組織化学によりこれを検索した。また、組織化学で同定されたレクチンが認識する糖鎖がクロアカ腺に存在することをレクチンウェスタンブロット法でも検証した。

材料と方法

(1) 供試卵と被験物質の処理

供試卵としてのニホンウズラの受精卵は、クウェールコスモス社（愛知）から購入した 193 個を供試した。孵卵の条件および卵内投与（*in ovo*）法は第 2 章と同様とした。

被験物質には、アンドロジェン物質としてプロピオン酸テストステロン（TP；東京化成工業㈱（東京）、ロット番号 Y5VLF）、抗アンドロジェン物質として酢酸シプロテロン（CA；シグマアルドリッチジャパン㈱（東京）、ロット番号 025K1270）を使用した。溶媒にはコーンオイル（和光純薬㈱、大阪）を用いた。

処理区は対照区、TP-L 区、TP-H 区、CA-L + TP-H 区および CA-H + TP-H 区の計 5 区とした。各処理区における被験物質の投与量を表 9 に示す。

表 9. 各処理区において受精卵に処理されたプロピオン酸テストステロン (TP) および酢酸シプロテロン (CA) の投与量、投与液量、投与液濃度

処理区の 名称	投与量 (μg/卵)		投与液量 (μL/卵/日)	投与液濃度 (μg/mL)	
	孵卵 12 日	孵卵 13 日		孵卵 12 日	孵卵 13 日
対照	0 *	0 *	15	0 *	0 *
TP-L	0 *	TP 30	15	0 *	TP 2,000
TP-H	0 *	TP 300	15	0 *	TP 20,000
CA-L + TP-L	CA 7.5	TP 300	15	CA 500	TP 20,000
CA-H + TP-H	CA 75	TP 300	15	CA 5,000	TP 20,000

*)：コーンオイルを投与

TP: Testosterone propionate、CA: Cyproterone acetate、溶媒: コーンオイル

各処理区の胚は、孵卵 16 日に第 2 章と同様に屠殺、剖検および性腺の形態から性判別し、その後、組織標本作製用に各処理区とも雌雄各 8 例を無作為に抽出して、クロアカ腺部を 10%リン酸緩衝ホルマリン液に 3~5 日間固定した。

また、ウェスタンブロット法に供するため、対照区、TP-H 区および CA-H + TP-H 区の雌雄各 6 例を無作為に抽出し、それらのクロアカ腺部を使用まで -80℃で保存した。

(2) レクチン組織化学染色

各処理区のクロアカ腺部組織は、厚さ 2 μm のパラフィン切片標本とし、一部は HE 染色した。他の切片は脱パラフィンした後、レクチン組織化学に供した。0.01M クエン酸溶液 (pH6.0) で抗原賦活 (121℃で 20 分間のオートクレーブ処理) した後、PBS (組織洗浄用、和光純薬株、大阪) で 5 分間×3 回洗浄し、PBS で 20 μg/mL に希釈した 14 種類のビオチン標識レクチン (Vector Laboratories Inc., CA, 米国) を切片に滴下し、室温で終夜反応させた。用いた 14 種類のレクチンを表 10 に示す。次いで、PBS で 5 分間×3 回洗浄後、PBS で 25 倍希釈したアビジン - ビオチン - ペルオキシダーゼ複合体 (Vector Laboratories Inc., CA, 米国) を滴下し、室温で 3 時間反応させた。さらに PBS で 5 分間×3 回洗浄した後、発色基質 DAB-H₂O₂ (DAB TRIS Tablet、和光純薬株、大阪) の滴下により適度な発色を顕微鏡で観察し、発色がみられた時点で PBS による洗浄を行って発色を停止させた。コントロール染

色として、レクチンの代わりに、PBS で反応させた後、上記と同様の操作を行った。発色後、流水による水洗を行い、脱塩水に浸漬して、核対比染色を行うため Hansen のヘマトキシリン液で 20 秒間染色した後、脱水、透徹および封入を行い、光学顕微鏡で観察した。

表 10. 供試したレクチンの一覧

略号	正式名	略号	正式名
Con A	Concanavalin A	PNA	Peanut Agglutinin
DBA	<i>Dolichos biflorus</i> Agglutinin	RCA120	<i>Ricinus communis</i> Agglutinin
DSL	<i>Datura stramonium</i> Lectin	SBA	Soy Bean Agglutinin
ECL	<i>Erythrina cristagalli</i> Lectin	STL	<i>Solanum tuberosum</i> Lectin
GSL II	<i>Griffonia simplicifolia</i> Lectin II	UEA I	<i>Ulex europaeus</i> Agglutinin I
-	Jacalin	VVA	<i>Vicia villosa</i> Agglutinin
LEL	<i>Lycopersicon esculentum</i> Lectin	WGA	Wheat Germ Agglutinin

(3) クロアカ腺におけるレクチン結合物質のウェスタンブロット法による解析

レクチン組織化学によりクロアカ腺細胞中に VVA レクチン陽性反応が最も強く認められたため、その結合物質がクロアカ腺部に存在することを確認するために、ウェスタンブロット法でも解析した。解析には、対照区、TP-H 区および CA-H + TP-H 区からサンプリングしたクロアカ組織の 3 個体分を 1 サンプルとし、各処理区とも雌雄別に 2 サンプルを供試した。

① サンプル調製

組織サンプルの 5 倍量のホモゲナイズ緩衝液 (組成: 0.02 M Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.005 M EDTA, 1% (v/v) Triton X-100, 10% (w/v) glycerol, 0.1% (w/v) SDS, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride) でホモジナイズし、氷上で 30 分間インキュベートした後、高速冷却遠心機 PS-18W で 4°C 冷却のもと 12,000 g で 20 分間遠心分離した。上澄みをサンプルとして -80°C で保存した。

次に、サンプルの蛋白濃度を測定した。サンプルに超純水を加えて 2 倍希釈し 4°C 冷却のもと 10,000 g で 5 分間遠心分離した。上澄み 50 μ L とプロテインアッセイ試薬 (Bio-Rad Lab, Hercules, CA, 米国) 2.45 mL を混和しその溶液の蛋白濃度を測定した。検量線の作製には血清アルブミンを用いた。その蛋白濃度を基に、超純水を用いて蛋白濃度 2 μ g/ μ L に

サンプルを調製した。

② SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)

Laemmli (1970) の方法に従い4%濃縮ゲルと10%分離ゲルを作製し、泳動槽 (株バイオクラフト、東京) に設置し、泳動緩衝液 (1.44%(w/v)グリシン、0.3%(w/v)トリス、0.1%(w/v)SDS) を注いだ。蛋白濃度 $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ のサンプル $5 \mu\text{L}$ にサンプル緩衝液 (30% (v/v) グリセロール, 5% (v/v) メルカプトエタノール, 4% (w/v) SDS, 0.15 M Tris-HCl, pH 7.0, 0.06% (w/v) ブロモフェノブルー) $10 \mu\text{L}$ と超純水 $5 \mu\text{L}$ を加えて攪拌し、沸騰水中で10分間インキュベートした。その後、そのサンプルを1レーン $20 \mu\text{L}$ (蛋白質量 $10 \mu\text{g}$ 相当) ずつ、別のレーンにプロテインマーカー (Dual color ; Bio-Rad Lab., 米国) $6 \mu\text{L}$ を注入し、電圧をサンプルが濃縮ゲル中は80V、分離ゲル中は150Vで電気泳動した。

③ ウェスタンブロット

SDS-PAGE 後、ゲル中の蛋白質を転写緩衝液に浸したニトロセルロース膜 (PALL Gelman Laboratory, Ann Arbor, Michigan, 米国) へ、転写装置を用いて350 mAで1時間かけて転写した。

転写されたニトロセルロース膜をウェスタン緩衝液 (0.02 M Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.5% (w/v) Tween 20, 0.05% (w/v) BSA) で5分間×3回洗浄後、5%カゼインミルク (Roche, Mannheim, Germany) に浸して1時間ブロッキングし、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ に調整したビオチン標識VVAレクチンで1時間反応させた。レクチン液からニトロセルロース膜を取り出し、ウェスタン緩衝液で10分間×3回洗浄後、アビジン - ビオチン - ペルオキシダーゼ複合体 (Vector Laboratories Inc., CA, 米国) と30分間反応させた。PBSで5分間×3回洗浄し、発色基質DAB- H_2O_2 (和光純薬株、大阪) で発色させた。流水で膜を十分に洗浄後、ろ紙で吸水・乾燥させた。全ての反応は常温で行った。

結果

組織学的所見

腺腔が形成されたクロアカ腺が、TP および CA 投与の有無やそれらの濃度にかかわらず全処理区の胚に認められた。TP-H 区の腺細胞の多くは細胞の丈が高く細胞質に粘液様物質を有する発達した腺細胞で、対照区や CA 処理区の多くの腺単位は丈が低く細胞質の粘液様物質も少ない未発達な腺により構成されていた。

レクチン組織化学染色所見

14 種類のレクチンで TP-H 区のクロアカ腺を染色した結果、VVA レクチン結合物質が発達した腺細胞内に認められた (図 13m)。この VVA 結合物質のシグナルは、クロアカ腺上皮だけで認められ、粘膜上皮や粘膜固有層、また、クロアカ腺腔には検出されなかった。SBA レクチンも腺細胞に陽性反応を示したが、その反応の程度は VVA に比べると弱く、ヒダの部位によってシグナル強度が異なるという不均一性を呈した (図 13j)。PNA レクチンは粘膜上皮組織の結合組織にある物質に反応した (図 13h)。他のレクチン (Con A, DBA, DSL, ECL, GSL II, Jacalin, LEL, RCA120, STL, UEA I, WGA) は腺細胞および結合組織の両方に特異反応を示さなかった (図 13)。レクチンを含まない PBS でインキュベートしたコントロール染色でも発色は認められなかった (図 13o)

高倍率の観察では、VVA 結合物質の強いシグナルは TP-H 区の腺単位を形成する腺上皮細胞の核上部細胞質にある粘液様物質中に特異的に存在していた (図 14h)。対照区のクロアカ腺では、腺細胞中の VVA 結合物質のシグナルはないか、あっても極少量であった。CA-H + TP-H 区のクロアカ腺上皮では、VVA 陽性反応産物は核周囲に局在して顆粒状の様相を呈しており、核上部の粘質領域でのシグナルは乏しかった (図 14i)。

ウェスタンブロット解析

VVA レクチンを用いたウェスタンブロット解析の結果、TP-H 区および CA-H + TP-H 区の雌雄胚のいずれのクロアカ腺部にも約 75kDa の単一バンドが認められた。対照区ではバンドは弱かった (図 15)。レクチンを用いずに染色したコントロール染色では、バンドは検出されなかった (データは示さず)。

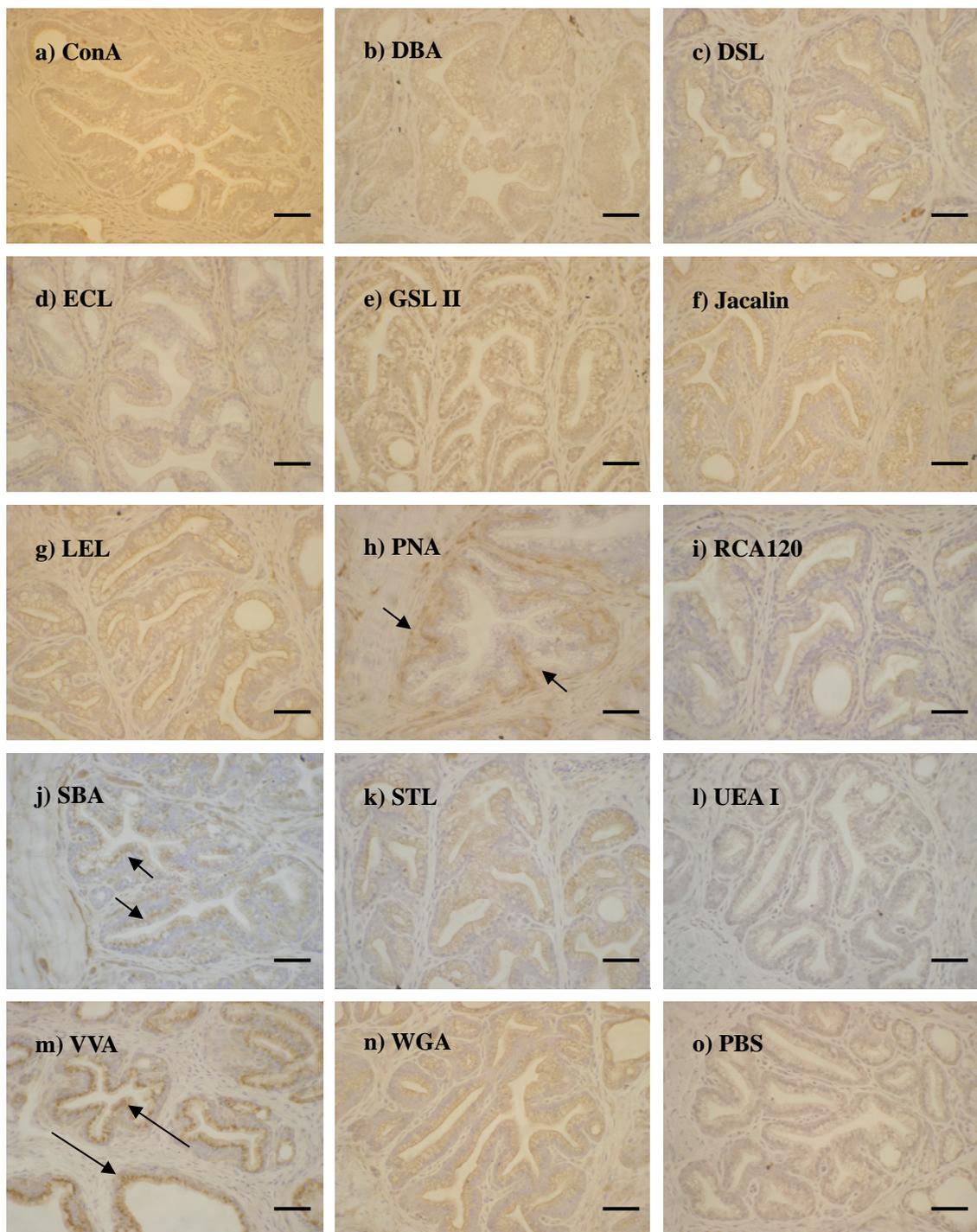


図 13. プロピオン酸テストステロン (TP) 300 μ g/卵処理区 (TP-H 区) のウズラ胚クロアカ腺のレクチン組織化学染色像

a)~o)はそれぞれ Con A(a), DBA(b), DSL(c), ECL(d), GSL II(e), Jacalin(f), LEL(g), PNA(h), RCA120(i), SBA(j), STL(k), UEA I(l), VVA(m), WGA(n), PBS (陰性対照, o) で染色した組織像。

VVA レクチン結合物質が発達した腺細胞内に認められ、SBA(j)も腺細胞に陽性反応を示すが、その反応の程度は VVA(m)に比べると弱い。PNA(h)は粘膜上皮組織の結合組織にある物質に反応している。スケールバーは 30 μ m を示す。

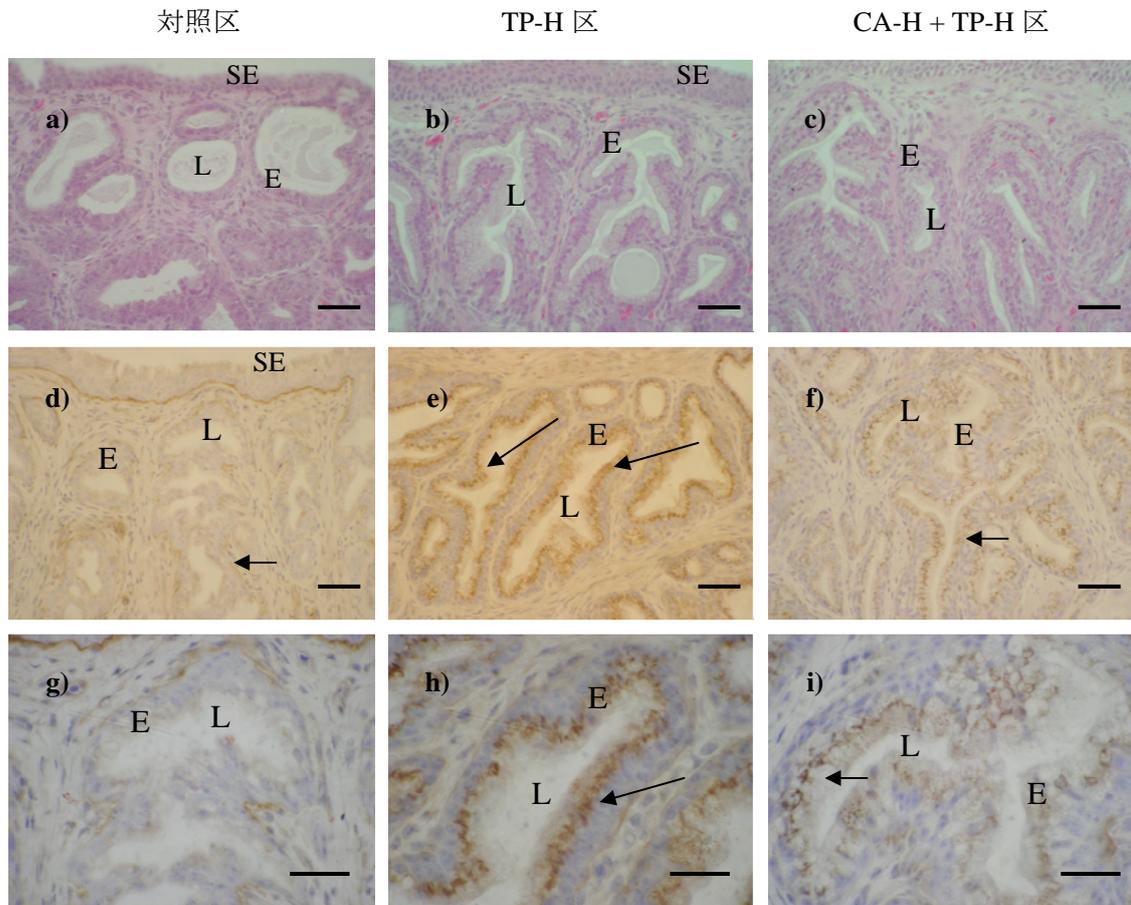


図 14. 対照（コーンオイル）、プロピオン酸テストステロン（TP）あるいは酢酸シプロテロン（CA）を投与したウズラ胚のクロアカ腺の VVA レクチン組織化学染色像

a, d, g: 対照区、b, e, h: TP-H 区、c, f, i: CA-H + TP-H 区。

a~c: HE 染色像。TP-H 区(b)の腺細胞の多くは発達した腺細胞（細胞の丈が高く細胞質に粘液様物質を有す）で、対照区(a)や CA-H + TP-H 区(c)の多くの腺単位は未発達な腺（細胞の丈が低く細胞質の粘液様物質も少ない）により構成されている。

d~i: VVA レクチン組織化学染色像。VVA 結合物質の強いシグナル(長い矢印)は、TP-H 区(e, h)の腺単位を形作る腺上皮細胞中に認められ、細胞質の粘液様物質中に特異的に存在する。対照区の VVA 結合物質の量はないか、あっても極少量である (d: 短い矢印)。CA-H + TP-H 区のクロアカ腺上皮の細胞質にも VVA 結合物質は認められるが局在する (f, i: 短い矢印)。

E = クロアカ腺上皮、L = クロアカ腺腔、SE = 粘膜上皮。スケールバーは a~f は 30 μm 、g~i は 20 μm を示す。

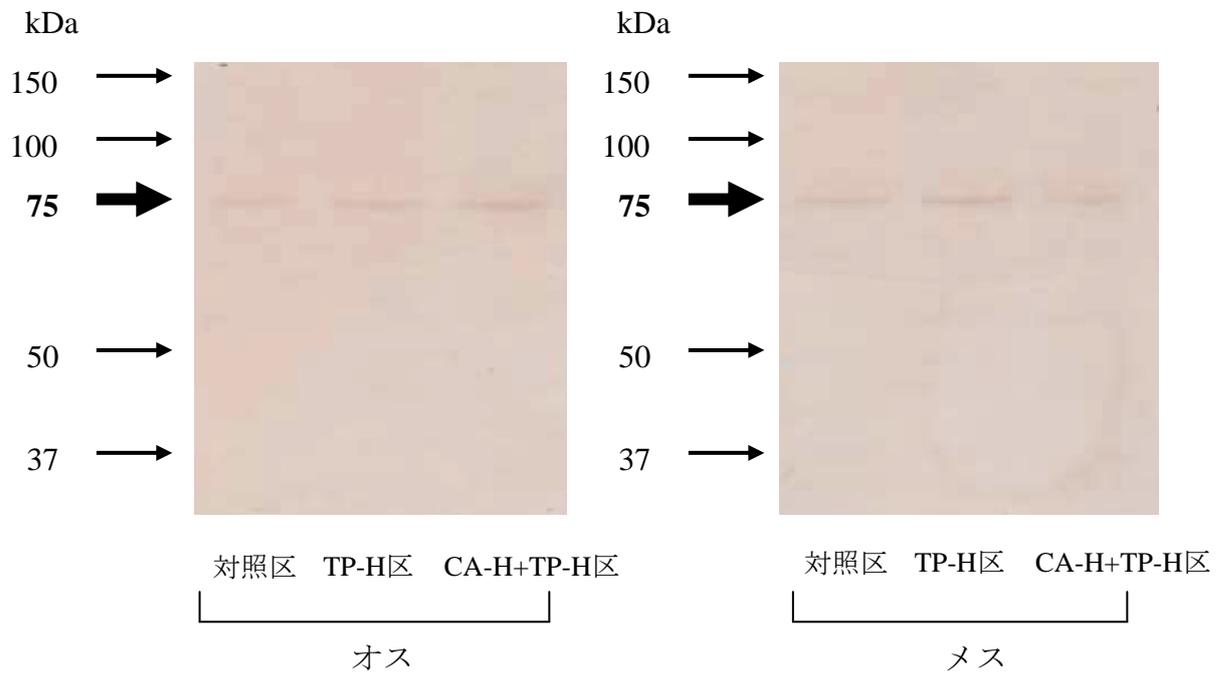


図 15. 対照（コーンオイル）、プロピオン酸テストステロン（TP）あるいは酢酸シプロテロン（CA）を投与した孵卵 16 日ウズラ胚クロアカの VVA レクチンのウェスタンブロット解析

TP-H 区および CA-H + TP-H 区の雌雄胚のいずれのクロアカ腺にも約 75kDa の単一バンドが認められる。対照区ではバンドは弱い。

実験 2 ウズラ胚へのアンドロジェンおよび抗アンドロジェン物質投与に伴うクロアカ腺における VVA レクチン反応産物量の変化の定量的解析

実験 1 において、ウズラ胚クロアカ腺はアンドロジェンおよび抗アンドロジェン物質投与によって組織構造的変化を示すが、この組織変化と連動してクロアカ腺上皮細胞中の VVA レクチン反応産物の出現量や分布部位も異なることが明らかとなった。VVA レクチン反応産物は顕微鏡画像解析で抽出できる。本実験では、クロアカ腺上皮の単位面積あたりの VVA レクチン反応産物面積を解析して、アンドロジェンと抗アンドロジェン作用の評価系を確立することを目的とした。

材料と方法

(1) レクチン組織化学染色標本

実験 1 で作製した対照区、TP-L 区、TP-H 区、CA-L + TP-H 区および CA-H + TP-H の計 5 区の、雌雄各 8 例のレクチン組織化学染色標本を用いた。

(2) クロアカ腺細胞におけるレクチン陽性反応部位の顕微鏡画像解析

各処理区のウズラ胚クロアカ腺において、腺単位の構造を無作為に抽出した。この像を顕微解析装置 (Image-Pro Plus, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, 米国) でデジタル画像とした。一つの腺単位組織において、腺腔を除いた腺上皮組織を抽出してその面積を計測した。次いで、この腺上皮組織内における VVA 反応産物が占める面積を抽出した。腺上皮組織の単位面積あたりの VVA 陽性反応面積の割合を VVA 結合物質の密度として算出した。この計測は 1 個体について異なる 2 箇所で行い、その平均値を当該個体の値とした。

(3) 統計学的処理

対照区と TP 処理区の間ならびに TP-H 区と CA 処理区の間の有意差検定を行った。VVA 結合物質の密度について、雌雄ごとに Kruskal-Wallis 検定を行い、差がある場合には Steel の多重比較検定を行った。また、雌雄間の比較を Student の t-検定で行った。P < 0.05 を有意差ありとした。

結果

表 11 にプロピオン酸テストステロン (TP) または酢酸シプロテロン (CA) の卵内投与がクロアカ腺上皮の VVA 結合物質密度に及ぼす影響の顕微鏡画像解析の結果を示す。

クロアカ腺上皮における VVA 結合物質の密度は、対照区では雌雄ともに検出できないレベルで、密度は 0 に近かった。オスでは TP 投与区で VVA 結合物質が検出されたが、密度は TP-L 区で 0.4%、TP-H 区で 8.2% となり、TP-H 区は対照区に比べて有意に高かった ($P < 0.01$)。TP を投与する前日に CA を投与した CA-L + TP-H 区および CA-H + TP-H 区の VVA 結合物質の密度を解析すると、CA-L + TP-H 区では 4.7% および CA-H + TP-H 区では 3.4% で、いずれも TP-H 区より有意に低かった (それぞれ $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)。メスでは、VVA 結合物質は TP-L 区では検出されなかったが、TP-H 区の密度は 6.0% で、対照区よりも有意に高かった ($P < 0.01$)。さらに、CA-L + TP-H 区および CA-H + TP-H 区の密度は、それぞれ 2.9% および 1.0% で、TP-H 区に比べて有意に低かった (いずれも $P < 0.01$)。雌雄間の VVA 結合物質の密度の差を比較すると、TP-L 区と TP-H 区においてメスよりオスで高かった (それぞれ $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)。

表 11. 対照区、プロピオン酸テストステロン (TP) 区または酢酸シプロテロン (CA) 区のウズラ胚クロアカ腺上皮における VVA レクチン結合物質の密度

処理区	レクチン結合物質の密度 (%)	
	オス	メス
対照	0.0 ± 0.1	0.1 ± 0.1
TP-L	0.4 ± 0.4	0.0 ± 0.0 +
TP-H	8.2 ± 0.9 **	6.0 ± 1.3 ** ++
CA-L + TP-H	4.7 ± 3.4 #	2.9 ± 1.8 ##
CA-H + TP-H	3.4 ± 2.9 ##	1.0 ± 0.5 ##

数値は平均値 ± SD (n = 8)。

(VVA 陽性反応の面積 / 腺組織の単位面積 × 100)

対照区と TP 処理区の間ならびに TP-H 区と CA 処理区の間で腺組織の単位面積あたりの VVA 陽性反応面積の割合 (VVA 結合物質の密度) について、雌雄ごとに Kruskal-Wallis 検定を行い、差がある場合には Steel の多重比較検定を行った。また、雌雄間の比較を Student の t-検定で行った。P < 0.05 を有意差ありとした。

** : 対照区との間に有意差あり (P < 0.01)。

#, ## : TP-H 区との間に有意差あり (P < 0.05, 0.01)。

+, ++ : 雌雄間に有意差あり (P < 0.05, 0.01)。

考察

本章では、ウズラ胚における未発達および発達したクロアカ腺細胞にレクチンが反応し、その結合シグナルの程度を解析することにより、化学物質の男性ホルモン攪乱作用を評価できるかを検討した。CA および TP をそれぞれ孵卵の 12 日および 13 日に卵内に投与し、孵卵 16 日胚にレクチン組織化学染色を施した。

実験 1 から、レクチン 14 種類のうち、TP の刺激を受けて発達したクロアカ腺上皮細胞の細胞質中に特異的で最も強い反応シグナルを示したのは VVA レクチンであった。ウェスタンブロット解析の結果、その VVA 陽性反応物質は約 75kDa の単一のバンドを示した。腺組織の単位面積あたりの VVA 陽性反応面積の割合（VVA 結合物質の密度）を解析した実験 2 から、TP は VVA 結合物質の密度を有意に増加させ、一方 CA はその密度の増加を抑制した。

クロアカ腺細胞における VVA 陽性反応が腺細胞の構造的変化に関連して認められた。すなわち、発達した腺細胞には強く反応し、未発達な細胞は反応しなかった。腺細胞におけるレクチン陽性反応は、SBA より VVA の方が強く、他のレクチンでは検出できない程度であった。このように、本章で調べたレクチンのうち、発達したクロアカ腺細胞におけるレクチン陽性反応物質を同定するレクチン組織化学染色のための最良のレクチンは VVA であることを明らかにした。TP のアンドロジェン作用で発達した腺上皮細胞の細胞質内における VVA 陽性反応物質の局在を調べたところ、VVA 反応物質は腺細胞中の粘液様物質に含まれていた。

VVA は典型的なセリン/スレオニン(Ser/Thr)結合ムチン型糖ペプチド、特に α 配位結合 *N*-アセチルガラクトサミン-Ser/Thr 構造に高い親和性を示す (Osawa and Tsuji, 1987)。予備実験において、ウズラのオス成体のクロアカ腺細胞に多量の VVA 陽性反応物質が認められた。これらのことから、Ser/Thr 結合ムチン型糖ペプチドはクロアカ腺細胞における分泌物あるいはその前駆物質の構成成分の一つである可能性がある。VVA を用いたウェスタンブロット解析により約 75 kDa に単一バンドがみられたことから、1 タイプの物質のみがウズラ胚のクロアカにおいて VVA に反応したと考えられた。SBA は *N*-アセチルガラクトサミンやガラクトースと結合する (山本・小浪, 2003)。VVA より少ないながら SBA もクロアカ腺上皮成分に結合したことは、両者が *N*-アセチルガラクトサミン関連成分を認識したかもしれない。なお、前立腺がんはアンドロジェン作用によって進行するが、この初期の前立腺上皮で VVA 陽性物質が強く染色されることから (Chan *et al.*, 2001)、他の臓器でもアンド

ロジェン作用と上皮のガラクトサミン/ガラクトース産生との関連性が存在するかもしれない。一方、過去の一般組織化学で成熟ウズラのクロアカ腺には PAS 反応陽性、アルシアンブルーやアルデヒドフクシンの酸性粘液染色陽性で、主として硫酸性粘液多糖類が含まれると報告されているが (Fujii and Tamura, 1967b)、今回の VVA 結合物質がこれらの多糖類染色陽性物質と同一のものかどうかは不明である。

胚時期にもかかわらず TP のアンドロジェン作用でウズラ胚クロアカ腺に粘膜様成分の合成と分泌機能の亢進を示唆するような所見が認められた。眼球表面などの粘質は、アンドロジェン不感受性の場合に減少することから (Mantelli, *et al.*, 2007)、アンドロジェンと粘液物質産生との関連が生体の他の臓器でも示唆されている。第 2 章で TGF- β アイソマーの発現像がクロアカ腺に認められたことを併せ考えると、男性ホルモンは胚時期でもクロアカ腺の機能分化を誘導することを示唆するものである。

本章ではクロアカ腺細胞における VVA 結合物質の発現に及ぼすアンドロジェン物質の TP および抗アンドロジェン物質の CA の影響を評価した。VVA 結合物質のシグナルは、顕微鏡画像解析により定量できた。対照区と比較して、VVA 結合物質の密度は TP 30 μg /卵処理区 (TP-L 区) の胚では差はなかったが、TP 300 μg /卵処理区 (TP-H 区) では有意に増加し、VVA 結合物質の密度に用量依存性がみられた。一方、TP 300 μg /卵を投与する前日に CA を 7.5 あるいは 75 μg /卵投与すると (各々 CA-L+TP-H 区、CA-H+TP-H 区)、雌雄ともに VVA 結合物質の密度は TP-H 区に比べて有意に低く、さらに、その密度に対する CA の用量依存性がオスに認められた。このように、クロアカ腺における VVA 結合物質の密度を統計学的に解析できることは、ウズラ胚における抗アンドロジェン作用を評価するのに有用であると考えられた。

第 2 章では TP に反応したクロアカ腺の構造的な発達の程度に雌雄差がみられたが、本章でも VVA 陽性反応物質の発現に性差が認められた。第 2 章でも述べた通り、化学物質の卵内投与でウズラ胚のクロアカ腺を指標としたアンドロジェンおよび抗アンドロジェン作用を評価する時には、雌雄別々に評価すべきと考えられた。

クロアカ腺に対するアンドロジェンおよび抗アンドロジェン作用を組織学的に検索した第 2 章の実験では、全クロアカ腺組織構造における発達した腺単位の数を顕微鏡下でマニュアルでカウントした。本章での方法は、VVA 陽性反応物質がクロアカ腺上皮特異的に認められ、かつ、その密度をコンピューターアシスト画像解析装置を用いて解析できるため、第 2 章の方法よりもより客観的に化学物質のアンドロジェンおよび抗アンドロジェン作用

を検出できると考えられる。

以上のことから、VVA レクチンがウズラ胚の発達中のクロアカ腺上皮細胞を特異的に染め、しかも腺組織中の VVA 陽性反応面積がアンドロジェンあるいは抗アンドロジェン物質による刺激に上方あるいは下方制御を受けることを示した。ウズラ胚クロアカを標的とした VVA を用いたレクチン組織化学的手法は、アンドロジェンおよび抗アンドロジェン物質を評価するのに有用であると考えられた。

要約

本章では、ウズラ胚クロアカ腺上皮細胞内の糖鎖を標的にしたレクチン組織化学による化学物質の男性ホルモン攪乱作用評価を確立することを目的に行った。まず、ウズラ胚のクロアカ腺細胞に発現する糖鎖と特異的に結合するレクチンの検出を行った。続いて、アンドロジェンおよび抗アンドロジェン作用物質投与に伴うクロアカ腺細胞内のレクチン反応産物の量的変化を定量的に解析した。

1. 胚クロアカ腺細胞内糖鎖に結合するレクチンの検索とその糖鎖の特性の同定

ニホンウズラの受精卵を供試し、14種類のレクチンを用いて TP-H 区のウズラ胚クロアカ腺のレクチン組織化学を行った。また、組織化学で同定されたレクチンが認識する糖鎖がクロアカ腺に存在することをレクチンウェスタンブロット法でも検証した。その結果、VVA レクチンが最も強く反応し、その結合物質は発達したクロアカ腺細胞上皮だけで認められた。SBA レクチンも腺細胞に陽性反応を示したが、その反応の程度は VVA に比べると弱かった。PNA レクチンは粘膜上皮組織の結合組織にある物質に反応した。他のレクチンは腺細胞および結合組織の両方にほとんど特異反応を示さなかった。VVA 結合物質の強いシグナルは、TP-H 区の腺単位を形成する腺上皮細胞の核上部細胞質にある粘液様物質中に特異的に存在していた。VVA レクチンを用いたウェスタンブロット解析の結果、TP-H 区および CA-H + TP-H 区の雌雄胚のいずれのクロアカ腺部にも約 75kDa の単一バンドが認められた。対照区ではバンドは弱かった。

2. ウズラ胚へのアンドロジェンおよび抗アンドロジェン物質投与に伴うクロアカ腺における VVA レクチン反応産物量の変化の定量的解析

対照区、TP-L 区、TP-H 区、CA-L + TP-H 区および CA-H + TP-H 区の構成で、クロアカ腺における VVA レクチン結合物質密度の定量的解析を実施した。クロアカ腺上皮における VVA 結合物質の密度は、対照区では雌雄ともに検出できないレベルであった。VVA 結合物質の密度は対照区と比べて TP-L 区は差なく、TP-H 区で有意に多かった。また、その密度は CA-L + TP-H 区および CA-H + TP-H 区では TP-H 区と比べて有意に少なかった。

本章の結果から、VVA レクチンがウズラ胚の発達中のクロアカ腺上皮細胞を特異的に染め、腺組織中の VVA レクチン結合物質の密度がアンドロジェンあるいは抗アンドロジェン

物質による刺激に上方あるいは下方制御を受けることを示した。ウズラ胚クロアカを標的とした VVA を用いたレクチン組織化学的手法は、アンドロジェンおよび抗アンドロジェン物質を評価するのに有用であると考えられた。

第4章 ウズラ胚クロアカ腺を標的とした細胞増殖活性解析による化学物質の男性ホルモン攪乱作用の評価法

緒言

第2章では、ウズラ受精卵にアンドロジェンを投与すると胚のクロアカ腺が肥大化し、腺単位の発達と腺上皮細胞の分泌機能が活発化することが示された。アンドロジェンあるいは抗アンドロジェン物質を投与した胚のクロアカ腺で、クロアカ腺の全腺単位に対する発達した腺単位の割合を定量的に解析することで、化学物質のアンドロジェンおよび抗アンドロジェン作用を評価することが可能であることが示された。また、第3章では、VVAレクチンがウズラ胚の発達中のクロアカ腺細胞を特異的に染め、しかもアンドロジェンおよび抗アンドロジェン作用の影響を受けて変化するVVA結合物質の密度をコンピューターアシスト画像解析装置を用いて解析できるため、ウズラ胚クロアカ腺を標的としたVVAを用いたレクチン組織化学的手法が、アンドロジェンおよび抗アンドロジェン作用をより客観的に評価するのに有用であることが明らかにされた。第2章で認められたアンドロジェンによるウズラ胚クロアカ腺の肥大化と腺単位の発達、および腺細胞の分泌機能のうち、第3章でのVVAレクチンを用いたレクチン組織化学による解析は、腺細胞の分泌機能への影響を評価したものである。一方、アンドロジェンによりクロアカ腺の肥大化と腺単位の発達がみられることから、この過程でクロアカ腺細胞の増殖活性が亢進する可能性も容易に推察される。

クロアカ腺の発達が腺上皮細胞の増殖促進を伴うのであれば、化学物質のアンドロジェンと抗アンドロジェン作用を細胞増殖活性で評価できることが期待される。PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen、増殖細胞核抗原) は、細胞周期のG1期の細胞がDNA合成期(S期)に入る際に認められる核蛋白で、細胞増殖マーカーの一つである (Bravo *et al.*, 1987; Prelich *et al.*, 1987; 守内, 1988)。PCNA免疫組織化学は細胞増殖活性を評価できる手法として確立されている (Kubben *et al.*, 1994; Isobe and Yoshimura, 2007)。

本章では、ウズラ胚クロアカ腺の細胞増殖活性をPCNA免疫組織化学により解析して、化学物質の男性ホルモン攪乱作用を評価できるかを検討することを目的とした。このために卵内へのアンドロジェンおよび抗アンドロジェン作用をもつ化学物質を投与して、胚のクロアカ腺のPCNA発現細胞の分布頻度を定量的に解析した。

材料と方法

(1) 供試卵と被験物質の処理

ニホンウズラの受精卵にはクウェールコスモス社（愛知）から購入した 219 個を供試した。孵卵の条件および卵内投与（*in ovo*）法は第 2 章と同様に行った。

アンドロジェン物質としてプロピオン酸テストステロン（TP；東京化成工業株式会社（東京）、ロット番号 Y5VLF）、抗アンドロジェン物質として酢酸シプロテロン（CA；シグマアルドリッチジャパン株式会社（東京）、ロット番号 025K1270）を使用した。溶媒はコーンオイル（和光純薬株式会社、大阪）を用いた。被験物質の投与液としての調製は第 2 章と同様に行った。

処理区は、対照区、TP-L 区、TP-H 区、CA-L + TP-H 区および CA-H + TP-H の計 5 区とした。各処理区における被験物質の投与量を表 12 に示す。

表 12. 各処理区において受精卵に処理されたプロピオン酸テストステロン（TP）および酢酸シプロテロン（CA）の投与量、投与液量、投与液濃度

処理区の名 称	投与量 (μg/卵)		投与液量 (μL/卵/日)	投与液濃度 (μg/mL)	
	孵卵 12 日	孵卵 13 日		孵卵 12 日	孵卵 13 日
対照	0 *	0 *	15	0 *	0 *
TP-L	0 *	TP 30	15	0 *	TP 2,000
TP-H	0 *	TP 300	15	0 *	TP 20,000
CA-L + TP-L	CA 7.5	TP 300	15	CA 500	TP 20,000
CA-H + TP-H	CA 75	TP 300	15	CA 5,000	TP 20,000

*)：コーンオイルを投与

TP: Testosterone propionate、CA: Cyproterone acetate、溶媒: コーンオイル

(2) 組織標本の作製と PCNA 免疫組織化学染色

孵卵 16 日胚を、剖検および性腺の形態から性判別し、その後、組織標本作製用に各処理区とも雌雄各 8 例を無作為に抽出して、クロアカ腺部を 10%リン酸緩衝ホルマリン液に 3～5 日間固定した。厚さ 2 μm のパラフィン切片標本作製し、一部には HE 染色を施した。

他の切片には、PCNA 免疫組織化学染色を施した。まず、切片を脱パラフィンした後、流水で水洗し、脱塩水に浸漬した。0.01M クエン酸溶液（pH6.0）で抗原賦活（121℃で 20 分間のオートクレーブ処理）した後、PBS（和光純薬株式会社、大阪）で 5 分間×3 回洗浄し、PBS

で 15 $\mu\text{L}/\text{mL}$ に希釈したヤギ血清 (Vector Laboratories Inc., CA, 米国) を滴下し、30 分間反応させてブロッキングした後、ヤギ血清を除いた。15 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ヤギ血清で 50 倍 (4 μg IgG/mL 相当) に希釈したウサギ抗 PCNA ポリクローナル抗体 (PCNA(FL-261), Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, 米国) を切片に滴下し、4°C で終夜反応させた。次いで、PBS で 5 分間 \times 3 回洗浄後、PBS で 15 $\mu\text{L}/\text{mL}$ に希釈したビオチン標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Vector Laboratories Inc., CA, 米国) を滴下して室温で 3 時間反応させた。PBS で 5 分間 \times 3 回洗浄後、25 倍希釈したアビジン - ビオチン - ペルオキシダーゼ複合体 (Vector Laboratories Inc., CA, 米国) を滴下し、室温で 3 時間反応させた。さらに PBS で 5 分間 \times 3 回洗浄した後、発色基質 DAB-H₂O₂ (DAB TRIS Tablet、和光純薬(株)、大阪) の滴下により適度な発色を顕微鏡で観察し、発色がみられた時点で PBS による洗浄を行って発色を停止させた。コントロール染色として、ウサギ抗 PCNA ポリクローナル抗体の代わりに、PBS で 4 μg IgG/mL 相当に調整した正常ウサギ IgG を用いて反応させた後、上記と同様の操作を行った。発色後、流水による水洗を行い、脱塩水に浸漬して、核対比染色を行うため Hansen のヘマトキシリン液で 20 秒間染色した後、流水で色出しを行った。脱塩水に浸漬した後、脱水、透徹および封入を行い、同様に光学顕微鏡により標本を観察した。

(3) クロアカ腺における PCNA 陽性反応核の定量的解析

クロアカ腺の細胞核に PCNA 陽性反応が認められたため、腺単位 1 断面における腺上皮の総核数と PCNA 陽性核数をカウントし、このうち PCNA 陽性核数の割合を算出した。核数のカウントと割合の計算は、1 個体から 4 つの異なるクロアカ腺単位を抽出して行い、その平均値を当該個体の値とした。

(4) 統計学的処理

対照区と TP 処理区の間ならびに TP-H 区と CA 処理区の間での有意差検定を行った。腺細胞の全核数に対する PCNA 陽性核数の割合について、雌雄ごとに Kruskal-Wallis 検定を行い、差がある場合には Steel の多重比較検定を行った。また、雌雄間の比較を Student の t-検定で行った。P < 0.05 を有意差ありとした。

結果

組織学的には、クロアカ腺上皮は対照区では丈が低く（図 16a）、TP-H 区では丈が高く細胞質核上部に粘質を含む上皮から構成されていた（図 16b）。CA-H + TP-H 区では一部で丈の高い上皮細胞が認められたが、多くは未発達な細胞であった（図 16c）。

PCNA 免疫組織化学染色の結果、PCNA 陽性反応は対照を含む全処理区のクロアカの粘膜上皮、クロアカ腺上皮および粘膜固有層の線維芽細胞の細胞核に認められた（図 16d-f）。このうち粘膜上皮とクロアカ腺上皮には高頻度で陽性細胞が検出された。各処理区のクロアカ腺上皮における PCNA 陽性核数の割合を表 13 に示した。対照区では雌雄とも約 17%の核が PCNA 陽性を示した。この頻度は TP-L 区でも同等であったが、TP-H 区での頻度は雌雄とも約 60%で、対照区よりも有意に高かった。TP 投与前に CA を投与した CA-L + TP-H 区と CA-H + TP-H 区では、PCNA 陽性核の出現頻度は雌雄ともにそれぞれ約 60%と約 40%で、CA-H + TP-H 区は TP-H 区より低値傾向であったが、その差は有意ではなかった。

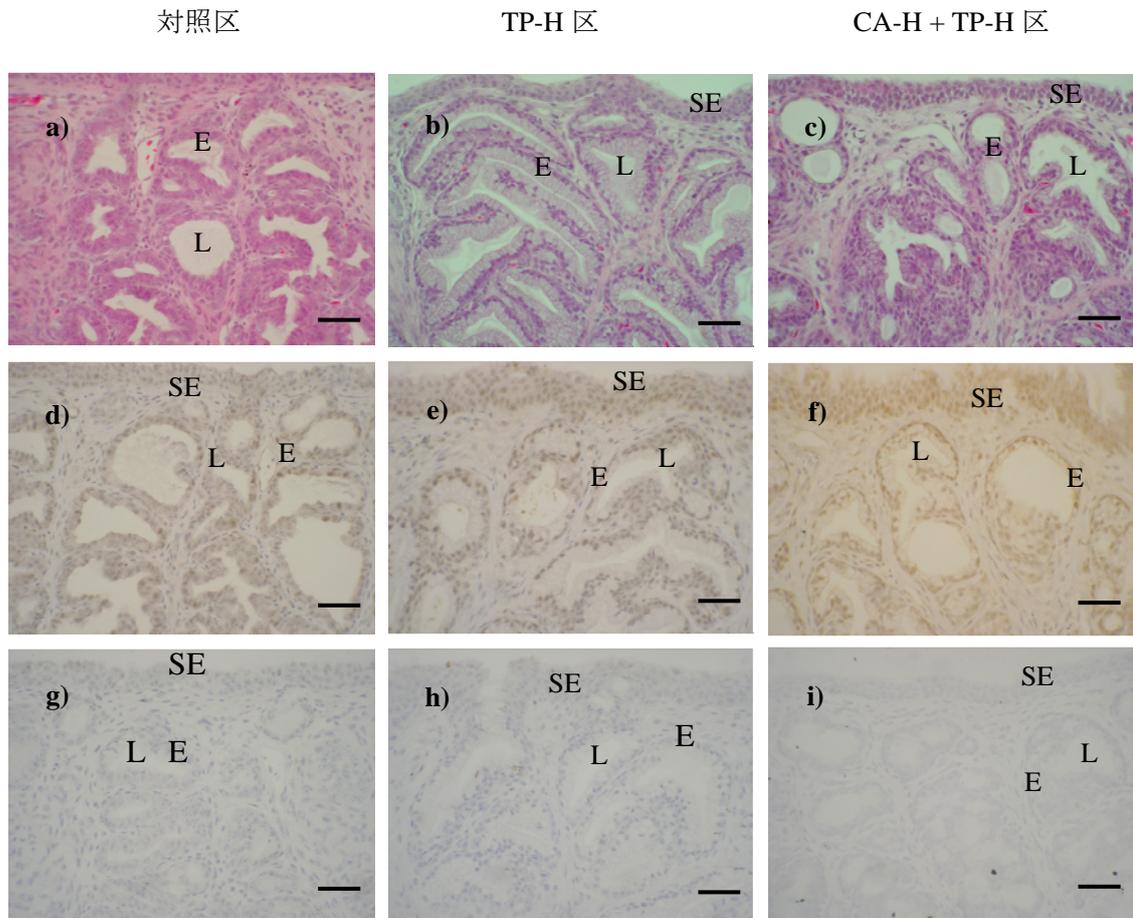


図 16. 対照（コーンオイル）、プロピオン酸テストステロン（TP）あるいは酢酸シプロテロン（CA）を投与したウズラ胚のクロアカ腺における PCNA の免疫組織化学染色

a, d, g: 対照区、b, e, h: TP-H 区、c, f, i: CA-H + TP-H 区。

a~c: HE 染色像。TP-H 区(b) の腺単位はより発達している。

d~f: 抗 PCNA 免疫組織化学染色像。対照(d)、TP-H(e)および CA-H + TP-H(f)のいずれの処理区にも、クロアカ腺部の粘膜上皮と、クロアカ腺細胞の細胞核に陽性反応産物が認められる。

g~i: コントロール染色像。いずれの処理区も陽性反応は認められない。

E = クロアカ腺上皮、L = クロアカ腺腔、SE = 粘膜上皮。スケールバーは 30 μm を示す。

表 13. 対照区、プロピオン酸テストステロン (TP) 区または酢酸シプロテロン (CA) 区のウズラ胚クロアカ腺上皮における PCNA 陽性核数の割合

処理区	PCNA 陽性核数の割合 (%)	
	オス	メス
対照	17.1 ± 7.0	16.5 ± 6.0
TP-L	17.8 ± 6.3	17.0 ± 6.1
TP-H	64.3 ± 19.6 **	57.6 ± 16.2 **
CA-L + TP-H	60.9 ± 10.8	57.4 ± 23.3
CA-H + TP-H	46.2 ± 26.3	36.7 ± 22.5

数値は平均値 ± SD (n = 8)。

(PCNA 陽性核数 / 腺単位における腺上皮の総核数 × 100)

対照区と TP 処理区の間ならびに TP-H 区と CA 処理区の間で腺単位における腺上皮の総核数に対する PCNA 陽性核数の割合について、雌雄ごとに Kruskal-Wallis 検定を行い、差がある場合には Steel の多重比較検定を行った。また、雌雄間の比較を Student の t-検定で行った。P < 0.05 を有意差ありとした。

**：対照区との間に有意差あり (P < 0.01)。

考察

第2章でウズラ胚にアンドロジェンを作用させるとクロアカ腺の肥大と腺単位が発達することを示した。本章はこの過程で細胞増殖が活性化されるものと推定し、PCNA 免疫染色により細胞増殖頻度を解析することにより、化学物質のアンドロジェンと抗アンドロジェン作用が評価できるかを検討したものである。

PCNA は細胞周期のうち DNA 合成期に出現する核蛋白で、増殖中の細胞を同定できるマーカーである (守内, 1988)。これにより 16 日胚のクロアカ腺部の増殖中の細胞を検出すると、対照区でクロアカ腺上皮と粘膜上皮の上皮組織、固有層の線維芽細胞に陽性核が検出され、このうちでも両上皮組織に多く認められた。このことから、発育中の胚のため多様な組織で細胞増殖が起こるが、特に上皮組織での増殖は活発であるものと考えられる。

次に、クロアカ腺上皮に焦点を絞って解析したところ、アンドロジェン物質の TP を投与した TP-L 区では、PCNA 陽性核の出現頻度は対照区との間に差を示さなかったが、TP-H 区では雌雄ともに有意に増加した。このことから、TP はクロアカ腺上皮細胞の増殖を促進するもので、これがクロアカ腺部の肥大や腺単位の発育をもたらすものと考えられた。テストステロンは哺乳類副生殖腺の細胞増殖を伴う肥大も誘導する (Neumann and Berswordt-Wallrabe, 1966 ; Lesser and Bruchovsky, 1973 ; Morizane *et al.*, 2005)。また、テストステロンはエストラジオールとの共存で胚生殖細胞、骨芽細胞、松果体細胞の増殖をもたらす (Haldar *et al.*, 2003 ; Liu *et al.*, 2005 ; Chen *et al.*, 2010)。

アンドロジェン受容体は、アンドロジェンとの結合で DNA 反応部位と結合して遺伝子発現と蛋白合成を誘導する核内受容体と (Lamont and Tindall, 2010)、細胞膜に存在してアンドロジェンとの結合により短時間で細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化などをもたらして作用発現する細胞膜受容体に大別される (Foradori *et al.*, 2008)。このうち、細胞増殖を刺激する受容体は核内受容体で (Lamont and Tindall, 2010)、本論文第2章ではクロアカ腺上皮細胞にアンドロジェン核受容体の遺伝子発現を認めた。従って、本実験で胚クロアカ腺上皮細胞の増殖を TP が促進した機構は、他の組織でのテストステロンによる細胞増殖刺激と同様に、TP が核内アンドロジェン受容体と結合したことによるものと考えられる。

次に、TP 300 μ g/卵を投与する前日に CA を 7.5 あるいは 75 μ g/卵投与した CA-L + TP-H 区と CA-H + TP-H 区では、雌雄ともにクロアカ腺上皮の PCNA 陽性核数の出現頻度は TP-H 区と比較して低値傾向であったが、有意ではなかった。CA は核内アンドロジェン受容体と結合して、アンドロジェンの作用を競合的に抑制する (Hosokawa *et al.*, 1993 ; Sonneveld *et*

al., 2005)。第2章と第3章で、CAはTPのクロアカ腺上皮細胞の形態分化誘導やVVAレクチン結合物質の産生を抑制したため、その抗アンドロジェン作用を胚体内で発現することは明らかである。

PCNA検出による細胞増殖活性で評価した時に、CAによるTPの作用の抑制が認められなかった理由として、次のことが推察される。(1) 胚では対照区の結果から判断して、基礎的な細胞増殖活性が高い。これにTPを作用させるとクロアカ腺上皮細胞の増殖活性はさらに高まるが、基礎的増殖活性も高いため、PCNA陽性核の出現頻度としてはTPによる上昇幅は小さく、このためCAの作用は検出し難かった。(2) 細胞増殖は低レベルのアンドロジェンで促進され、今回用いた用量のCAではTPの作用を抑制するには至らなかった。

以上のことから、クロアカ腺上皮細胞の細胞増殖活性をPCNA免疫組織化学的に解析した場合、化学物質のアンドロジェン作用を評価するには有用ではあるが、抗アンドロジェン作用を評価するには適さないと考えられた。

要約

本章では、ウズラ胚クロアカ腺の細胞増殖活性の PCNA 免疫組織化学による解析で、化学物質の男性ホルモン攪乱作用を評価できるかを検討することを目的に行った。このために卵内へアンドロジェンおよび抗アンドロジェン作用をもつ化学物質を投与して、胚のクロアカ腺の PCNA 発現細胞の分布頻度を定量的に解析した。処理区は、対照区、TP-L 区、TP-H 区、CA-L + TP-H 区および CA-H + TP-H 区とした。

その結果、PCNA 陽性反応は対照を含む全処理区のクロアカの粘膜上皮、クロアカ腺上皮および粘膜固有層の線維芽細胞の細胞核に認められた。このうち粘膜上皮とクロアカ腺上皮には高頻度で陽性細胞が検出された。対照区のクロアカ腺上皮では雌雄とも約 17%の核が PCNA 陽性を示した。この頻度は TP-L 区でも同等であったが、TP-H 区での頻度は雌雄とも約 60%で、対照区よりも有意に高かった。TP 投与前に CA を投与した CA-L + TP-H 区と CA-H + TP-H 区では、PCNA 陽性核の出現頻度は雌雄ともにそれぞれ約 60%と約 40%で、CA-H + TP-H 区は TP-H 区より低値傾向であったが有意ではなかった。

PCNA 検出による細胞増殖活性で CA による TP の作用の抑制が認められなかった理由として、胚では基礎的な細胞増殖活性が高く、TP を作用させても PCNA 陽性核の出現頻度としては TP による上昇幅は小さく、このため CA の作用は検出し難かった可能性、あるいは、細胞増殖は低レベルのアンドロジェンで促進され、今回用いた用量の CA では TP の作用を抑制するには至らなかった可能性が考えられた。

本章の結果から、クロアカ腺上皮細胞の細胞増殖活性を PCNA 免疫組織化学的に解析した場合、化学物質のアンドロジェン作用を評価するには有用ではあるが、抗アンドロジェン作用を評価するには適さないと考えられた。

第 5 章 ウズラ胚クロアカ腺を指標とした化学物質の男性ホルモン攪乱作用評価法の汎用性の実証

緒言

第 2 章と第 3 章で、ウズラ受精卵にプロピオン酸テストステロン (TP) を投与すると胚のクロアカ腺の肥大と腺上皮の分化が誘導され、また、腺細胞内に VVA レクチン結合物質が出現することが示された。第 4 章では、この TP を投与した胚のクロアカ腺で細胞増殖が活性化されることも示された。TP を作用させる前に、アンドロジェン受容体に対してアンドロジェンと競合的に作用して抗アンドロジェン作用を示すことが知られている酢酸シプロテロン (CA) を卵内に投与すると、TP による胚クロアカ腺の発達抑制が抑制されることも明らかとなった。一連の CA によるクロアカ腺の発達と分化の抑制は、アンドロジェン受容体との結合を競合的に阻害するものと考えられた。この原理を利用して、ウズラ胚のクロアカ腺を指標とした化学物質のアンドロジェンと抗アンドロジェン作用の定量的な評価系を構築できた。環境中のさまざまな化学物質の抗アンドロジェン作用の有無を評価するのに際して、この評価系を汎用的に用いることができることを実証するためには、CA 以外の化学物質でも抗アンドロジェン作用を評価できることを示す必要がある。

フルタミドは以下の構造式を有する非ステロイド性の化学物質で (図 17)、アンドロジェン受容体に結合して抗アンドロジェン性の作用を示す。

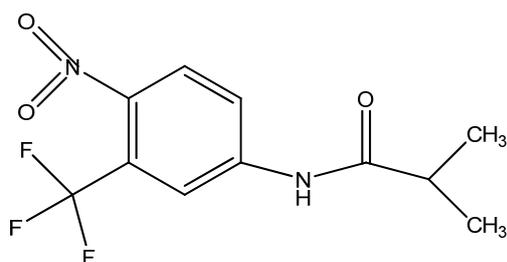


図 17. フルタミドの化学構造式

このフルタミドの抗アンドロジェン作用は哺乳類で確立されており (Neri *et al.*, 1972 ; Liao *et al.*, 1974)、ヒトでは前立腺がんの治療にも用いられている。鳥類においても、フルタミドは神経系や内分泌系に発現するアンドロジェン受容体を阻害するための実験系に用いられており、これを投与すると、雄ツバメの闘争行動を抑制すること (Sperry *et al.*, 2010)、ゼブラフィンの精巣を退縮させること (Grisham *et al.*, 2007)、産卵鶏で黄体形成ホルモン

のサージとそれに次いで起こる排卵を抑制すること (Rangel *et al.*, 2006) が報告されている。さらに、鳥類で化学物質の抗アンドロジェン作用の評価系を構築するために行われた先行研究でも用いられており、ウズラのクロアカ腺は去勢により退行するが、これにテストステロンを投与すると発達し、同時にフルタミドを投与するとテストステロンによる発達が抑制されたと報告されている (Liang *et al.*, 2004)。

本章では、ウズラ受精卵に化学物質とアンドロジェンを投与して、胚のクロアカ腺に及ぼす影響から化学物質の抗アンドロジェン作用を評価するというシステムが、CA 以外の化学物質の評価にも汎用的に用いることができるかどうかを明らかにすることを目的とした。このために、抗アンドロジェン作用を示す化学物質としてフルタミドを用い、受精卵にフルタミドと TP を投与して、実験 1 ではクロアカ腺の上皮組織の発達、実験 2 では VVA レクチン結合物質の出現、および実験 3 で細胞増殖活性を解析した。

材料と方法

(1) 供試卵と被験物質の処理

ニホンウズラの受精卵はクウェールコスモス社 (愛知) から購入した 140 個を供試した。孵卵の条件および卵内投与 (*in ovo*) 法は第 2 章と同様とした。

プロピオン酸テストステロン (TP) は和光純薬(株) (大阪) のロット番号 KLP2023 のもの、フルタミド (Flutamide、以降 FL と略) はシグマアルドリッチジャパン(株) (東京) のロット番号 034K14590 のものを使用した。いずれもコーンオイルを溶媒として投与液を調製した。処理区は対照区、TP-H 区、FL-L + TP-H 区および FL-H + TP-H 区の計 4 区とした。各処理区における被験物質の投与量を表 14 に示す。

表 14. 各処理区において受精卵に処理されたプロピオン酸テストステロン (TP) およびフルタミド (FL) の投与量、投与液量、投与液濃度

処理区の 名称	投与量 (μg/卵)		投与液量 (μL/卵/日)	投与液濃度 (μg/mL)	
	孵卵 12 日	孵卵 13 日		孵卵 12 日	孵卵 13 日
対照	0 *	0 *	15	0 *	0 *
TP-H	0 *	TP 300	15	0 *	TP 20,000
FL-L + TP-H	FL 12	TP 300	15	FL 800	TP 20,000
FL-H + TP-H	FL 120	TP 300	15	FL 8,000	TP 20,000

*) : コーンオイルを投与

TP: Testosterone propionate、FL: Flutamide、溶媒: コーンオイル

(2) 剖検と組織標本の作製

孵卵 16 日に第 2 章と同様に屠殺、剖検および性判別した。クロアカ腺部を 10%リン酸緩衝ホルマリン液に 3~5 日間固定し、第 2 章と同様に 2 μm のパラフィン切片標本を作製した。実験 1 として、一部は HE 染色し、また、一部は過ヨウ素酸 Shiff 反応 - ヘマトキシリン (PAS-H) 染色を施した。他の切片は、実験 2 の VVA レクチン結合物質の組織化学的解析と、実験 3 における細胞増殖活性の解析に用いた。

実験 1 男性ホルモンを投与したウズラ胚クロアカ腺における組織発達に及ぼすフルタミドの影響の解析

プロピオン酸テストステロン (TP) よびフルタミド (FL) を投与した対照、TP-H、FL-L + TP-H および FL-H + TP-H の各処理区の供試ウズラのうちから、雌雄各 10 例を無作為に抽出した。作製した HE 染色標本を用いて、第 2 章と同様に全腺単位に対する発達した腺単位の割合を算出した。発達した腺単位は、上皮細胞の丈が高く、核上部の細胞質に粘液様物質を貯留しているものとした。

実験 2 男性ホルモンを投与したウズラ胚クロアカ腺における糖鎖発現活性に及ぼすフルタミドの影響の解析

対照区、TP-H 区、FL-L + TP-H 区および FL-H + TP-H 区のうちから、雌雄各 10 例の標本を用いた。各個体のクロアカ腺の薄切標本に、第 3 章と同じ方法で VVA レクチンの組織化学染色を施した。顕微鏡画像解析装置 (Image-Pro Plus, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, 米国) を用いて VVA 陽性シグナルを計測し、クロアカ腺上皮組織の単位面積あたりの VVA 陽性反応面積の割合を VVA 結合物質の密度として算出した。解析は 1 個体について異なる 2 箇所で行い、その平均値を当該個体の値とした。

実験 3 男性ホルモンを投与したウズラ胚クロアカ腺における細胞増殖活性に及ぼすフルタミドの影響の解析

アンドロジェンおよび抗アンドロジェン作用物質投与に伴うクロアカ腺の PCNA 発現細胞の分布頻度を定量的に解析した。対照、TP-H、FL-L + TP-H および FL-H + TP-H の計 4 処理区のそれぞれから雌雄各 10 例を抽出した。第 4 章と同様にクロアカの PCNA 免疫組織化学染色を行い、クロアカ腺上皮細胞の PCNA 陽性核数の割合を算出した。

(3) 統計学的処理

対照区と TP-H 区の間ならびに TP-H 区と FL 処理区間の有意差検定を行った。実験 1 では全クロアカ腺単位に対する発達した腺単位の割合、実験 2 ではクロアカ腺上皮における VVA レクチン結合物質の密度、実験 3 ではクロアカ腺上皮における PCNA 陽性細胞核の出現頻度について、雌雄ごとに検定した。対照区と TP-H 区の比較では Mann-Whitney の U 検定を行った。TP-H 区と FL 処理区の比較では Kruskal-Wallis 検定を行い、差がある場合には Steel の多重比較検定を行った。また、雌雄間の比較を Student の t-検定で行った。さらに、胚の生存率を Fisher の直接確立計算法で検定した。P < 0.05 を有意差ありとした。

結果

実験 1 男性ホルモンを投与したウズラ胚クロアカ腺における組織発達に及ぼすフルタミドの影響の解析

剖検所見

孵卵 16 日の剖検の結果、胚の生存率はいずれの被験物質区も対照区との間に差はなかった（表 15）。生存胚の外形観察の結果、クロアカ背側部の肥大が TP-H 区の雌雄で認められた。対照区、FL-L + TP-H 区および FL-H + TP-H 区の胚に外形の異常はみられなかった。剖検では、いずれの区にも内臓の異常は認められなかった。

組織学的所見

クロアカ腺の構造は TP および FL 投与の有無やそれらの濃度にかかわらず全区の胚に認められた（図 18）。TP-H 区の腺細胞の多くは細胞の丈が高く細胞質に粘液様物質を有する発達した腺細胞であった（図 18b）。FL 投与区の腺単位は発達した腺と、細胞の丈は低く細胞質の粘液様物質も少ない未発達な腺が混在して構成されていた（図 18c）。発達した腺細胞は対照区ではみられなかった（図 18a）。PAS 陽性反応は未発達な腺細胞にもわずかに認められたが（図 18d, f）、発達した腺細胞には強い PAS 陽性反応が核上部細胞質に認められた（図 18e）。

対照区では発達した腺単位は認められず、TP-H 区では全腺単位に対する発達した腺単位の割合は、オスで 76.3%、メスで 58.8%を示し、対照区に比べて有意に高かった。また、その割合は、オスでは、TP を投与する前日に FL を投与した FL-L + TP-H で 28.9%、および FL-H + TP-H で 42.9%と、TP-H 区に比べて有意に低かった（それぞれ $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ ）。一方、メスでは、FL 投与区に TP-H 区との有意な差は認められなかった。いずれの区にも発達した腺単位の割合に雌雄の差はなかった（表 16）。

実験 2 男性ホルモンを投与したウズラ胚クロアカ腺における糖鎖発現活性に及ぼすフルタミドの影響の解析

供試したクロアカ腺は、対照区では組織学的に未発達で（図 19a）、TP-H 区では上皮の全体で腺細胞の丈の発達と粘液様物質の貯留を伴う発達がみられ（図 19b）、FL-H + TP-H 区でも上皮の発達が若干認められた（図 19c）。VVA レクチンで染色すると、対照区では陽性シグナルはみられず（図 19d, g）、TP-H 区では腺のヒダを被う上皮の全体に陽性シグナル

がみられ (図 19e)、この反応産物は核上部に検出された (図 19h)。FL-H + TP-H 区でも、VVA レクチン陽性シグナルが上皮に検出されたが、一部の細胞はシグナルを示さなかった (図 19f, i)。

VVA レクチン結合物質の密度は対照区の雌雄とも 0.4%と軽微であった。オスでは、VVA レクチン結合物質の密度は TP-H 区で 8.7%となり対照区に比べて有意に多く ($P < 0.01$)、TP を投与する前日に FL を投与した FL-L + TP-H 区および FL-H + TP-H 区ではそれぞれ 2.8%および 4.1%で TP-H 区と比べて有意に少なかった (いずれも $P < 0.01$)。一方、メスでは、TP-H 区で 6.6%と対照区に比べて密度の有意な上昇と ($P < 0.01$)、FL-L + TP-H 区で 3.1%と TP-H 区に比べて有意な抑制効果が認められた ($P < 0.01$)。FL-H + TP-H 区では 4.9%と TP-H 区と比べての有意差はなかった。いずれの処理区にも VVA レクチン結合物質の密度に雌雄差は認められなかった (表 17)。

実験 3 男性ホルモンを投与したウズラ胚クロアカ腺における細胞増殖活性に及ぼすフルタミドの影響の解析

供試したクロアカ腺は、対照区では組織学的に未発達で (図 20a)、TP-H 区で発達し (図 20b)、FL-H + TP-H 区では上皮の一部が発達していた (図 20c)。PCNA 免疫組織化学染色の結果、PCNA 陽性反応は対照区を含む全区クロアカ腺の細胞核に認められたが (図 20d-f)、TP-H 区ではクロアカ腺上皮と粘膜上皮の全長にわたって陽性細胞が認められた (図 20e)。

TP-H 区の PCNA 陽性核数の約 60~65%は、対照区の約 17~18%と比較して雌雄とも有意に高値であった ($P < 0.01$)。一方、FL を投与した FL-L + TP-H 区と FL-H + TP-H 区の PCNA 陽性核数は約 53~62%で、雌雄ともに TP-H 区と比較して低値傾向であったが有意差を伴わなかった。対照を含むいずれの区にも陽性細胞の割合に雌雄間の差はなかった (表 18)。

表 15. 対照区、プロピオン酸テストステロン (TP) 区またはフルタミド (FL) 区のウズラ胚の生存率

処理区	使用した 受精卵数	孵卵 16 日の生存胚数		生存率 (%) ^{a)}
		オス	メス	
対照	32	12	11	71.9
TP-H	38	15	19	89.5
FL-L + TP-H	34	11	15	76.5
FL-H + TP-H	36	16	10	72.2

^{a)} 孵卵 16 日の生存胚数 / 使用した受精卵数 × 100

各区の間で胚の生存率に有意差なし (Fisher の直接確立計算法)。

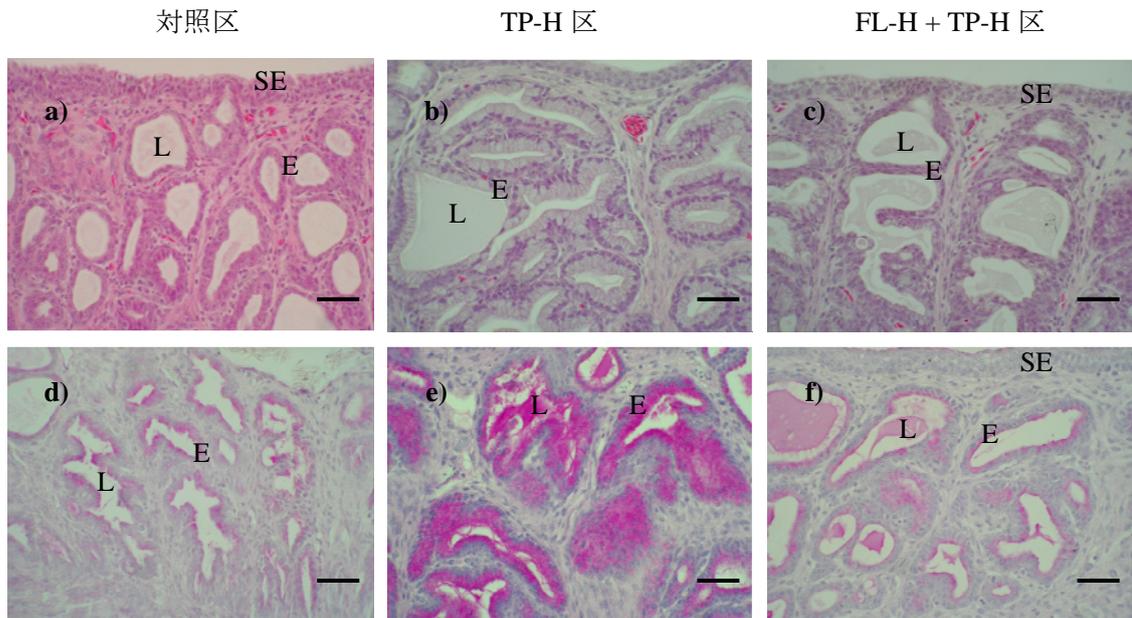


図 18. 対照 (コーンオイル)、プロピオン酸テストステロン (TP) あるいはフルタミド (FL) を投与したウズラ胚のクロアカ腺の組織像

a, d: 対照区、b, e: TP-H 区、c, f: FL-H + TP-H 区。

a~c: HE 染色像。TP-H 区(b)の腺の多くは発達した腺細胞 (細胞の丈が高く細胞質に粘液様物質を有す) で、FL-H + TP-H 区(c)の腺単位は未発達な腺 (細胞の丈が低く細胞質の粘液様物質も少ない) も認められる。

d~f: PAS-H 染色像。PAS 陽性反応が細胞質核上部に認められるが、その反応物質の量は TP-H 区(e)に比べ対照区(d)および FL-H + TP-H 区(f)で少ない。

E = クロアカ腺上皮、L = クロアカ腺腔、SE = 粘膜上皮。スケールバーは 30 μm を示す。

表 16. 対照区、プロピオン酸テストステロン (TP) 区またはフルタミド (FL) 区のウズラ胚クロアカ腺における発達した腺単位の割合

処理区	発達した腺単位の割合 (%)	
	オス	メス
対照	0	0
TP-H	76.3 ± 18.4 **	58.8 ± 22.9 *
FL-L + TP-H	28.9 ± 21.9 ##	36.1 ± 30.3
FL-H + TP-H	42.9 ± 32.4 #	51.7 ± 24.7

数値は平均値 ± SD (n = 10)。

(発達腺単位数 / 総腺単位数 × 100)

全腺単位に対する発達した腺単位の割合について、雌雄ごとに、対照区と TP-H 区の比較では Mann-Whitney の U 検定を行い、TP-H 区と FL 処理区の比較では Kruskal-Wallis 検定を行い、差がある場合には Steel の多重比較検定を行った。また、雌雄間の比較を Student の t-検定で行った。P < 0.05 を有意差ありとした。

*, **: 対照区との間に有意差あり (P < 0.05, 0.01)。

#, ##: TP-H 区との間に有意差あり (P < 0.05, 0.01)。

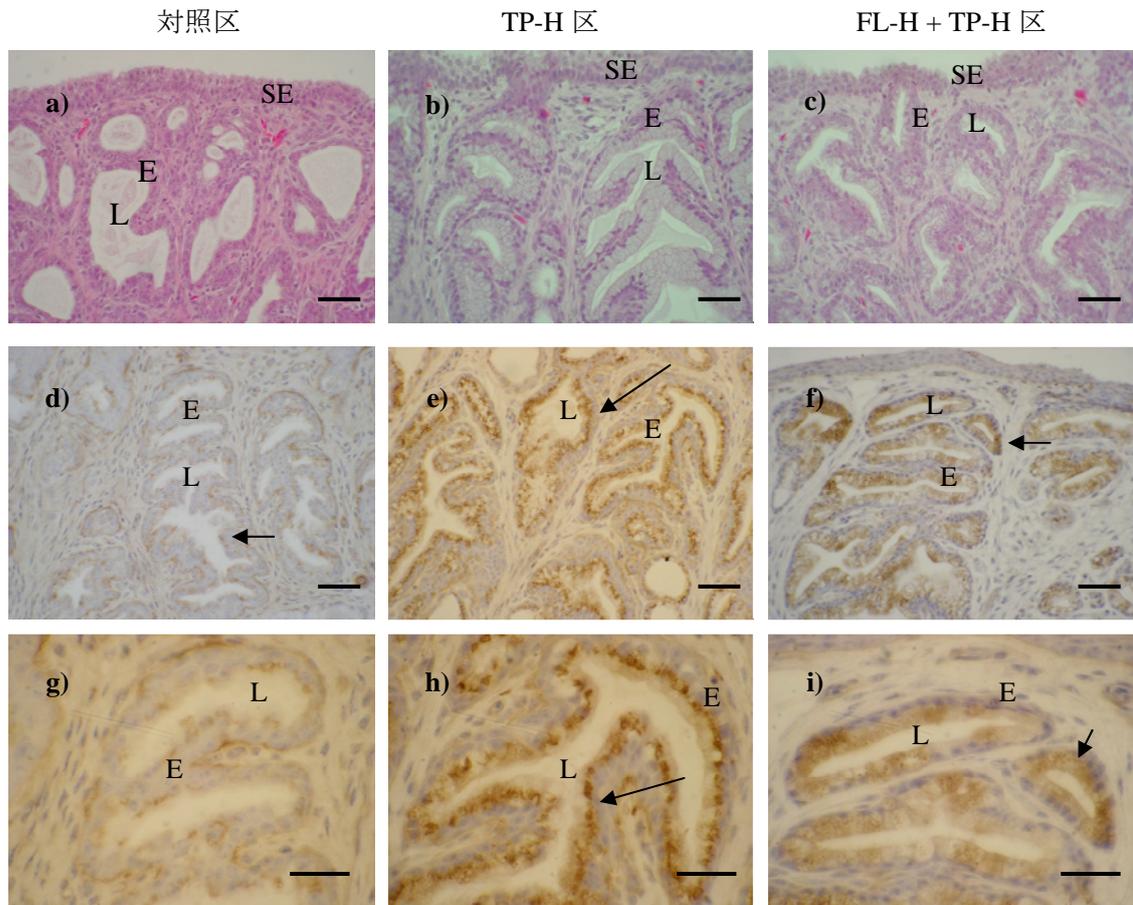


図 19. 対照 (コーンオイル)、プロピオン酸テストステロン (TP) あるいはフルタミド (FL) を投与したウズラ胚のクロアカ腺の VVA レクチン組織化学染色像

a, d, g: 対照区、b, e, h: TP-H 区、c, f, i: FL-H + TP-H 区。

a~c: HE 染色像。TP-H 区(b)の腺細胞の多くは発達した腺細胞 (細胞の丈が高く細胞質に粘液様物質を有す) で、対照区(a)や FL-H + TP-H 区(c)の多くの腺単位は未発達な腺 (細胞の丈が低く細胞質の粘液様物質も少ない) により構成されている。

d~i: VVA レクチン組織化学染色像。VVA 結合物質の強いシグナル(長い矢印)は、TP-H 区 (e, h)の腺単位を形作る腺上皮細胞中に認められ、細胞質の粘液様物質中に特異的に存在する。対照区の VVA 結合物質の量はないか、あっても極少量である (d: 短い矢印)。FL-H + TP-H 区のクロアカ腺上皮の細胞質にも VVA 結合物質は認められる (f, i: 短い矢印)。

E = クロアカ腺上皮、L = クロアカ腺、SE = 粘膜上皮。スケールバーは a~f は 30 μm 、g ~i は 20 μm を示す。

表 17. 対照区、プロピオン酸テストステロン (TP) 区またはフルタミド (FL) 区のウズラ胚クロアカ腺における VVA レクチン結合物質の密度

処理区	レクチン結合物質の密度 (%)	
	オス	メス
対照	0.4 ± 0.7	0.4 ± 0.8
TP-H	8.7 ± 1.4 **	6.6 ± 1.8 **
FL-L + TP-H	2.8 ± 2.3 ##	3.1 ± 1.6 ##
FL-H + TP-H	4.1 ± 2.7 ##	4.9 ± 2.5

数値は平均値 ± SD (n = 10)。

(VVA 陽性反応の面積 / 腺組織の単位面積 × 100)

腺組織の単位面積あたりの VVA 陽性反応面積の割合 (VVA 結合物質の密度) について、雌雄ごとに、対照区と TP-H 区の比較では Mann-Whitney の U 検定を行い、TP-H 区と FL 処理区の比較では Kruskal-Wallis 検定を行い、差がある場合には Steel の多重比較検定を行った。また、雌雄間の比較を Student の t-検定で行った。P < 0.05 を有意差ありとした。

** : 対照区との間に有意差あり (P < 0.01)。

: TP-H 区との間に有意差あり (P < 0.01)。

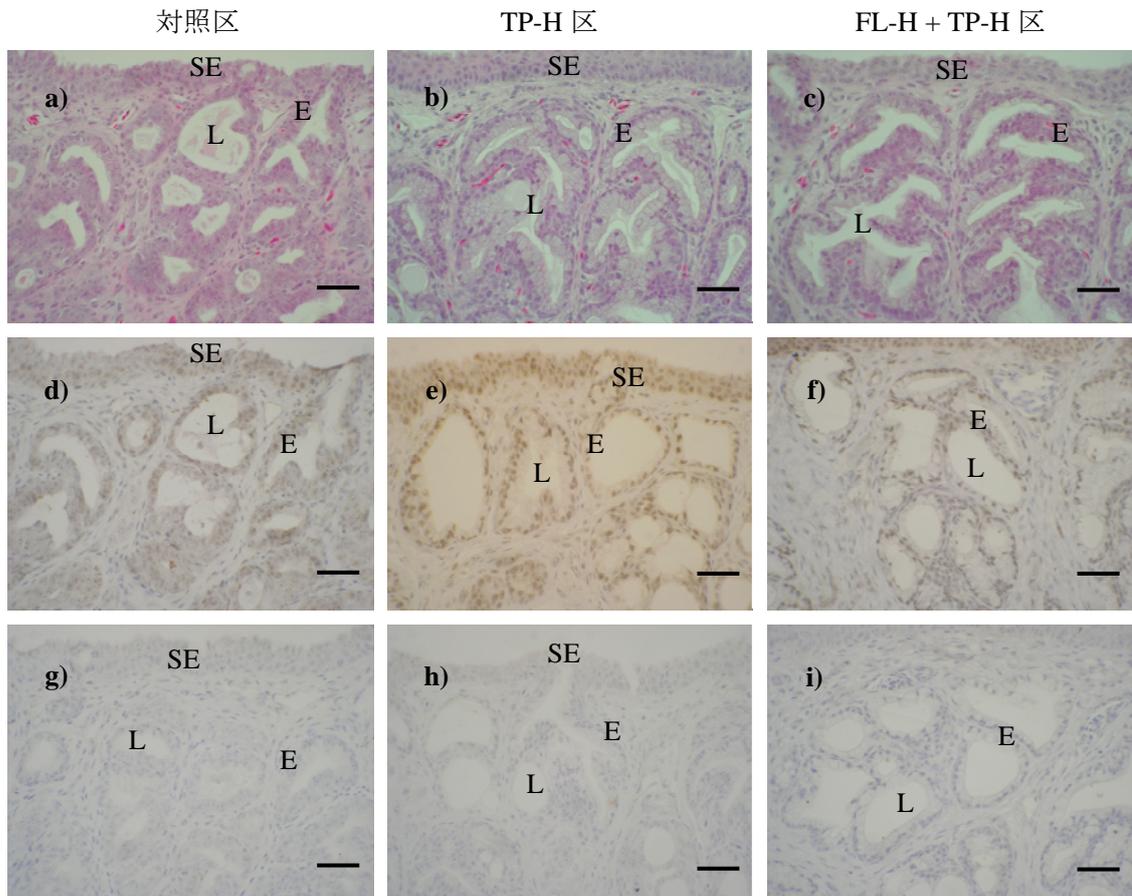


図 20. 対照 (コーンオイル)、プロピオン酸テストステロン (TP) あるいはフルタミド (FL) を投与したウズラ胚クロアカ腺における PCNA の免疫組織化学染色

a, d, g: 対照区、b, e, h: TP-H 区、c, f, i: FL-H + TP-H 区。

a~c: HE 染色像。TP-H 区(b) の腺単位はより発達している。

d~f: 抗 PCNA 免疫組織化学染色像。対照(d)、TP-H(e)および FL-H + TP-H(f)のいずれの処理区にも、クロアカの粘膜上皮と、クロアカ腺細胞の細胞核に陽性反応産物が認められる。

g~i: コントロール染色像。いずれの処理区も陽性反応は認められない。

E = クロアカ腺上皮、L = クロアカ腺腔、SE = 粘膜上皮。スケールバーは 30 μm を示す。

表 18. 対照区、プロピオン酸テストステロン (TP) 区またはフルタミド (FL) 区のウズラ胚クロアカ腺における PCNA 陽性核数の割合

処理区	PCNA 陽性核数の割合 (%)	
	オス	メス
対照	16.9 ± 6.3	18.4 ± 7.0
TP-H	65.1 ± 17.4 **	59.7 ± 15.1 **
FL-L + TP-H	62.0 ± 9.3	55.1 ± 11.8
FL-H + TP-H	52.4 ± 8.7	53.8 ± 6.3

数値は平均 ± SD (n = 10)。

(PCNA 陽性核数 / 腺単位における腺上皮の総核数 × 100)

腺単位における腺上皮の総核数に対する PCNA 陽性核数の割合について、雌雄ごとに、対照区と TP-H 区の比較では Mann-Whitney の U 検定を行った。TP-H 区と FL 処理区の比較では Kruskal-Wallis 検定を行い、差がある場合には Steel の多重比較検定を行った。また、雌雄間の比較を Student の t-検定で行った。P < 0.05 を有意差ありとした。

**：対照区との間に有意差あり (P < 0.01)。

考察

前章までに CA を用いて開発した化学物質の抗アンドロジェン作用の評価法が、他の化学物質に対しても汎用的に適用できることを検証することを目的とした。FL は核内アンドロジェン受容体と結合することにより競合的に抗アンドロジェン作用を示す (Liao *et al.*, 1974 ; Hosokawa *et al.*, 1993)。TP 300 μg /卵を投与した受精卵 (TP-H 区) で、オス胚のクロアカ腺の有意な組織発達と上皮細胞の分化が誘発され、VVA レクチン結合物質の密度が上昇した。一方、TP 300 μg /卵を投与する前日に FL を 12 あるいは 120 μg /卵投与すると (各々 FL-L + TP-H 区、FL-H + TP-H 区)、オス胚のクロアカ腺の組織発達と上皮細胞の分化は有意に抑制され、VVA 結合物質の密度も TP-H 区に比べて有意に低下した。また、メス胚でも FL-L + TP-H 区で VVA 結合物質の密度の有意な低下がみられた。このことは、FL が TP のアンドロジェン作用を有意に抑制させることを示しており、CA を用いた試験法と共通する結果であった。クロアカ腺の細胞増殖活性の定量的解析から FL の抗アンドロジェン作用を評価することも試みたが、第 4 章と同じく、この評価法では作用の有意性を示さなかったため、鋭敏性に劣ると思われた。

成熟したオスウズラのクロアカ腺部の膨隆は、去勢により減少し、これにテストステロンを投与すると発達することをクロアカ表面からの計測で示すことができるが (Wada, 1981 ; Li *et al.*, 2006)、Liang *et al.* (2004) はフルタミドを投与するとこのテストステロン投与による発達が抑制されることから、フルタミドの抗アンドロジェン作用を評価した。彼らは、ウズラの体重 100g あたり 10,000 μg の FL を投与して抗アンドロジェン作用を示し、一方、100 μg の FL 投与では抗アンドロジェン作用は示されなかった。本実験で用いた胚の重量は約 10 g で、12 μg の FL 投与 (100g あたり 120 μg FL に相当) で有意差が検出されたため、検出感度は本研究の評価系が高いと考えられる。

メス胚では FL 12 μg /卵投与 (FL-L + TP-H 区) した場合にのみ VVA レクチン結合物質の密度の有意な抑制がみられ、オス胚に比べて抑制作用は弱かった。この結果からも、CA を用いた試験と同様に、雌雄の間でアンドロジェンと抗アンドロジェン作用に差があると考えられ、1 つの評価試験に雌雄の胚を混在させることは適当ではないといえる。

オス胚において、TP により誘発したクロアカ腺の組織発達および VVA レクチン結合物質密度が前日の FL 投与により有意に抑制されたが、いずれの指標でも FL-H + TP-H 区より FL-L + TP-H 区で値が高く、FL 投与の用量依存性は認められなかった。同様の傾向は両評価指標においてメス胚でもみられた。このことから、今回の評価系において試験した濃度

の範囲では、FL の抗アンドロジェン作用は FL 12 µg/卵投与で既にプラトーに達し、FL 濃度が閾値を越えるとアンドロジェン受容体の感受性の低下が起こる可能性や、生物的反応が不安定になる可能性が推定された。

以上のことから、これまでに開発した化学物質のアンドロジェンと抗アンドロジェン作用評価 3 手法を、別の抗アンドロジェン化学物質のフルタミドで試験したところ、ウズラ胚のクロアカ腺の組織学的発達と VVA レクチン結合物質が増加するという CA を用いた場合と共通的な結果が得られた。このため、本評価法は鳥類においてアンドロジェンおよび抗アンドロジェン物質を評価する上で汎用的に用いることができると考えられた。

要約

本章では、ウズラ受精卵に化学物質とアンドロジェンを投与して、胚のクロアカ腺に及ぼす影響から化学物質の抗アンドロジェン作用を評価するというシステムが、酢酸シプロテロン (CA) 以外の化学物質の評価にも汎用的に用いることができるかどうかを明確にすることを示すことを目的に行った。抗アンドロジェン作用を示す化学物質としてフルタミド (FL) を用い、受精卵に FL とプロピオン酸テストステロン (TP) を投与して、クロアカ腺の上皮組織の発達、VVA レクチン結合物質の出現、および細胞増殖活性を解析した。

試験区は、受精卵にコーンオイルを投与した対照区、TP 300 μg /卵を投与した TP-H 区、TP 投与前日に FL 12 μg /卵を投与した FL-L + TP-H 区、FL 120 μg /卵を投与した FL-H + TP-H 区を設定した。これらの胚のクロアカ腺で、上皮細胞の発達の組織学的解析、VVA レクチン結合物質の密度の測定、PCNA 染色による細胞増殖活性の解析を行ったところ、上皮細胞が分化を示す発達した腺単位は対照区では認められず、TP-H 区では雌雄ともに対照区に比べて有意に高値であった。また、FL-L + TP-H 区と FL-H + TP-H 区では、TP-H 区に比べその割合はオスでは有意に低かったが、メスでは有意な差は認められなかった。VVA レクチンで染色すると、対照区では陽性シグナルはみられず、TP-H 区では腺のヒダを被う上皮の全体に陽性シグナルがみられた。VVA レクチン結合物質の腺上皮における密度は、TP-H 区と比べてオスでは FL-L + TP-H 区および FL-H + TP-H 区で有意に少なかったが、メスでは FL-L + TP-H 区だけで有意に少なかった。細胞増殖活性には、FL の有意な影響は認められなかった。

以上のことから、ウズラ胚のクロアカ腺の組織学的発達と VVA レクチン結合物質の密度の解析は、化学物質のアンドロジェンおよび抗アンドロジェン物質を評価する方法として汎用的に用いることができるものと考えられた。

第6章 総合考察

世界的な環境保全意識が高揚する中、非標的野生生物に対する農薬など化学物質の影響評価が益々重要になってきており、世界各国で水域・陸域生態影響評価が重要な登録要件として取り扱われている（内海, 2009, 2010）。最近の内分泌攪乱化学物質に関する規制動向として、欧州では2009年、生態系に対し潜在的に内分泌攪乱作用など深刻なリスクを及ぼす化合物の使用も新規登録も禁止する一律の基準「cut-off criteria」を農薬登録規制に導入する法律が発効された（EU Official Journal, 2009）。米国でも化学物質の内分泌攪乱作用の有無を見極めるため内分泌攪乱化学物質スクリーニングプログラム（EDSP: Endocrine Disruptor Screening Program）の一環である Tier 1 スクリーニングデータ要求を2009年に発行し（US EPA, 2009）、我が国では化学物質の内分泌攪乱作用に関する今後の対応方針（ExTEDN2005）に則り調査・研究がすすめられている（環境省, 2005）。このように総合的な化学物質対策として内分泌攪乱作用の検出は国際的にも重要な課題として取り上げられ、規制の強化が図られている。

緒論で述べた通り、ホルモンやホルモン受容体、フィードバック機構など哺乳類と鳥類の内分泌系制御システムには多くの共通点を有する一方で、生殖腺の分化など本質的な形態や機能上の違いがある。また、他の野生生物の間にも内分泌系特性の著しい差異が認められ、内分泌攪乱作用を評価する上で、この動物種間での差異に配慮が必要である（LeBlac *et al.*, 1999）。例えば、無脊椎動物の内分泌系は種々の蛋白に加え、テルペノイドやエクジステロイド（エクジソン、20-ヒドロキシエクジソン）のような特有のホルモン類によって制御されている（神村, 2004）。脊椎動物にはない他のホルモンの例としては、エポキシホモセスキテルペノイドやメチルファルネソエイトがあり、それぞれ昆虫および甲殻類の幼若ホルモンとして作用する（Cymborowski, 1992 ; Laufer *et al.*, 1993）。また、エストロゲン受容体 α （ER α ）の例では、ER α のホルモン結合領域のDNAの塩基配列は、生物種間で比較的良く保存されているものの、完全には一致しておらず種差が存在することが示され（Fielden *et al.*, 1997 ; Sumida *et al.*, 2001）、同一の化学物質に対する受容体の反応性に種差が存在する可能性が示唆されている（金子ら, 1998）。ヒトやラット、ニワトリ、ワニ、トカゲ、カエルおよびニワトリのER α 遺伝子を用いたレポーター遺伝子アッセイの結果、各種エストロゲン様物質の転写活性化に種差が認められている（斎藤・住田, 2003）。この

ように、化学物質の内分泌攪乱作用は動物種差によって異なる可能性があるため、それぞれの動物種で評価系を構築する必要がある。

これまでに開発されてきた内分泌攪乱の評価法のうち、その化学物質管理規制に採用されようとしているものとしては (US EPA EDSTAC, 1998)、哺乳類ではエストロゲン作用の解析には *in vitro* 法のラットエストロゲン受容体結合試験 (Andersen *et al.*, 1999) やヒト HeLa 細胞などを用いたエストロゲン受容体転写活性試験 (Legler *et al.*, 1999, Rogers *et al.*, 2000 ; Vinggaard *et al.*, 1999)、ヒトステロイド生合成試験 (Gray *et al.*, 1997) およびヒトアロマターゼ酵素生合成試験 (Mark *et al.*, 1999) などが、*in vivo* 法ではラット子宮肥大試験 (Kanno *et al.*, 2001, 2003a, 2003b) やラットメス性成熟試験 (Goldman *et al.*, 2000) がある。また、アンドロゲン作用の解析には *in vitro* 法としてアンドロゲン受容体結合試験 (Bauer *et al.*, 2000 ; Wong *et al.*, 1995 ; Lambright *et al.*, 2000) およびヒトステロイド生合成試験 (Gray *et al.*, 1997) が、*in vivo* 法ではラットハーシュバーガー試験 (Hershberger *et al.*, 1953 ; Gray *et al.*, 1997, 1998) およびラットオス性成熟試験 (Gray *et al.*, 1988, 1989, 1997 ; Ashby and Lefevre, 1997 ; Monosson *et al.*, 1999 ; Stocker *et al.*, 2000 ; Marty *et al.*, 2001) がある。例えば、アンドロゲン受容体結合試験は去勢したオスラット生殖組織のアンドロゲン受容体を用い、無細胞系で被験物質のテストステロンなどとの競合的結合阻害で物質の AR 結合能を調べる方法である (Wong *et al.*, 1995 ; Bauer *et al.*, 2000 ; Lambright *et al.*, 2000)。また、ヒトのアンドロゲン受容体の発現ベクターとレポーター遺伝子が組み込まれているサル腎 CV-1 細胞を使用して、化学物質のアンドロゲン受容体転写活性化を評価する方法も開発されている (Szelei *et al.*, 1997)。ラットハーシュバーガー試験は去勢オスラットに 4～7 日間被験物質を与え、前立腺や貯精囊の重量をテストステロン同時投与あるいは非投与時で測定する抗アンドロゲン試験である (Hershberger *et al.*, 1953 ; Gray *et al.*, 1997, 1998)。これらの副生殖腺は鳥類には存在しないため適用することはできない。

一方、鳥類ではエストロゲン作用を示す化学物質が胚に作用すると、メスでは左右両側の卵管の発達 (Rissmann *et al.*, 1984 ; Berg *et al.*, 1999, 2001a, 2001b, Holm *et al.*, 2001 ; Yoshimura and Fujita, 2005 ; Biau *et al.*, 2007)、卵精巢の形成 (Berg *et al.*, 1998, 1999, 2001a ; Shibuya *et al.*, 2004, 2005 ; Blomqvist *et al.*, 2006)、卵管子宮部の卵殻形成障害 (Berg *et al.*, 2004 ; Holm *et al.*, 2006 ; Kamata *et al.*, 2006a, 2006b) などが起こるが、エストロゲン作用の

解析には、化学物質を作用させた場合の血液中のビテロジェニン濃度の変化からエストロジェン作用を評価する方法が開発されている (和田ら, 2002)。アンドロジェン様物質による内分泌攪乱作用についての報告は比較的少ないが、アンドロジェン作用の攪乱は神経内分泌機能に障害をもたらすこと (Ottinger et al., 2008)、*p,p'*-ジクロロジフェニルジクロロエチレン (DDE) が脳内アルギニン - バゾトシン分泌の障害 (Mura et al., 2009) やファブリキウス嚢の障害 (Quinn et al., 2006) をもたらすことが報告されている。しかし、これらの障害を指標として化学物質の抗アンドロジェン作用を定量的に数値で評価することは難しい。本研究ではウズラ胚においてアンドロジェンに対して最も強く反応し、組織の発達や分化を示す臓器がクロアカ腺であることを示した。抗アンドロジェン作用の評価系は、性成熟期のオスウズラを去勢するとクロアカ腺は退縮するが、これにテストステロンを作用させると発達し、このとき被験物質を投与することで発達が抑制されるかを解析する方法が報告されている (Liang et al., 2004)。この方法は成体を飼育し去勢手術を施す必要があるため、実験施設・設備の確保と特殊な実験操作を必要とする。また、被験物質の投与を 7~8 日間行う必要があるため、実験処理の簡易さに難点がある。しかし、本研究では、ウズラ受精卵の孵卵 12 日に抗アンドロジェン作用を有する化学物質を投与し、13 日にプロピオン酸テストステロン (TP) を投与して、16 日にクロアカ腺が発達またはそれが抑制されることを解析するという、化学物質の抗アンドロジェン作用の評価系を提示するものである。この評価系は、被験物質を孵卵 12 日または 13 日に投与することで、化学物質のアンドロジェン作用の評価系にも用いることができる。成体の術的処理を必要とせず、また、特別な飼育施設や設備も不要で、簡便に実験施設内で試験を行うことができるため、試験機関の間で試験結果の誤差を生じ難い利点を有する。

12 日胚に TP を投与すると、第 2 章と第 3 章ではクロアカ腺上皮細胞が分化してクロアカ腺が発達し、この分化した上皮細胞では VVA レクチン結合物質が増加すること、第 4 章ではこのときに上皮細胞の増殖が起こることが明らかとなった。第 2 章でクロアカ腺上皮にアンドロジェン受容体 (AR) が発現することが示されたことから、この細胞分化と増殖は TP の AR との結合を介するものと考えられる。また、TGF- β の発現も検証され、細胞分化を誘導する 1 つの因子としてこのサイトカインの関与も考えられる。VVA は典型的なセリン/スレオニン (Ser/Thr) 結合ムチン型糖ペプチド、特に α 配位結合 N-アセチルガラクトサミン-Ser/Thr 構造に高い親和性を示すこと (Osawa and Tsuji, 1987)、および予備実験で成熟

オスウズラのクロアカ腺細胞に多量の VVA 陽性反応物質が認められたことから、Ser/Thr 結合ムチン型糖ペプチドがクロアカ腺細胞における分泌物あるいはその前駆物質の構成成分の一つであると考えられる。

AR には、核内受容体である分子と、細胞膜受容体分子がある。本研究で解析した AR は核内受容体で、核内 AR は作用過程では標的分子の遺伝子発現を伴う (Lamont and Tindall, 2010)。哺乳類の副生殖腺の発達などでも、この核内 AR とアンドロジェンが結合することによるため (Lamont and Tindall, 2010)、クロアカ腺上皮の分化と増殖も核内 AR と TP の結合によると考えられる。細胞膜受容体はカルシウム透過性の調節などを行って短時間に作用発現するため (Foradori *et al.*, 2008)、クロアカ腺上皮に発現するとしても、今回のアンドロジェン作用の評価系でみられた細胞の分化や増殖への寄与は核内 AR よりも小さいものと思われる。

抗アンドロジェン作用があることが知られている化学物質でその作用を評価したところ、第 2 章から第 4 章で用いた酢酸シプロテロン (CA) と第 5 章で用いたフルタミドは、いずれも TP によるクロアカ腺上皮細胞の増殖を有意に抑制することはなかったが、細胞の形態と VVA レクチン結合物質の発現を指標とした細胞分化を抑制した。CA とフルタミドはいずれも核内 AR と結合することにより、アンドロジェン作用を競合的に抑制するため (Liao *et al.*, 1974 ; Hosokawa *et al.*, 1993 ; Sonneveld *et al.*, 2005)、本研究で提示する抗アンドロジェン作用の評価系は核内 AR の競合的抑制を介する作用を評価するものと考えられる。また、この評価法により、CA とフルタミドという異なる化学物質で TP によるアンドロジェン作用が抑制されることが確認されたことから、核内 AR を介する抗アンドロジェン性内分泌攪乱作用を広範囲の化学物質の評価に適用できると考えられる。

ニホンウズラの性分化は 5.5 日胚で起こる (Brunström *et al.*, 2009)。その後、性腺や脳において性的分化が起こる (Navara *et al.*, 2008)。本研究では、クロアカ腺のアンドロジェン依存性の発達はメスよりオスで顕著に認められた (第 2 章～第 5 章)。クロアカ腺の細胞の発達や VVA レクチン結合物質の解析による抗アンドロジェン作用の評価では、CA には雌雄とも有意差が認められたが (第 2 章～第 3 章)、フルタミドではオスだけで認められた (第 5 章)。このことは、クロアカ腺のアンドロジェン感受性に性差があることを示してお

り、1つの評価試験で雌雄のサンプルを混在させることは適当ではないと考えられる。第5章の結果から判断する限り、オスの胚を用いる方が、検出感度は高いと思われる。

第2章では、化学物質のアンドロジェン作用と抗アンドロジェン作用をクロアカ腺上皮の形態から細胞の分化を組織学的に解析した。第3章では、これをVVAレクチン結合物質の発現から解析した。いずれも化学物質の作用を評価できたため有効な方法であるが、組織学的解析には組織観察の熟練が必要である。VVAレクチン結合物質の発現は顕微鏡画像解析システムという特殊装置を備えた解析が必要ではあるが、客観的に解析できるという有利な面がある。予備的な検討では特殊な装置が不要なクロアカ腺上皮の形態に基づく組織学的解析が、より客観性を求める場合にはレクチン組織化学による解析が好ましいと思われる。

本研究で抗アンドロジェン評価法を開発した、その手順の概略を図21に整理して述べる。

ニホンウズラ受精卵

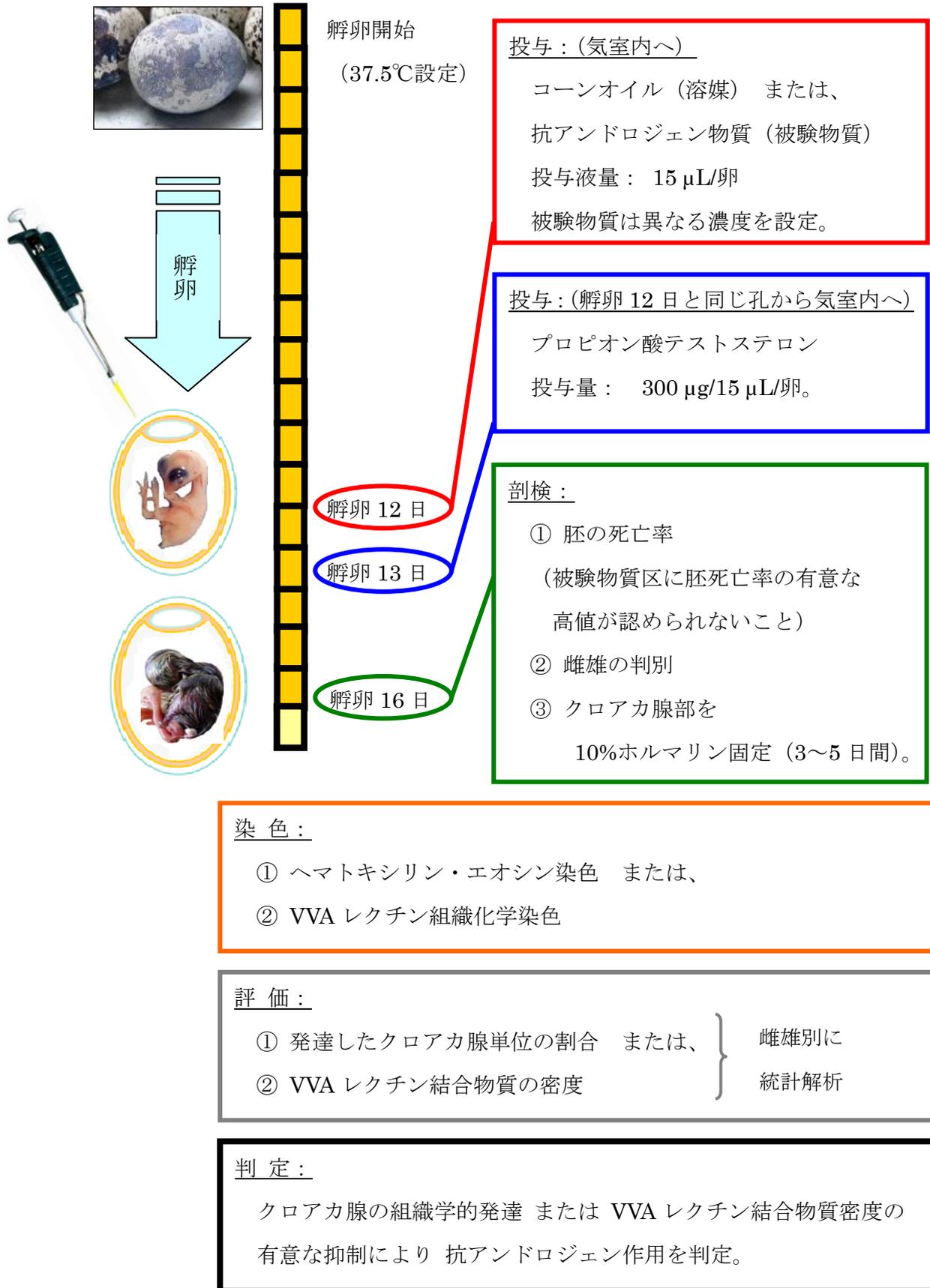


図 21. ウズラ胚を用いた化学物質の抗アンドロジェン作用評価系

以上、本実験では、ウズラ胚におけるアンドロジェンおよび抗アンドロジェン作用に対する高感受性評価指標はクロアカ腺の組織構造変化で、発達したクロアカ腺単位の割合を解析することでアンドロジェンおよび抗アンドロジェン物質を定量的に評価できることを明らかにした。また、VVA レクチンが TP の刺激を受け発達したクロアカ腺細胞の細胞質中に最も強い反応シグナルを示し、腺組織の単位面積あたりの VVA 陽性反応面積の割合を顕微鏡画像解析することで、ウズラ胚における抗アンドロジェン作用をより客観的に評価することを明らかにした。

今回構築した評価系は、汎用性の実証から、核内アンドロジェン受容体を介する抗アンドロジェン性内分泌攪乱作用を広範囲の化学物質の評価に適用できると考えられる。また、従前の成体を用いた方法に比べ、成体の術的処理を必要とせず、特別な飼育施設や設備も不要で、簡便に実験施設内で試験を行うことができる利点があるため、試験機関の間で試験結果の誤差を生じ難い利点も有する。

本研究を通じて、ウズラ胚のクロアカ腺を対象として、組織学とレクチン結合物質の解析によって、鳥類の胚を用いた化学物質のアンドロジェンと抗アンドロジェン作用の評価系を構築することができた。

第7章 総括

本研究は、化学物質の鳥類における生殖および内分泌系へ及ぼす影響のうち、抗アンドロジェン性内分泌攪乱作用の評価法を構築することを目的に行った。このため、ニホンウズラ胚を用いて、アンドロジェンに高い反応性を示す組織を検索した。この組織の発達と細胞機能の分化に及ぼす影響を解析することにより、化学物質のアンドロジェンおよび抗アンドロジェン作用を評価した。

1. ウズラ胚組織に対する化学物質の男性ホルモン攪乱作用の組織学的評価法

(1) アンドロジェン物質に対する高感受性ウズラ胚組織の検索

ニホンウズラの受精卵内へアンドロジェン物質を投与するにあたり適切な溶媒、投与液量、アンドロジェン物質であるプロピオン酸テストステロン (TP) の投与量、投与時期および胚の摘出時期を、胚の生存性を評価指標に検討した。最適化した投与法に基づき、対照区 (孵卵 12 日と 13 日にコーンオイルを投与)、TP-L 区 (孵卵 12 日にコーンオイル、孵卵 13 日に TP 30 $\mu\text{g}/\text{卵}$ を投与) および TP-H 区 (孵卵 12 日にコーンオイル、孵卵 13 日に TP 300 $\mu\text{g}/\text{卵}$ を投与) での TP に対する高感受性組織を組織学的に検索した。

その結果、被験物質の溶媒はコーンオイルが適切で、2 日間反復投与では 15 $\mu\text{L}/\text{卵}/\text{日}$ までが許容投与液量であった。投与時期は孵卵 12 日と 13 日、胚摘出を孵卵 16 日に設定するのが適切であった。

TP 300 $\mu\text{g}/\text{卵}$ を投与した TP-H 区では胚の生存性は保たれ、クロアカ部の肥大が認められた。クロアカ部組織内にはクロアカ腺が分布する。クロアカ腺は発達あるいは未発達な腺細胞で内腔を覆われた多くの腺単位 (管状構造) から成り、発達した腺細胞は細胞の丈が高く細胞質に粘液様物質を有していた。未発達な腺細胞では細胞の丈は低く細胞質の粘液様物質も少なかった。発達した腺細胞からなる腺単位は TP-H 区の雌雄いずれの胚にも認められ、対照区および TP-L 区ではみられなかった。発達した腺細胞には、強い PAS 陽性反応が核上部細胞質に認められ、この PAS 陽性反応は未発達な腺細胞より発達した細胞で強かった。肝臓、腎臓、精巣または卵巣、尾腺、ファブリキウス囊には対照区と TP 区との間に組織形態上の差は認められなかった。

全部の腺単位の数に対する発達した腺単位の割合は、対照区および TP-L 区と比較して TP-H 区の雌雄胚で有意に高かった。

(2) アンドロジェンおよび抗アンドロジェン物質投与に伴う標的組織の組織構造的変化の定量的解析

抗アンドロジェン物質として酢酸シプロテロン (CA) を用い、アンドロジェン物質に対する高感受性ウズラ胚組織であるクロアカ腺に対する TP および CA の効果を組織学的に解析した。処理区は、TP-H 区 (孵卵 12 日にコーンオイル、13 日に TP 300 μg /卵を投与)、CA-L + TP-H 区 (孵卵 12 日に CA 7.5 μg /卵、13 日に TP 300 μg /卵を投与) および CA-H + TP-H 区 (孵卵 12 日に CA 75 μg /卵、13 日に TP 300 μg /卵を投与) とした。

孵卵 16 日の剖検の結果、胚の生存率はいずれの CA 処理区も TP-H 区との間に差はなかった。

組織学的検査の結果、クロアカ腺単位の発達は TP-H 区では顕著で、CA-L + TP-H 区および CA-H + TP-H 区では劣っていた。肝臓、腎臓、精巣または卵巢、尾腺、ファブリキウス嚢には TP-H 区と CA を投与した区との間に組織形態上の差は認められなかった。全部の腺単位の数に対する発達した腺単位の割合は、TP-H 区と比較して CA 区の雌雄胚で CA 用量依存的に有意に低かった。

(3) クロアカ腺におけるアンドロジェン受容体発現の解析

アンドロジェンおよび抗アンドロジェン物質の作用発現は、アンドロジェン受容体 (AR) を介するため、クロアカ腺部およびレーザーマイクロダイセクションにより得たクロアカ腺上皮における AR mRNA の発現を実証することを目的とした。

孵卵 12 日胚では、AR の mRNA 発現を示す約 190 bp のバンドが雌雄ともクロアカ腺部、ファブリキウス嚢および腎臓において認められた。肝臓にはバンドはみられなかった。孵卵 16 日胚の対照区、TP-H 区および CA-H + TP-H 区の雌雄いずれのクロアカ腺部にも同様のバンドが認められた。

(4) クロアカ腺におけるトランスフォーミング成長因子- β の発現の解析

アンドロジェンによるクロアカ腺細胞の分化にトランスフォーミング成長因子- β (TGF- β) が関与する可能性を検討することを目的に、TGF- β 2、TGF- β 3 および TGF- β 4 の遺伝子発現と、TGF- β 3 蛋白の局在を検証した。

孵卵 16 日において対照区、TP-H 区および CA-H + TP-H 区の雌雄いずれのクロアカ腺部

にも、TGF- β 2 および TGF- β 3 の mRNA 発現を示すそれぞれ約 280 bp および約 150 bp のバンドが認められた。

TGF- β 3 の免疫染色の結果、いずれの区の胚でもクロアカ腺の粘膜上皮と、クロアカ腺細胞の細胞質基底側に反応産物が認められた。

(5) 以上のことから、クロアカ腺単位の発達とその抑制から化学物質のアンドロジェンおよび抗アンドロジェン作用を評価できると考えられた。

2. ウズラ胚クロアカ腺を標的としたレクチン組織化学による化学物質の男性ホルモン攪乱作用の評価法

ウズラ胚のクロアカ腺はアンドロジェン作用で上皮細胞の分化を伴う腺単位の発達を示すが、抗アンドロジェン性化学物質の投与はこれを抑制することが明らかとなった。クロアカ腺の上皮細胞の分化の程度を細胞内糖鎖の解析で定量的に評価する手法の構築を目的とした。

(1) 胚クロアカ腺に発現する糖鎖特性の同定

14 種類のレクチンを用いてウズラ胚クロアカ腺のレクチン組織化学を行った。処理区は、対照区、TP-L 区、TP-H 区、CA-L + TP-H 区および CA-H + TP-H 区とした。

発達したクロアカ腺細胞上皮において VVA レクチンが最も強く反応した。SBA レクチンも腺細胞に陽性反応を示したが、その反応の程度は VVA に比べると弱かった。PNA レクチンは粘膜上皮下組織の結合組織にある物質に反応した。VVA レクチンを用いたウェスタンブロット解析の結果、TP-H 区および CA-H + TP-H 区の雌雄胚のいずれのクロアカ腺部にも約 75kDa の単一バンドが認められた。

(2) アンドロジェンおよび抗アンドロジェン物質投与に伴うクロアカ腺のレクチン応答の定量的解析

対照区、TP-L 区、TP-H 区、CA-L + TP-H 区および CA-H + TP-H 区の構成で、クロアカ腺上皮における VVA レクチン結合物質を組織化学的に定量解析した。

クロアカ腺上皮 VVA 結合物質の密度は、対照区では雌雄ともに検出できないレベルであった。同密度は対照区と TP-L 区との間で差を示さず、TP-H 区で有意に高かった。オスにおいて TP を投与する前日に CA を投与した CA-L + TP-H 区および CA-H + TP-H 区の VVA

結合物質の密度を解析すると、CA-L + TP-H 区および CA-H + TP-H 区とも、TP-H 区より有意に低かった。メスでは、VVA 結合物質は TP-L 区では検出されなかったが、TP-H 区の密度は対照区よりも有意に高かった。さらに、CA-L + TP-H 区および CA-H + TP-H 区の密度は、TP-H 区に比べて有意に低かった。雌雄間の VVA 結合物質の密度の差を比較すると、TP-L 区と TP-H 区においてメスよりオスで高かった。

(3) 以上のことから、VVA レクチンがウズラ胚の発達中のクロアカ腺上皮細胞を特異的に染め、腺組織中の VVA レクチン結合物質の密度がアンドロジェンあるいは抗アンドロジェン物質による刺激に上方あるいは下方制御を受けることを示した。ウズラ胚クロアカを標的とした VVA を用いたレクチン組織化学的手法は、アンドロジェンおよび抗アンドロジェン物質を評価するのに有用であると考えられた。

3. ウズラ胚クロアカ腺を標的とした細胞増殖活性解析による化学物質の男性ホルモン攪乱作用の評価法

化学物質のアンドロジェンおよび抗アンドロジェン作用による胚クロアカ腺の発達やその抑制を組織増殖活性から評価できるかを検討することを目的とした。

対照区、TP-L 区、TP-H 区、CA-L + TP-H 区および CA-H + TP-H 区のニホンウズラ胚クロアカ腺の組織標本作製し、PCNA 免疫染色を施して、陽性細胞の出現頻度を定量的に解析した。

その結果、PCNA 陽性反応は対照区を含む全処理区のクロアカの粘膜上皮、クロアカ腺上皮および粘膜固有層の線維芽細胞の細胞核に認められた。このうち粘膜上皮とクロアカ腺上皮には高頻度で陽性細胞が検出された。対照区では雌雄とも約 17%の核が PCNA 陽性を示した。この頻度は TP-L 区でも同等であったが、TP-H の頻度は雌雄とも約 60%で、対照区よりも有意に高かった。TP 投与前に CA を投与した CA-L + TP-H 区と CA-H + TP-H 区では、PCNA 陽性核の出現頻度は雌雄ともに TP-H 区より低値傾向であったが有意ではなかった。

これらのことから、クロアカ腺上皮細胞の細胞増殖活性を PCNA 免疫組織化学的に解析した場合、化学物質のアンドロジェン作用を評価するには有用ではあるが、抗アンドロジェン作用を評価するには適さないと考えられた。

4. ウズラ胚クロアカ腺を指標とした化学物質の男性ホルモン攪乱作用評価法の汎用性の実証

ウズラ胚のクロアカ腺組織に及ぼす影響から化学物質の抗アンドロジェン作用を評価するシステムが、酢酸シプロテロン以外の化学物質の評価にも汎用的に用いることができることを示すため、抗アンドロジェン作用があるフルタミド (FL) を被験物質として評価試験を行った。対照区 (孵卵 12 日と 13 日にコーンオイルを投与)、TP-H 区 (孵卵 12 日にコーンオイル、13 日に TP 300 $\mu\text{g}/\text{卵}$ を投与)、FL-L + TP-H 区 (孵卵 12 日に FL 12 $\mu\text{g}/\text{卵}$ 、13 日に TP 300 $\mu\text{g}/\text{卵}$ を投与) および FL-H + TP-H 区 (孵卵 12 日に FL 120 $\mu\text{g}/\text{卵}$ 、13 日に TP 300 $\mu\text{g}/\text{卵}$ を投与) を設定した。これらの胚のクロアカ腺で、上皮細胞の分化の組織学的解析、VVA レクチン結合物質の密度の測定、PCNA 染色による細胞増殖活性の解析を行った。

上皮細胞が分化を示す発達した腺単位は、対照区では認められず、TP-H 区ではオスで 76%、メスで 59% と有意に高値であった。また、発達した腺単位の割合は、オスでは TP-H 区に比べて FL-L + TP-H 区と FL-H + TP-H 区で有意に低かったが、メスでは有意な差を示さなかった。VVA レクチンで染色すると、対照区では陽性シグナルはみられず、TP-H 区では腺のヒダを被う上皮の全体に陽性シグナルがみられた。VVA レクチン結合物質の腺上皮における密度は、TP-H 区と比べてオスでは FL-L + TP-H 区および FL-H + TP-H 区で有意に少なかったが、メスでは FL-L + TP-H 区だけで有意に少なかった。細胞増殖活性には、FL の有意な影響は認められなかった。

以上のことから、ウズラ胚のクロアカ腺の組織学的発達と VVA レクチン結合物質の密度の解析は、CA だけでなく、FL を用いた場合でも抗アンドロジェン作用を評価できることが示された。

5. 結論

本研究の結果、ウズラ胚におけるアンドロジェンおよび抗アンドロジェン作用に対する高感受性評価指標はクロアカ腺の組織構造変化であり、発達したクロアカ腺単位の割合を解析することで化学物質のアンドロジェンおよび抗アンドロジェン作用を評価できることを明らかにした。また、VVA レクチンを用いた組織化学でクロアカ腺細胞内の特異糖鎖量を顕微鏡画像解析することで、抗アンドロジェン作用をより客観的に評価できることも明らかにした。今回構築した評価系は、汎用性の実証から、核内アンドロジェン受容体を介する抗アンドロジェン性内分泌攪乱作用を広範囲の化学物質の評価に適用できると考えら

れる。また、従前の成体を用いた方法に比べ、成体の術的処理を必要とせず、特別な飼育施設や設備も不要で、簡便に実験施設内で試験を行うことができる利点があるため、試験機関の間で試験結果の誤差を生じ難い利点も有する。以上、本研究で構築したウズラ胚クロアカ腺の発達と細胞分化の解析は、鳥類における化学物質のアンドロジェンと抗アンドロジェン作用の評価系として用いることができるものである。

引用文献

- Abalain, J. H., Y. Amet, J. Y. Daniel, and H. H. Floch, 1984. Androgen control of the secretion in the sebaceous-like preen gland. *J. Steroid Biochem.* 20: 529-531.
- Adkins-Regan, E., M. A. Ottinger, and J. Park, 1995. Maternal transfer of estradiol to egg yolks alters sexual differentiation of avian offspring. *J. Exp. Zool.* 271: 466-470.
- Amet, Y., J. Y. Daniel, and H. H. Floch, 1981. Demonstration and regulation of androgen receptors in adult quails. *Pathologie Biologie.* 29: 350-351.
- Andersen, H. R., A.-M. Andersson, S. F. Arnold, H. Autrup, M. Barfoed, N. A. Beresford, P. Bjerregaard, L. B. Christiansen, B. Gissel, R. Hummel, E. C. B. Jorgensen, B. Korsgaard, R. Le Guvel, H. Leffers, J. A. McLachlan, A. Moeller, J. B. Nielsen, N. Olea, A. Oles- Karasko, F. Pakdel, K. L. Pedersen, P. Perez, N. E. Skakkebaek, C. Sonnenschein, A. M. Soto, J. P. Sumpter, S. M. Thorpe and P. Grandjean, 1999. Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals. *Environ. Health Perspect.* 107: 89-108.
- Andersson, L., E. Nikolaidis, B. Brunström, A. Bergman, and L. Dencker, 1991. Effects of polychlorinated biphenyls with Ah receptor affinity on lymphoid developments in the thymus and the bursa of Fabricius of chick embryos in ovo and in mouse thymus anlagen in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 107: 183-188.
- Ashby, J., and P. A. Lefevre, 1997. The weanling male rat as an assay for endocrine disruption: preliminary observations. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 26: 330-337.
- Barron, M. G., H. Galbaith, and D. Beltman, 1995. Comparative reproductive and developmental toxicology of PCBs in birds. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 112C: 1-14.
- BAUER E.R.S., A. DAXENBERGER, T. PETRI T, H. SAUERWEIN, and H. H.MEYER, 2000. Characterisation of the affinity of different anabolics and synthetic hormones to the human androgen receptor, human sex hormone binding globulin and to the bovine progestin receptor. *APMIS.* 108: 838-846.
- Berg, C., A. Blomqvist, L. Holm, I. Brandt, B. Brunström, and Y. Ridderstrale, 2004. Embryonic exposure to oestrogen causes eggshell thinning and altered shell gland carbonic anhydrase expression in the domestic hen. *Reproduction.* 128: 455-461.

- Berg, C., K. Halldin, A. K. Fridolfsson, I. Brandt, and B. Brunström, 1999. The avian egg as a test system for endocrine disrupters: Effects of diethylstilbestrol and ethynylestradiol on sex organ development. *Sci. Total Environ.* 233: 57-66.
- Berg, C., K. Halldin, and B. Brunström, 2001a. Effects of Bisphenol A and Tetrabromobisphenol A on sex organ development in quail and chicken embryos. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 2836-2840.
- Berg, C., K. Halldin, B. Brunström, and I. Brandt, 1998. Methods for studying xenoestrogen effects in birds. *Toxicol. Lett.* 102-103: 671-676.
- Berg, C., L. Holm, I. Brandt, and B. Brunström, 2001b. Anatomical and histological changes in the oviducts of Japanese quail, *Coturnix japonica*, after embryonic exposure to ethynylestradiol. *Reproduction.* 121: 155-165.
- Biau, S., S. Bayle, P. S. Barbara, and B. Roig, 2007. The chick embryo: an animal model for detection of the effects of hormonal compounds. *Anal. Bioanal. Chem.* 387: 1397-1403.
- Bitman, J., H. C. Cecil, S. J. Harris, and G. F. Fries, 1968. Estrogenic activity of *o,p'*-DDT in the mammalian uterus and avian oviduct. *Science.* 162: 371-372.
- Blomqvist, A., C. Berg, L. Holm, I. Brandt, Y. Ridderstrale, and B. Brunström, 2006. Defective reproductive organ morphology and function in domestic rooster embryonically exposed to *o,p'*-DDT or ethynylestradiol. *Biol. Reprod.* 74: 481-486.
- Boustnes, J. O., V. Bakken, K. E. Erikstad, F. Mehlum, and J. U. Skaare, 2001. Patterns of incubation and nest-site attentiveness in relation to organochlorine (PCB) contamination in glaucous gulls. *J. Appl. Ecol.* 38: 791-801.
- Bravo, R., R., Frank, P. A. Blundell, and H. Macdonald-Brabo, 1987. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ . *Nature.* 326: 515-517.
- Brunström, B., J. Axelsson, A. Mattsson, and K. Halldin, 2009. Effects of estrogens on sex differentiation in Japanese quail and chicken. *Gen. Comp. Endocrinol.* 163: 97-103.
- Bryan, G. W., P. E. Gibbs, L. G. Hummerstone, and G. R. Burt, 1986. The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around south-west England: Evidence for the effect of tributyltin from anti-fouling paints. *J. Marine Biol. Assoc. UK,* 66: 611-640.
- Bryan, T. E., R. P. Gildersleeve, and R. P. Wiard, 1989. Exposure of Japanese quail embryos to *o,p'*-DDT has long-term effects on reproductive behaviors, hematology, and feather

- morphology. 39: 525-535.
- Carlsen, E., A. Giwercman, N. Keiding, and N. E. Skakkebaek, 1992. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Brit. Med. J.* 305: 609-613.
- Chan, F. L., H. L. Choi, and S-M, Ho, 2001. Analysis of glycoconjugate patterns of normal and hormone-induced dysplastic noble rat prostates, and an androgen-independent noble rat prostate tumor, by lectin histochemistry and protein blotting. *Prostate.* 46: 21-32.
- Chen, X., Y. Deng, Z. Zhou, Q. Tao, J. Zhu, X. Li, J. Chen, and J. Hou, 2010. 17 β -estradiol combined with testosterone promotes chicken osteoblast proliferation and differentiation by accelerating the cell cycle and inhibition apoptosis in vitro. *Vet. Res. Commun.* 34: 143-152.
- Chowdhury, V.S., M. Nishibori, and Y. Yoshimura, 2003. Changes in the expression of TGF β -isoforms in the anterior pituitary during withdrawal and resumption of feeding in hens. *Gen. Comp. Endocrinol.* 133: 1-7.
- Coil, W. H., and D. K. Wetherbee, 1959. Observations on the cloacal gland of the Eurasian quail, *Coturnix coturnix*. *Ohio J. Sci.* 59: 268-270.
- Colborn, T., D. Dumanoski, and J. P. Myers, 1996. *Our stolen future*. Dutton, Penguin Books. NY.
- Cooke, A. S., 1973. Shell thinning in avian eggs by environmental pollutants. *Environ. Pollut.* 4: 85-152.
- Cymborowski, B., 1992. *Insect Endocrinology*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Publishers.
- Das, S. C., N. Isobe, M. Nishibori, and Y. Yoshimura, 2006. Expression of transforming growth factor- β isoforms and their receptors in utero-vaginal junction of hen oviduct in presence or absence of resident sperm with reference to sperm storage. *Reprod.* 132: 781-790.
- EFSA (European Food Safety Authorities), 2009. Risk assessment for birds and mammals. *EFSA Journal* 2009; 7(12):1438.
- Elbrecht, A., and R. G. Smith, 1992. Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. *Science.* 255: 467-470.
- Fielden, M. R., I. Chen, B. Chittim, S. H. Safe, and T. R. Zacharewski, 1997. Examination of the estrogenicity of 2,4,6,2',6'-pentachlorobiphenyl (PCB 104), its hydroxylated metabolite 2,4,6,2',6'-pentachloro-4-biphenylol (HO-PCB 104), and a further chlorinated derivative, 2,4,6,2',4',6'-hexachlorobiphenyl (PCB 155). *Environ. Health Perspect.* 105: 1238-1248.
- Fisher, S. A., G. R. Bortolotti, K. J. Fernie, J. E. Smits, T. A. Marchant, K. G. Drouillard, and D. M.

- Bird, 2001. Courtship behavior of captive American kestrels (*Falco sparverius*) exposed to polychlorinated biphenyls. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41: 215-220.
- Foradori, C. D., M. J. Weiser, and R. J. Handa, 2008. Non-genomic actions of androgens. *Front. Neuroendocrinol.* 29: 169-181.
- Forsberg, J. G., and D. Jacobsohn, 1969. The reproductive tract of males delivered by rats given cyproterone acetate from days 7 to 21 of pregnancy. *J. Endocr.* 44: 461-462.
- Fox, G. A., A. P. Gilman, D. B. Peakall, and F. W. Anderka, 1978. Behavioral abnormalities of nesting Lake Ontario herring gulls. *J. Wildl. Manage.* 42: 477-483.
- Fox, G. A., and T. Donald, 1980. Organochlorine pollutants, nest-defense behavior and reproductive success in Merlins. *Condor.* 82: 81-84.
- Frank, D. S., M. A. Mori, J. L. Sericano, A. L. Blankenship, K. Kannan, and J. P. Giesy, 2001. Persistent organochlorine pollutants in eggs of colonial waterbirds from Galveston Bay and East Texas. *USA Environ. Toxicol. Chem.* 20: 608-617.
- Fry, D. M., and C. K. Toone, 1981. DDT – induced feminization of gull embryos. *Science.* 231: 922-924.
- Fry, D. M., C. K. Toone, S. M. Speich, and R. J. Peard, 1987. Sex ratio skew and breeding patterns of gulls: Demographic and toxicological considerations. *Stud. Avian Biol.* 10: 26-43.
- Fujihara, N., 1992. Accessory reproductive fluids and organs in male domestic birds. *World's Poult. Sci. J.* 48 : 39-56.
- Fujii, S., and T. Tamura, 1967a. Studies on the cloacal gland of the quail. I. Macroscopical and microscopical observations. *Jpn. Poult. Sci.* 4 : 187-193.
- Fujii, S., and T. Tamura, 1967b. Studies on the cloacal gland of the quail. II. Histochemical observations on secretions in the gland. *Jpn. Poult. Sci.* 4 : 194-200.
- Fujita, M., T. Kinoshita, and Y. Yoshimura, 2004. Concentration of orally administered nonylphenol in blood, liver and egg yolk of maternal Japanese quail (*Coturnix japonica*). 2004. 41: 269-274.
- Fyfe, R. W., R. W. Risebrough and W. Walker II, 1976. Pollutant effects on the reproduction of the prairie falcons and merlins of the Canadian prairies. *Can. Field Nat.* 90: 346-355.
- Gerhard, I., and B. Runnebaum, 1992. Environmental pollutants and fertility disorders. Heavy metals and minerals. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 52: 383-396.

- Gildersleeve, R. P., H. A. Tilson, R. P. Wiard, and F. W. Edens. 1987. Direct administration of chlordecone into Japanese quail eggs has persistent effects on conditioned behavior of adults. *Neurotoxicology*. 8: 269-279.
- Glick, B., 1986. Avian immune capacity and bone marrow cellularity in ovo treatment with cyclophosphamide. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 79: 95-100.
- Goldman, J. M., S. C. Laws, S. K. Balchak, R. L. Cooper, and R. J. Kavlock, 2000. Endocrine-disrupting chemicals: Prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid activity in the female rat. A focus on the EDSTAC recommendations. *Crit. Rev. Toxicol.* 30: 135-196.
- Gray, L. E. Jr., 1998. Tiered screening and testing strategy for xenoestrogens and antiandrogens. *Toxicol. Lett.* 102-103: 677-680.
- Gray, L. E. Jr., J. Ostby, J. Ferrell, G. Rehnberg, R. Linder, R. Cooper, J. Goldman, V. Slott, J. Laskey. 1989. A dose-response analysis of methoxychlor-induced alterations of reproductive development and function in the rat. *Fundam. Appl. Toxicol.* 12: 92-1108.
- Gray, L. E. Jr., J. Ostby, R. Sigmon, J. Ferrell, G. Rehnberg, R. Linder, R. Cooper, J. Goldman, and J. Laskey. 1988. The development of a protocol to assess reproductive effects of toxicants in the rat. *Reprod. Toxicol.* 2: 281-287.
- Gray, L. E. Jr., W. R. Kelce, T. Wiese, R. Tyl, K. Gaido, J. Cook, G. Klinefelter, D. Desaulniers, E. Wilson, T. Zacharewski, C. Waller, P. Foster, J. Laskey, J. Reel, J. Giesy, S. Laws, J. McLachlan, W. Breslin, R. Cooper, R. D. Giulio, R. Johnson, R. Purdy, E. Mihaich, S. Safe, C. Sonnenschein, W. Welshons, R. Miller, S. McMaster, and T. Colborn, 1997. Endocrine screening methods workshop report: Detection of estrogenic and androgenic hormonal and antihormonal activity for chemicals that act via receptor or steroidogenic enzyme mechanisms. *Reprod. Toxicol.* 11: 719-750.
- Grisham, W., S. H. Park, J. K. Hsia, C. Kim, M. C. Leung, L. Kim, and A. P. Arnold, 2007. Effects of long-term flutamide treatment during development in zebra finches. *Neurosci. Lett.* 418: 92-96.
- Guillette, L. J. Jr., A. R. Woodward, D. A. Crain, D. B. Pickford, A. A. Rooney, and H. F. Percival, 1999. Plasma steroid concentrations and male phallus size in juvenile alligators from seven Florida lakes. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 116: 256-372.

- Guillette, L. J. Jr., D. B. Pickford, D. A. Crain, A. A. Rooney, and H. F. Percival. 1996. Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 101: 32-42.
- Haldar, C., Y. Fukada, and M. Araki, 2003. Effects of gonal steroids on pineal morphogenesis and cell differentiation of the embryonic quail studied under cell culture conditions. *Dev. Brain Res.* 145: 71-79.
- Halldin, K., C. Berg, I. Brandt, and B. Brunström, 1999. Sexual behavior in Japanese quail as a test end point for endocrine disruption: Effects of *in ovo* exposure to ethynylestradiol and diethylstilbestrol. *Environ. Health Perspect.* 107: 861-866.
- Halldin, K., J. Axelsson, and B. Brunström, 2005. Effects of endocrine modulators on sexual differentiation and reproductive function in male Japanese quail. *Brain Res. Bull.* 65: 211-218.
- Henshel, D. S., J. W. Martin, R. Norstrom, P. Whitehead, J. D. Steeves, and K. M. Cheng, 1995. Morphometric abnormalities in brains of great blue heron hatchlings exposed in the wild to PCDDs. *Environ. Health Perspec.* 103: Suppl. 4. 61-66.
- Herbst AL, Ulfelder H, Poskanzer D. C., 1971. Adenocarcinoma of the vagina - Association of maternal stilboestrol therapy with tumour appearance in young women. *N. Engl. J. Med.* 284: 878.
- Hershberger, L. E. Shipley, and R. Meyer. 1953. Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 83: 175-180.
- Holm, L., A. Blomqvist, I. Brandt, B. Brunström, Y. Ridderstrale, and C. Berg, 2006. Embryonic exposure to *o,p'*-dichlorodiphenyltrichloroethane causes eggshell thinning and altered shell gland carbonic anhydrase expression in the domestic hen. *Environ. Toxicol. Chem.* 25: 2787-2793.
- Holm, L., C. Berg, B. Brunström, Y. Ridderstrale, and I. Brandt, 2001. Disrupted carbonic anhydrase distribution in the avian shell gland following *in ovo* exposure to estrogen. *Arch. Toxicol.* 75: 362-368.
- Hosokawa, S., M. Murakami, M. Ineyama, T. Yamamada, A. Yoshitake, H. Yamada, and J. Miyamoto, 1993. The affinity of procymidone to androgen receptor in rats and mice. *J. Tox.*

- Sci. 18: 83-93.
- Huff, J., J. Cirvello, J. Haseman, and J. Bucher, 1991a. Chemicals associated with site-specific neoplasia in 1394 long-term carcinogenesis experiments in laboratory rodents. *Environ. Health Perspect.*, 93: 247-270.
- Huff, J., J. Haseman, and D. Rall, 1991b. Scientific concepts, value, and significance of chemical carcinogenesis studies. *Environ. Health Perspect.*, 103: 680-683.
- Hutchison, R.E., 1978. Hormonal differentiation of sexual behavior in Japanese quail. *Horm. Behav.* 11: 363-387.
- ICES, 1992. Report of the Study Group on Seals and Small Cetaceans in Northern European Seas. ICES CM 1993/N:3.
- Isobe, N., and Y. Yoshimura, 2007. Deficient proliferation and apoptosis in the granulosa and theca interna cells of the bovine cystic follicle. *J. Reprod. Dev.* 53: 1119-1124.
- Jakowlew, S. B., G. Ciment, R. S. Tuan, M. B. Sporn, and A. B. Roberts, 1994. Expression of transforming growth factor- β 2 and β 3 mRNA and protein in the developing chicken embryo. *Differentiation*. 55: 105-118.
- Jakowlew, S. B., P. J. Dillard, T. S. Winokur, K. C. Flanders, M. B. Sporn, and A. B. Roberts, 1991. Expression of transforming growth factor- β s 1-4 in chicken embryo chondrocytes and myocytes. *Dev. Biol.* 143: 135-148.
- Janz, D. M., and G. D. Bellward, 1996a. In ovo 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure in three avian species. 1. Effects on thyroid hormones and growth during the perinatal period. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 139: 281-291.
- Janz, D. M., and G. D. Bellward, 1996b. In ovo 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure in three avian species. 2. Effects on estrogen receptor and plasma sex steroid hormones during the perinatal period. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 139: 292-300.
- Kanno, J., Lesley Onyon, Joseph Haseman, Penelope Fenner-Crisp, John Ashby, and William Owens. 2001. The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for *in Vivo* estrogenic responses: Phase 1. *Environm. Health Perspect.* 109: 785-794.
- Kanno, J., Lesley Onyon, Joseph Haseman, Penelope Fenner-Crisp, John Ashby, and William Owens. 2003a. The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2:

- Dose-response studies. Environm. Health Perspect. 111: 1530-1549.
- Kanno, J., Lesley Onyon, Joseph Haseman, Penelope Fenner-Crisp, John Ashby, and William Owens. 2003b. The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: Coded single-dose studies. Environm. Health Perspect. 111: 1550-1558.
- Kaku, A., C. Chang, T. Tamura, T. Okamoto, and Y. Yoshimura, 1993. Immunolocalization of androgen receptor in the cloacal gland of male Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). Jpn. Poult. Sci. 30: 413-418.
- 加藤 光保. 2003. トランスフォーミング増殖因子 β による転写制御. 蛋白質核酸酵素. 48: 2247-2253.
- Kamata, R., S. Takahashi, A. Shimizu, and F. Shiraishi, 2006a. Avian transgenerational reproductive toxicity test with in ovo exposure. Arch. Toxicol. 80: 846-856.
- Kamata, R., S. Takahashi, A. Shimizu, M. Morita, and F. Shiraishi, 2006b. In ovo exposure quail assay for risk assessment of endocrine disrupting chemicals. Arch. Toxicol. 80: 857-867.
- 神村 学, 2004. 昆虫のステロイドホルモン: 脱皮ホルモン. 化学と生物. 42: 608-613.
- 金子 秀雄, 庄野 文章, 松尾 昌季, 1998. 女性ホルモン様物質の検出系. 科学. 68: 598-605.
- Kavlock, R., G. P. Daston, C. DeRosa, P. Fenner-Crisp, L.E. Gray, S. Kaattari, G. Lucier, M. Luster, M. J. Mac, C. Maczka, R. Miller, J. Moore, R. Rolland, G. Scott, D. M. Sheehan, T. Sinks, and H. A. Tilson, 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of OECD Draft Final 149 June 2006 endocrine disruptors: A report of the EPA-sponsored workshop. Environ. Health Perspectives. 104 (Suppl. 4): 715-740.
- Kelsey. J. L., and L. Berstein, 1996. Epidemiology and prevention of breast cancer. Annu. Rev. Publ. Health. 17: 47-67.
- King, N., T. W. Odom, H. W. Sampson, and S. L. Pardue, 1993. In ovo administration of boron or sodium aluminosilicate alters mineralization in the turkey. Nutr. Res. 13: 77-85.
- Koninckx, P. R., 1999. The pathophysiology of endometriosis: pollution and dioxin. Gynecol. Obstet. Invest., 47: 47-49.
- Koopman, P., J. Gubbay, N. Vivian, P. Goodfellow, and L. B. Robin, 1991. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. Nature. 346: 245-250.
- 小清水 右一. 1995. マウス対し生殖細胞の増殖・分化機構の解析. 組織培養. 21: 273-277.

- Kubben, F. J., A. Peeters-Haesevoets, L. G. Engels, C. G. Baeten, B. Schutte, J. W. Arends, R. W. Stockbrügger, and G. H. Blijham, 1994. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a new marker to study human colonic cell proliferation. *Gut*. 35: 530-535.
- Lambright, C., J. Ostby, K. Bobseine, V. Wilson, A. K. Hotchkiss, P. C. Mann, and L. E. Gray, 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.
- Lamont, K. R., and D. J. Tindall, 2010. Androgen regulation of gene expression. *Adv. Cancer Res.* 107: 137-162.
- Laufer, H., J. S. B. Ahl, and A. Sagi, 1993. The role of juvenile hormones in crustacean reproduction. *Am. Zool.* 33: 365-374.
- Le Blanc G, P. Campbell, P. den Besten, R. R. Brown, E. Chang, J. Coats, P. deFur, T. Dhadialla, J. Edwards, L. Riddiford, M. Simpson, T. Snell, M. Thorndyke, and F. Matsumura, 1999. In: P. deFur, M. Crane, C. Ingersoll, and L. Tattersfield, eds. *Endocrine disruption in invertebrates: Endocrinology, testing and assessment*. Pensacola, FL: SETAC Press, 23-106.
- LeBlanc G, P. Campbell, P. den Besten, R. Brown, E. Chang, J. Coats, P. deFur. T. Dhadialla, J. Edwards, L. Riddiford, M. Simpson, T. Snell, M. Thorndyke, and F. Matsumura, 1999. In: P. deFur, M. Crane, C. Ingersoll, and L. Tattersfield, eds. *Endocrine Disruption in Invertebrates: Endocrinology, Testing and Assessment*. Pensacola, FL: SETAC Press, pp. 23-106.
- Legler, J., C. E. van den Brink, A. Brouwer, A. J. Murk, P. T. van der Saag, A. D. Vethaak, and B. van der Burg, 1999. Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line. *Toxicol. Sci.* 48: 55-66.
- Lesser, B and N. Bruchovsky, 1973. The effects of testosterone, 5 α -dihydrotestosterone and adenosine 3',5'-monophosphate on cell proliferation and differentiation in RAT prostate. *Biochim. Biophys. Acta.* 308: 426-437.
- Levin, M. 1998. Left-right asymmetry and the chick embryo. *Cell Dev. Biol.* 9: 67-76.
- Li, C. M., S. Takahashi, S. Taneda, C. Furuta, G. Watanabe, A. K. Suzuki, and K. Taya. 2006. Impairment of testicular function in adult male Japanese quail (*Coturnix japonica*) after a single administration of 3-methyl-4-nitrophenol in diesel exhaust particles. *J Endocrinol.* 189: 555-64.

- Liang, J. X., R. Otsuka, M. Wada, and Y. Yoshimura, 2004. The cloacal test: a method for testing anti-androgenic effects of chemicals in birds. *J. Poult. Sci.*, 41: 58-63.
- Liao, S., D. K. Howell, and T. M. Chang, 1974. Action of a non-steroidal antiandrogen, fultamide, on the receptor binding and nuclear retention of 5 α -dihydrotestosterone in rat ventral prostate. *Endocrinology*. 94: 1205-1209.
- Liu, H., C. Zhang, X. Tang, W. Zeng, and Y. Mi, 2005. Stimulating effects of androgen on proliferation of cultured ovarian germ cells through androgenic and estrogenic actions in embryonic chickens. *Dom. Anim. Endocrinol.* 28: 451-462.
- Maeda, T., and Y. Yoshimura, 2002a. Effects of diethylstilbestrol administration on sperm motility and reproductive function in male Japanese quail (*Coturnix japonica*). *J. Poult. Sci.* 39: 27-33.
- Maeda, T., and Y. Yoshimura, 2002b. Effects of ethynylestradiol injection into maternal Japanese quail (*Coturnix japonica*) on male reproductive function of the F1 generation. *J. Poult. Sci.* 39: 310-315.
- Mak, P., F. D. Cruz, and S. Chen, 1999. A Yeast screen system for aromatase inhibitors and ligands for androgen Receptor: Yeast cells transformed with aromatase and androgen receptor. *Environm. Health Perspec.* 107: 855-860.
- Mantelli, F., C. Moretti, A. Micera, and S. Bonini, 2007. Conjunctival mucin deficiency in complete androgen insensitivity syndrome (CAIS). *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophtalmol.* 245: 899-902.
- Marty, M. S., J. W. Crissman, and E. W. Carney. 2001. Evaluation of the male pubertal assay's ability to detect thyroid inhibitors and dopaminergic agents. *Toxicol. Sci.* 60: 63-76.
- Massa, R., D. T. Davies, and L. Bottoni, 1989. Cloacal gland of the Japanese quail: Androgen dependence and metabolism of testosterone. *J. Endocrinol.* 84: 223-230.
- McArthur, M. L. B., G. A. Fox, D. B. Peakall, and B. J. R. Philogene, 1983. Ecological significance of behavioral and hormonal abnormalities in breeding Ring Doves fed an organochlorine chemical mixture. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 12: 343-353.
- McFarland, L. Z., R. L. Warner, W. O. Wilson, and F. B. Mather, 1968. The cloacal gland complex of the Japanese quail. *Experientia.* 15 : 941-943.
- McGary, S., P. F. P. Henry, and M. A. Ottinger, 2001. Impact of vinclozolin on reproductive

- behavior and endocrinology in Japanese quail (*coturnix coturnix japonica*). Environ. Toxicol. Chem. 20: 2487-2493.
- McMurry, C. S., and R. L. Dickerson, 2001. Effects of binary mixtures of six xenobiotics on hormone concentrations and morphometric endpoints of northern bobwhite quail (*Colinus Virginianus*). Chemosphere. 43: 829-837.
- Milstein, P. I. S., I. Prestt, and A. A. Bell, 1970. The breeding cycle of the grey heron. Ardea. 171-257.
- 宮本 純之. 2001. 内分泌攪乱物質研究の最前線 - 内分泌活性物質をめぐる国際動向 - . (社) 日本化学会編. 学会出版センター. 3-13.
- 水野 重樹. 2001. 鳥類のZW型性染色体による性決定、性分化機構の研究の現状：哺乳類の研究と比較して. 生化学. 73: 1411-1427.
- Mizushima, S., N. Saito, and K. Shimada, 2006. cDNA cloning and mRNA expression of androgen receptor in male Japanese quail (*coturnix coturnix japonica*). J. Poult. Sci. 43: 173-179.
- Monosson, E., W. R. Kelce, C. Lambright, J. Ostby, and L. E. Gray, Jr., 1999. Peripubertal exposure to the antiandrogenic fungicide, vinclozolin, delays puberty, inhibits the development of androgen-dependent tissues, and alters androgen receptor function in the male rat. Toxicol. Ind. Health. 15: 65-79.
- 森 千里. 1995. 生殖細胞シリーズ - 生殖腺 (性腺) の発生・分化. 臨床科学. 31: 1405-1413.
- 守内 哲也. 1988. PCNA/DNA ポリメラーゼ δ 補助蛋白質とその遺伝子. 蛋白質核酸酵素. 33: 1179-1185.
- Morizane, S., S. Toji, M. Matsumoto, and I. Miyagawa, 2005. Effects of testosterone replacement on lower urinary tract functions in elderly male rats. Yonago Acta Medica. 48: 93-99.
- Mura, E., C. Barale, M. J. Quinn Jr., G. Panzica, M. A. Ottinger, and C. Viglietti-Panzica, 2009. Organizational effects of DDE on brain vasotocin system in male Japanese quail. Neurotoxicology. 30: 479-484.
- Nakamura, K., K. Shibuya, N. Saito, K. Shimada, A. Ohshima, T. Hirai, and T. Nunoya, 2008. mRNA expression of cytochrome P450 17 α hydroxylase, cytochrome P450 aromatase, anti-Müllerian hormone, estrogen receptor α , and androgen receptor in developing gonads of Japanese quail. J. Poult. Sci. 45: 298-302.
- Navara, K. J., and M. T. Mendonca, 2008. Yolk androgens as pleiotropic mediators of physiological

- processes: a mechanistic review. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol Integr. Physiol.* 150: 378-386.
- Neri, R., K. Florance, P. Koziol, and S. V. Cleave, 1972. A biological profile of a nonsteroidal antiandrogen, SCH 13521 (4'-nitro-3'-trifluoromethylisobutylanilide). *Endocrinology.* 91: 427-437.
- Neumann, F., and V. R. Berswordt-Wallrabe, 1966. Effects of the androgen antagonist cyproterone acetate on the testicular structure, spermatogenesis and accessory sexual glands of testosterone-related adult hypophysectomized rats. *J. Endocrinol.* 35: 363-371.
- OECD (Organization for Economic Co-operation and Development), 2006. Detailed review paper for avian two-generation toxicity test. OECD Series on Testing and Assessment. June 2006.
- OECD (Organization for Economic Co-operation and Development), OECD guideline for testing of chemicals No. 206 "Avian reproduction test". April 1984.
- Official Journal of the European Union: 2009. Regulation (EC) No 1107/2009 of the European parliament and of the council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC.
- Onagbesan, O., V. Bruggeman, and E. Decuypere, 2009. Intra-ovarian growth factors regulating ovarian function in avian species: A review. *Anim. Reprod. Sci.* 111: 121-140.
- Orth, J. M., 1984. The role of follicle-stimulating hormone in controlling sertoli cell proliferation in testes of fetal rats. *Endocrinology.* 115: 1248-1255.
- Osawa, T., and T. Tsuji, 1987. Fraction and structural assessment of oligosaccharides and glycopeptides by use of immobilized lectins. *Ann. Rev. Biochem.* 56 : 21-42.
- Ottinger, M. A., and H. J. Brinkley, 1979a. Testosterone and sex-related physical characteristics during the maturation of the male Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Biol. Reprod.* 20: 905-909.
- Ottinger, M. A., and H. J. Brinkley, 1979b. The ontogeny of crowing and copulatory behaviour in Japanese quail. *Behav. Proc.* 4: 43-51.
- Ottinger, M. A., E. Lavoie., N. Thompson, A. Barton, K. Whitehouse, M. Barton, M. Abdelnabi, M. Quinn Jr., G. Panzica, and C. Viglietti-Panzica, 2008. Neuroendocrine and behavioral effects of embryonic exposure to endocrine disrupting chemicals in birds. *Brain Res Rev.* 57: 376-385.

- Pangel, P. L., P. J. Sharp, and C. G. Gutierrez, 2006. Testosterone antagonist (flutamide) blocks ovulation and prevulatory surges of progesterone, luteinizing hormone and oestradiol in laying hens. *Reprod.* 131: 1109-1114.
- Prelich, G., C-K. Cheng, M. Kostura, M. B. Mathews, A. G. So, K. M. Downey, and B. Stillman. 1987. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase- δ auxiliary protein. *Nature.* 326: 517-520.
- Quinn, Jr. M. J., C. L. Summitt, and M. A. Ottinger, 2006. Effects of androgen disruption by DDE on the development and functioning of the immune system in Japanese. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 28: 535-544.
- Quinn, Jr. M. J., E. T. Lavoie, and M. A. Ottinger, 2007a. Reproductive toxicity of trenbolone acetate in embryonically exposed Japanese quail. *Chemosphere.* 66: 1191-1196.
- Quinn, Jr. M. J., M. McKernan, E. T. Lavoie, and M. A. Ottinger, 2007b. Immunotoxicity of trenbolone acetate in Japanese quail. *J. Toxicol. Environ. Health, Part A.* 70: 88-93.
- Ratcliffe, D. A., 1967. Decrease in eggshell weight in certain birds of prey. *Nature.* 215: 208-210.
- Ratcliffe, J., 1970. Changes attributable to pesticides in egg breakage frequency and eggshell thickness in some British birds. *J. Appl. Ecol.* 7: 67-115.
- Rissman, E. F., M. Ascenzi, P. Johnson, and E. Adkins-Regan, 1984. Effect of embryonic treatment with oestradiol benzoate on reproductive morphology, ovulation and oviposition and plasma LH concentrations in female quail (*Coturnix coturnix japonica*). *J. Reprod. Fert.* 71: 411-417.
- Rogers, J. M., and M. S. Denison, 2000. Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals. *In Vitro Mol. Toxicol.* 13: 67-82.
- Sachs, B. D., 1967. Photoperiodic control of the cloacal gland of the Japanese quail. *Science* 157: 201-203.
- 斎藤 幸一, 住田 佳代, 2003. 核内受容体を利用したバイオ技術による内分泌攪乱化学物質の分析と生物影響評価. *J. Environ. Biotech.* 3: 3-13.
- Sanders, E. J., and M. A. Wride, 1997. Roles for growth and differentiation factors in avian embryonic development. *Poult. Sci.* 76: 111-117.
- Sanderson, J. T., and G. D. Bellward, 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.
- Schagger, H., and G. von Jagow, 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166: 368–379.
- Schumacher, M. J., C. Hendrick, and J. Balthazart, 1989. Sexual differentiation in quail: critical period and hormonal specificity. *Horm. Behav.* 23: 130-149.
- Shibuya, K., M. Mizutani, K. Sato, M. Itabashi, and T. Nunoya, 2005. Comparative evaluation of sex reversal effects of natural and synthetic estrogens in sex reversal test using F1 (AWE x WE) Japanese quail embryo. *J. Poult. Sci.* 42: 119-129.
- Shibuya, K., M. Mizutani, M. Wada, K. Sato, and T. Nunoya, 2004. A new screening model using F1 (AWE x WE) Japanese quail embryo for evaluating sex reversal effects. *J. Toxicol. Pathol.* 17: 245-252.
- Shimada, K., 2001. Sex determination and sex differentiation. *Avian and Poult. Biol. Rev.* 13: 1-14.
- Smith, J. P., and M. McVeagh, 1991. Widespread organotin pollution in New Zealand coastal waters as indicated by imposex in dogwhelks. *Mar. Pollut. Bull.* 22: 409-413.
- Sonneveld, E., H. J. Jansen, J. R. C. Riteco, A. Brouwer, and B. van der Burg, 2005. Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Tox. Sci.* 83: 136-148.
- Sperry, T. S., D. W. Wacker, and J. C. Wingfield, 2010. The role of androgen receptors in regulating territorial aggression in male song sparrows. *Horm. Behav.* 57: 86-95.
- Sporn, M. B., A. B. Roberts, L. W. Wakefield, and B. de Crombrughe, 1987. Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor- β . *J. Cell Biol.* 105: 1039–1045.
- Sporn, M. B., A. B. Roberts, L. W. Wakefield, and R. K. Assoian, 1986. Transforming growth factor- β : biological function and chemical structure. *Science* 233: 532–534.
- Stoker, T. E., L. G. Parks, L. E. Gray, and R. L. Cooper, 2000. Endocrine-disrupting chemicals: Prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid function in the male rat. A focus on the EDSTAC Recommendations. *Crit. Rev. Toxicol.* 30: 197-252.
- Struger, J., and D. V. Weseloh, 1985. Great Lakes Caspian terns: Egg contaminants and biological

- implications. Colonial. Water birds. 8: 142-149.
- Sugi, Y., and R. R. Markwald, 2003. Endodermal growth factors promote endocardial precursor cell formation from precardiac mesoderm. *Dev. Biol.* 263: 35–49.
- Suzuki, T., and S. Kusuhara, 1996. Immunohistochemical detection of androgen receptors in the uropygial glands of Japanese quails. *Jpn. Poult. Sci.* 33: 29-32.
- Szelei, J., J. Jimenez, A. M. Soto, M. F. Luizzi, and C. Sonnenschein, 1997. Androgen-induced inhibition of proliferation in human breast cancer MCF7 cells transfected with androgen receptor. *Endocrinology.* 138: 1406-1412.
- Szentkuti, L. and M. L. Enss, 1998. Comparative lectin-histochemistry on the pre-epithelia mucus layer in the distal colon of conventional and germ-free rats. *Comp. Biochem. Physiol.* 119A: 379-386.
- Thurston, R. J., and N. Korn, 2000. Symposium: Regulation of testes function – Spermiogenesis in commercial poultry species: Anatomy and control: *Poult. Sci.* 79: 1650-1668.
- U.S. Environmental Protection Agency, 1998. Endocrine Disruptor Screening Program, “Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report ”.
- U.S. Environmental Protection Agency, Ecological effects test guidelines OPPTS 850.2300 “Avian reproduction test”. April 1996.
- U.S. Environmental Protection Agency, Federal Register. 2009. Vol. 74, No. 71.
- U.S. Environmental Protection Agency's Office of Pollution Prevention and Toxics and Syracuse Research Corporation. The Estimation Programs Interface (EPI) Suite Ver. 4.
- Utsumi, T., and Y. Yoshimura, 2009. Sensitive Embryonic Endpoints with *in ovo* Treatment for Detecting Androgenic and Anti-androgenic Effects of Chemicals in Japanese Quail (*Coturnix japonica*). *Poult. Sci.* 88: 1052-1059.
- 内海 透. 2009. 農薬の非標的生物の生態と影響評価 ～水棲・陸棲生物の欧米の評価動向～. 日本農薬学会 第27回農薬環境科学研究会 シンポジウム講演集. 25-37.
- 内海 透. 2010. 農薬の陸域生態影響に関するリスク評価の現状. 日本農薬学会誌. 35: 52-63.
- Viglietti-Panzica, C., B. Montoncello, E. Mura, M. Pessatti, and G. Panzica, 2005. Organizational effects of diethylstilbestrol on brain vasotocin and sexual behavior in male quail. *Brain Res. Bull.* 65: 225-233.
- Vinggaard, A. M., V. Breinholt, and J. C. Larsen, 1999. Screening of selected pesticides for

- oestrogen receptor activation *in vitro*. Food Addit. Contam. 16: 533-542.
- Wade, J., A. Gong, and A. P. Arnold, 1997. Effects of embryonic estrogen on differentiation of the gonads and secondary sexual characteristics of male zebra finches. J. Exp. Zool. 278: 405-411.
- Wada, M., 1981. Effects of photostimulation, castration, and testosterone replacement on daily patterns of calling and locomotor activity in Japanese quail. Horm. Behav. 15: 270-81.
- 和田 勝, 中路 敦子, 坂本 珠美, 中道 直美, 2002. 鳥類のビテロジェニンの特異に認識する抗体及び鳥類のビテロジェニン測定系. 特開 2002-256000.
- Wheler, E. K., B. Brunström, U. Rannug, and A. Bergman, 1990. 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl: Metabolism by the chick embryo in ovo and toxicity of hydroxylated metabolites. Environ. Chem. 73: 121-132.
- Wilaison, P., and M. Mori, 2009. Effect of selenium on hatchability and cellular glutathione peroxidase mRNA expression during embryogenesis in Japanese quail (*Coturnix japonica*). J. Poult. Sci. 46: 340-344.
- Wong, C., W. R. Kelce, M. Sar, and E. M. Wilson, 1995. Androgen receptor antagonist versus agonist activities of the fungicide vinclozolin relative to hydroxyflutamide. J. Biol. Chem. 270: 19998-20003
- Wren, C. D., 1991. Cause-effect linkages between chemicals and populations of mink (*Mustela vison*) and otter (*Lutra canadensis*) in the Great Lakes basin. J Toxicol. Environ. Health, 33: 549-585.
- 山本一夫・小浪悠紀子 (訳). 2003. レクチン. 歴史、構造、機能から応用まで. Sharon, N., and H. Lis. (著), 第2版, シュプリンガー・ジャパン, 東京.
- Yoshimura, I., and Y. Oohashi, 1992. Statistical analysis for toxicology data. 1st ed. Chijinshokan Co. Ltd. Tokyo, Japan.
- Yoshimura, Y., and M. Fujita, 2005. Endocrine disruption in avian reproduction: the histological analysis. Avian Poult. Biol. Reviews, 16: 29-40.
- Yoshimura, Y., V. S. Chowdhury, M. Fujita, T. Maeda, and T. Obitsu, 2002. Effects of nonylphenol injection into maternal Japanese quail (*Coturnix japonica*) on the female reproductive functions of F1 generation. J. Poult. Sci. 39: 266-273.

謝辞

稿を終えるに臨み、終始ご懇篤なるご指導を賜った広島大学大学院 生物圏科学研究科 家畜生体機構学研究室／吉村 幸則 教授に深く感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、数々のご助言と多大なるご配慮を頂いた同研究室／磯部 直樹 准教授、同研究科 家畜生殖学研究室／前田 照夫 教授、家畜管理学研究室／豊後 貴嗣 教授に深く感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、有益なご助言を頂いた同大学大学院生物圏科学研究科／Das Shubash Chandra 博士、Ahmad Mohammad Abdel Mageedさん、Mohamed Abdallahさんに深く感謝致します。

本研究を進める上で多大なるご理解・ご配慮を賜った住友化学株式会社 生物環境科学研究所／片木 敏行 博士に深く感謝の意を表します。

本研究に着手するにあたって適切なご助言・ご配慮を頂いた住友化学株式会社 生物環境科学研究所／瀧本 善之 博士、齋藤 昇二 博士に深く感謝の意を表します。

本研究を進める上で適切な業務配慮とご助言を頂いた住友化学株式会社 生物環境科学研究所／宮本 貢さん、於勢 桂子さん、田中 仁詞 博士、藤原 彰子さんに深く感謝の意を表します。

本研究の病理組織標本作製にあたって適切なご助言・ご支援を頂いた住友化学株式会社 生物環境科学研究所／宮田 かおり 博士、須方 督夫 博士、山口 真希さん、前田 圭子さん、緒方 敬子さんに深く感謝の意を表します。

最後に、本研究を行うにあたって、終始 勇気と希望ならびに活力を与えてくれた我が最愛の家族／妻・尚香、長男・達、長女・敦公、本当にありがとうございました。

平成 22 年 9 月

内海 透