

学位論文

インジウムの発生毒性に関する研究

2009

中島幹夫

学位論文

インジウムの発生毒性に関する研究

2009

中島幹夫

目次

緒論.....	1
第1章 ラットにおける静脈内および経口投与によるインジウムの発生毒性 の検討.....	5
材料および方法.....	6
結果.....	9
考察.....	11
小括.....	14
Tables (Tables 1~12).....	15
Figures (Fig. 1~5).....	27
第2章 ラット全胚培養およびトキシコキネティクス実験によるインジウム の発生毒性の検討.....	32
材料および方法.....	34
結果.....	38
考察.....	40
小括.....	42
Tables (Tables 13~14).....	43
Figures (Fig. 6~8).....	45
第3章 ラットおよびマウスにおけるインジウムの発生毒性の種差の検討.....	48
材料および方法.....	49
結果.....	51
考察.....	53
小括.....	55
Tables (Tables 15~18).....	56
Figures (Fig. 9~10).....	60
第4章 インジウムのラット胎子軟骨発生に及ぼす影響の検討.....	62
材料および方法.....	63
結果.....	65
考察.....	67
小括.....	69
Tables (Tables 19~22).....	70
Figures (Fig. 11~13).....	74
第5章 インジウムによるラット胎子尾部奇形発現機序の検討.....	77
材料および方法.....	79

結果.....	82
考察.....	85
小括.....	89
Tables (Tables 23~25).....	90
Figures (Fig. 14~17).....	93
第 6 章 母体ラットへのインジウム投与が引き起こす胎子尾部の BMP-4	
mRNA 発現量の変化	101
材料および方法.....	102
結果.....	105
考察.....	106
小括.....	108
Tables (Tables 26~27).....	109
Figure (Fig. 18).....	111
総括.....	112
謝辞.....	117
文献.....	118
要旨.....	130
英文抄録.....	136

緒論

生物の二大特性は、生きること（生命）と、次世代を生む（生殖）あるいは次世代が生れること（発生）である。生まれつき発生が正常でない先天異常のうち、先天奇形が最も重要視されてきた。古代人は、奇形を神として崇め、恐られてきた。先天異常学の英語 Teratology は、ギリシャ語の *teras*：予言するに由来する（谷村, 1992）。

実験奇形学は、19世紀の後半における非哺乳類を用いた研究から始まった。いろいろな環境条件、たとえば、温度、細菌毒素類、薬物などが、鳥類、爬虫類、魚類あるいは両生類の発生に影響を及ぼすことが見いだされた。哺乳類における奇形児の誘発に関する最初の論文は、1930年～1940年頃からみられ、母体の栄養成分（ビタミン A、ビタミン B2 等）の欠乏が主に検討された（Warkany & Roth, 1948）。その後、多くの研究がなされ、いろいろな化学物質や物理的要因、たとえば、ナイトロジェンマスタード、トリパンプルー、ホルモン類、代謝拮抗剤、アルキル化剤、低酸素あるいは X 線などが哺乳類で催奇形性を示すことが報告された（Warkany, 1965）。また、ヒトの疫学の誕生に伴い、1941年には妊婦の風疹感染による胎児奇形の誘発が報告された（Gregg, 1941）。

しかしながら、これらの事実の重大さは、1961年に睡眠・抗つわり薬であるサリドマイドの服用により、アザラシ肢症を主徴とする特有の奇形症候群児が多発（日本を含めて世界中で7700人以上と推定される）するまで、一般に広く受け入れられなかった（Schardein, 2000a）。サリドマイド事件以前は、ヒトの先天奇形については環境要因よりも遺伝要因が重要視され、また、ヒトの胎児は子宮、胎盤で厚く保護されていると一般に信じられてきた。しかし、サリド

マイドの催奇形性の発見に伴い、医薬品や化学物質の胚・胎子に対する影響、とりわけ催奇形性が医学と社会の重要な課題となり、生殖発生毒性という概念が成立した。親世代からみれば生殖、次世代からみれば発生は、主要な部分が重なり合っており、化学物質等の環境要因が親世代の生殖ならびに次世代の発生の過程に有害な反応を引き起こす能力を生殖発生毒性という（木原&谷村, 2002）。

現在から将来に向けて地球的規模の環境の変化は、人類のみならず地球上のあらゆる生物の存続を脅かす恐れがますます強くなってきている。このように、環境因子による生殖や発生の障害、すなわち生殖発生毒性はたいへん重要な課題であり、ヒトにおける危険性予測のための動物実験、生殖発生毒性試験は、現時点では必要不可欠であり、かつ、実験手法のさらなる洗練が必要である。1961年には生殖発生毒性の概念を取り入れた日本先天異常学会が設立され、その後、国際先天異常学会連盟が結成されると共に、現在では実験動物を用いた化学物質の胎子への影響評価に関する行政規制が体系化されている（Kameyama, 2001）。環境因子のヒトに対する発生毒性を動物で試験する根拠は、ヒトで発生毒性が確立された環境因子は、なんらかの動物種で発生毒性が示されていることである（US Food and Drug Administration, 1980）。

個体の発生は、種特有の形態を形成する種特有の現象であるため、実験動物を用いた化学物質の毒性試験で発生毒性がみられた場合、その毒性発現機構の解明ならびにヒトへの外挿は、数ある毒性試験の中で最も困難なもののひとつである。しかし、今後、組織培養および遺伝子工学等のバイオテクノロジーを応用した発生毒性実験により、細胞あるいは細胞下レベルでの発生毒性発現機構が明らかになれば、ヒトにおける発生毒性の理論的な推定が可能になるものと期待される。一方、実験動物を用いた発生毒性実験の結果をヒトへ外挿する

にあたっては、これら狭義の毒性発現機構のほかに、毒性物質の体内動態であるトキシコキネティクスならびに発生毒性の動物種差を考慮する必要がある。すなわち、多種の動物において、同じ型の発生毒性が示されるときは、ヒトにおいても同様な発生毒性が誘発される可能性が高いと考えられる。反対に、動物種差が著明であれば、トキシコキネティクスの、あるいは胎子組織の感受性に差があるかどうか、そしてヒトはどちらの動物種により近いかを考察することが重要である。

インジウムは周期律表のⅢbに属する金属で、産業的には金属の表面塗装、合金あるいはガラスの製造等に長期にわたって使用されてきた (Venugopal & Luckey, 1978) が、近年ではマイクロエレクトロニクス産業で多用されるようになり (Lewis, 1986)、レアメタルであることから液晶パネルの透明電導膜等からのリサイクル技術の開発が求められており、その詳細な安全性評価が必要である。

インジウムを含む化合物は、実験動物において血液毒性、肺、肝臓、腎臓および心臓等に炎症性の変化や組織変性をきたすことが報告されている (McCord et al., 1942, Castronovo & Wagner, 1971)。しかしながら、インジウムの発生毒性に関する情報は極めて少なく、催奇形性の有無については明確でない。妊娠ハムスターにおいては、妊娠 8 日に硝酸インジウムを単回静脈内投与した場合、0.5 mg/kg 以上の投与量において、胚・胎子死亡率および胎子の外表奇形発生率の増加が認められている (Ferm & Carpenter, 1970)。一方、妊娠マウスにおいては、妊娠 6~15 日に塩化インジウムを反復経口投与すると、150 mg/kg 以上の投与量において、胚・胎子死亡率の増加が認められているが、催奇形性は報告されていない (Chapin et al., 1995)。ハムスターとマウスにおける実験結果の相違は、動物種差による感受性の違いによるものか、あるいは実験条件

の違い（投与経路、投与期間および硝酸インジウムと塩化インジウムの違い）によるものか明らかではない。また、インジウムを含む化合物のラットに対する催奇形性に関する報告は、これまでにない。

そこで、本論文ではインジウムの発生毒性の特徴および毒性発現機序について詳細に検討した。インジウムのヒトでの発生毒性に関して意義のある報告はほとんどない現状において、動物実験のデータは警告となりうると思われる。

なお、本論文においては、生殖発生毒性のうち、化学物質等の環境要因が胎子の器官形成期に作用して形態的な発生障害をきたす能力を狭義の「催奇形性」、胎生期に作用した環境要因が胚・胎子死亡あるいは胚・胎子発育遅延をきたす能力は狭義の「胚・胎子毒性」という用語を用いたが、広義の胚・胎子毒性には催奇形性が含まれることを付記しておく。

第 1 章

ラットにおける静脈内および経口投与によるインジウムの発生毒性の検討

インジウムは、近年ではマイクロエレクトロニクス産業で多用されるようになり (Lewis, 1986)、レアメタルであることから液晶パネルの透明電導膜等からのリサイクル技術の開発が求められており、その詳細な安全性評価が必要である。しかし、インジウムの発生毒性に関する情報は極めて少なく、催奇形性の有無については明確でない。

妊娠ハムスターにおいては、妊娠 8 日に硝酸インジウムを単回静脈内投与した場合、0.5 mg/kg 以上の投与量において、胚・胎児死亡率および胎児の外表奇形発生率の増加が認められている (Ferm & Carpenter, 1970)。一方、妊娠マウスにおいては、妊娠 6~15 日に塩化インジウムを反復経口投与すると、150 mg/kg 以上の投与量において、胚・胎児死亡率の増加が認められているが、催奇形性は報告されていない (Chapin et al., 1995)。ハムスターとマウスにおける実験結果の相違は、動物種差による感受性の違いによるものか、あるいは実験条件の違い (投与経路、投与期間および硝酸インジウムと塩化インジウムの違い) によるものか明らかではない。また、インジウムのラットに対する催奇形性に関する報告は、これまででない。

そこで、第 1 章ではインジウムの発生毒性、特に催奇形性の有無を明らかにするため、妊娠 9 日のラットにインジウムを静脈内または経口投与して、妊娠 20 日に胎児の発育ならびに形態を調べた。

材料および方法

被験物質：

塩化インジウム 4 水和物 ($\text{InCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、和光純薬工業株式会社、大阪) を用いた。以下、インジウムと略して記載し、投与量は塩化インジウム重量で記載した。

実験動物：

Wistar 系ラットを用いた。ラットは一定の明暗周期 (12 時間明期、12 時間暗期) および温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ の条件下で飼育し、飼料 (CRF-1、日本チャールス・リバー株式会社、神奈川) と水は自由摂取させた。発情徴候を示す雌 (12 週齢) を雄 (13 週齢) と 16 時前後から一夜同居させ、翌朝、膈垢の観察を行い精子が認められた動物を交尾確認動物として、その日を妊娠 0 日とした。妊娠 0 日における各群の平均体重がほぼ等しくなるように、静脈内投与実験、経口投与実験ともに各 4 群に振り分けた。

被験物質の投与：

インジウムは静脈内投与実験に用いるときは生理食塩液 (株式会社大塚製薬工場、徳島)、経口投与実験に用いるときは蒸留水 (株式会社大塚製薬工場、徳島) に溶解した。投与液の調製は投与直前に行った。投与量は静脈内投与実験では 0.1、0.2 および 0.4 mg/kg、経口投与実験では 75、150 および 300 mg/kg とした。

静脈内投与実験においては 27G の注射針 (テルモ株式会社、東京) とディスプレイポージブルの注射筒 (テルモ株式会社、東京) を用いて妊娠 9 日に尾静脈より 1

mL/kg の投与容量で投与した。経口投与実験ではラット用経口ゾンデ（フチガミ器械店、京都）を用いて妊娠9日に5 mL/kg の投与容量で強制経口投与した。対照群には同様に溶媒のみを投与した。

観察および検査：

一般症状を毎日観察した。さらに体重を妊娠0、2、4、6、8、9、10、12、14、16、18 および20日に、摂餌量を妊娠2、4、6、8、10、12、14、16、18 および20日に、それぞれ測定した。妊娠20日に全例をエーテル麻酔下にて帝王切開して、母動物の主要器官を肉眼的に観察し、さらに、着床数、胚・胎子死亡率および生存胎子数を調べた。生存胎子については雌雄を判別した後、口腔内を含む外表奇形の有無を観察し、体重および胎盤重量を測定した。1腹につき生存胎子の約1/2を99%エタノールで固定し、Dawson法（Dawson, 1926）に準じてアリザリンレッドS染色による骨格標本を作製し、骨格奇形や骨格変異の有無および化骨状態を観察した。残りの生存胎子はBouin液に固定し、Wilson法（Wilson, 1965）および西村の顕微解剖法（Nishimura, 1974）により頭部および胸・腹部の器官の観察を行った。

統計学的解析法：

母動物のデータについては各個体を、胎子のデータについては同腹児の平均値を標本単位とし、全群の等分散性を「Bartlettの等分散検定」により5%水準で行い、有意でない場合は「一元配置分散分析」を、有意な場合は「Kruskal-Wallis検定」を行った。「一元配置分散分析」により5%水準で有意な場合は「Dunnettの多重比較」を、「Kruskal-Wallis検定」により5%水準で有意な場合は「ノンパラ Dunnettの多重比較」を行った。なお、「Dunnettの

多重比較」、「ノンパラ Dunnett の多重比較」は5%及び1%水準で行った。5%の危険率で有意差がみられた場合、統計学的に有意であるとした。

結果

静脈内投与実験：

母動物の体重を Fig.1 に、摂餌量を Fig.2 に示した。体重および摂餌量について、対照群と各インジウム投与群との間に統計学的な有意差は認められなかった。また、母動物の一般症状および剖検所見に異常は認められなかった。すなわち、母動物に毒性変化は認められなかった。

妊娠 20 日における胎子の発育状況を Table 1 に示した。0.1 および 0.2 mg/kg 群においては、対照群との間に統計学的な有意差はみられなかった。しかし、0.4 mg/kg 群においては、胎子重量および胎盤重量が統計学的に有意に減少した。また、統計学的な有意差はみられないものの、0.4 mg/kg 群の胚・胎子死亡率は 29.7% を示し、対照群 (7.2%) に比べて高値を示した。

胎子の形態観察では、0.4 mg/kg 群において胎子の外表、内臓および骨格奇形発生率の統計学的に有意な増加が認められた。

胎子の外表奇形を Table 2 に示した。0.1 および 0.2 mg/kg 群において異常はみられなかったが、0.4 mg/kg 群では 65.0% の胎子に外表奇形が認められた。観察された奇形の主な型は曲尾 (48.9%)、短尾 (36.2%)、欠指 (15.2%)、口蓋裂 (13.4%) 等であった。曲尾と短尾の合併ならびに欠指を有する胎子の写真を Fig.3 に示した。

胎子の内臓奇形を Table 3 に示した。0.1 および 0.2 mg/kg 群において異常はみられなかったが、0.4 mg/kg 群では 26.0% の胎子に内臓奇形が認められた。観察された奇形の主な型は腎盂拡張 (15.9%)、停留精巣 (8.6%)、心室中隔欠損 (4.8%) 等であった。

骨格観察成績は、骨格奇形、骨格変異および骨格の化骨進行度を示す形質に

分類し、解析した。胎子の骨格奇形を Table 4 に示した。0.1 および 0.2 mg/kg 群において骨格奇形はみられなかったが、0.4 mg/kg 群では 56.4%の胎子に骨格奇形が認められた。観察された奇形の主な型は胸骨核の癒合 (26.9%)、肋骨の癒合 (23.0%)、椎体の欠損 (14.6%)、椎弓の分離 (10.0%) 等の中軸骨格の異常であった。胎子の骨格変異を Table 5 に示した。対照群を含む各投与群に骨格変異が散見されたが、0.4 mg/kg 群では対照群に比べ骨格変異発生率が統計学的に有意に増加 (79.4%) した。胎子の化骨進行度を Table 6 に示した。0.4 mg/kg 群において胸骨核における化骨遅延がみられ、対照群との間に統計学的な有意差が認められた。

経口投与実験：

母動物の体重を Fig.4 に、摂餌量を Fig.5 に示した。体重および摂餌量について、対照群と各インジウム投与群との間に統計学的な有意差は認められなかった。また、母動物の一般症状および剖検所見に異常は認められなかった。すなわち、母動物に毒性変化は認められなかった。

妊娠 20 日における胎子の発育状況を Table 7 に、胎子の外表奇形を Table 8 に、内臓奇形を Table 9 に、骨格奇形を Table 10 に、骨格変異を Table 11 に、化骨進行度を Table 12 に、それぞれ示した。300 mg/kg 群の胎子重量は対照群より 5%程度低かったが、統計学的な有意差は認められなかった。同様に、胎子の形態観察においても奇形発生率の統計学的に有意な増加は認められなかった。しかし、300 mg/kg 群では静脈内投与実験の 0.4 mg/kg 群でみられた外表奇形と同一型の奇形である曲尾および短尾が 11.7%および 10.0%みられた。これらの項目は、もし、より多くの動物を本実験に使用していたならば、対照群との間に統計学的な有意差を示したかもしれない。

考察

本実験の結果は、妊娠 9 日のラットにおいてインジウムを単回静脈内投与することにより胎子奇形が誘発されることを明らかに示している。筆者の知る限りにおいて、インジウムのラットに対する催奇形性を明らかにした実験は本実験が初めてである。

受精卵は、哺乳動物では胚盤胞となって子宮内膜と接着する(着床)。着床後、内細胞塊は上下の 2 層(後に 3 層)に分かれ、次いで上の層から外胚葉が出現して、体軸が決定され、外・中・内胚葉からそれぞれ器官原器が生じる(江口, 1979a)。原始線条の出現から口蓋閉鎖までを器官形成期という。器官形成期は、ヒトでは妊娠 18~70 日、ラットでは妊娠 8~16 日、マウスでは妊娠 7~15 日、ウサギでは 7~19 日とされる(Hoar & Monie, 1981)。厳密な定義はないが、一般に器官形成終了までの次世代を広義の胚あるいは胎芽(embryo)、その動物種固有の形態を備えると胎子(fetus)と呼ぶ。器官形成期では、上述したように胚の 3 胚葉が分化し、短い期間に形態形成が進むため、もっとも催奇形因子に感受性が高く、かつ重大な器官レベルの異常が成立する(Warkany, 1965)。

本実験において、奇形を誘発するインジウムの投与量は 0.4 mg/kg であり、曲尾、短尾および欠指等の外表奇形が高頻度(65.0%)に認められた。一方、300 mg/kg を経口投与した場合、静脈内投与実験と同一の型の外表奇形が誘発されたが少数例であった。すなわち、インジウムの経口投与では、静脈内投与に比べ発生毒性が著しく弱かった。インジウムの投与経路の違いによって発生毒性の強さに差がみられた原因については第 2 章において検討した。

今回のラットにおける実験結果はハムスターにおける Ferm らの実験結果(Ferm & Carpenter, 1970)と一致した。彼らは妊娠 8 日のハムスターに 0.5

mg/kg 以上の硝酸インジウムを単回静脈内投与すると、胎子に指の奇形が誘発されることを報告している。ハムスターにおいて曲尾や短尾が誘発されなかったのは、ハムスターは先天的に短い尾を有することと関連しているのかもしれない。あるいは、ハムスター胎子の尾芽発生時期は胎齢 8~8.5 日であり、8.75 日に発生する前肢芽に比べ早く (DeSesso, 1997)、先天奇形の臨界期は、その器官原器の出現ないしはそれより少し早い時期であること (木原 & 谷村, 2002) を踏まえると、ハムスターへのインジウムの妊娠 8 日における投与は尾の奇形を誘発するには遅すぎたとも考えられる。ラット胎子の尾芽および前肢芽の発生時期は、それぞれ、胎齢 11~11.5 日および胎齢 11 日であり、(DeSesso, 1997)、本実験では妊娠 9 日のラットにインジウムの投与を行ったことにより、胎子の指と尾における奇形がともに高頻度に誘発された。

動物実験で催奇形性が示される場合、投与量に閾値が存在し、一般に少量での非催奇形域 (胎子の発育遅延がみられる場合が多い)、中等量での胎子致死域と重なる比較的狭い催奇形域、大量での母体致死域がある。一般に催奇形量と胎子致死量とは同じ用量幅にあり、閾値以上で量を増やせば、見かけ上の奇形胎子数は減少して死亡胎子数が増加し、ついには全胎子が死亡するに至る。催奇形域は時として欠如を示すようにみえることがあるが、あるいは催奇形性量の狭い範囲を見逃している可能性も考えられる。しかし、綿密に行われた実験で、胎子致死作用は認められても催奇形作用は認められない化合物は数多く存在する (Schardein, 2000b)。本実験では、妊娠ラットへのインジウムの静脈内投与により催奇形性、胚・胎子致死作用、胎子発育抑制等がみられ、インジウムはラットにおいて明らかな催奇形物質であった。一方、Chapin らの実験では、マウスの妊娠 6~15 日にインジウムを反復経口投与した際、150 mg/kg 以上の投与量において、胚・胎子死亡率の増加が認められているが、催奇形性は認め

られていない (Chapin et al., 1995)。インジウムのラットおよびマウスに対する発生毒性、特に催奇形性の種差については、第3章で検討した。また、インジウムによりラットに誘発される中軸骨格奇形の発現機序については第4章で、尾部奇形発現機序については第5章および第6章で検討した。

小括

インジウムの発生毒性、特に催奇形性の有無を明らかにするため、妊娠 9 日のラットにインジウムを静脈内または経口投与して、妊娠 20 日に胎子の発育ならびに形態を調べた。その結果、インジウムはラットに対して胚・胎子致死作用、胎子発育抑制作用、催奇形性等の発生毒性を示した。筆者の知る限りにおいて、インジウムのラットに対する催奇形性を明らかにした実験は本実験が初めてである。静脈内単回投与により奇形を誘発するインジウムの投与量は 0.4 mg/kg であり、主に尾部および指の外表奇形が認められた。一方、300 mg/kg を経口投与した場合、静脈内投与実験と同一の型の外表奇形が誘発されたが、その数は僅か（低頻度）であった。すなわち、インジウムの経口投与は、静脈内投与に比べ発生毒性が著しく弱いことが明らかとなった (Nakajima et al., 1998)。

Table 1 Fetal growth in pregnant rats received single intravenous administration of indium on day 9 of gestation

	Dose (mg/kg)			
	0(control) ^a	0.1	0.2	0.4
No. of pregnant rats	8	9	9	10
No. of implants ^b	12.9±5.7	16.6±1.8	16.3±1.7	15.0±3.7
Mortality of implants (%)	7.2	6.8	5.4	29.7
No. of live fetuses ^b	11.8±5.1	15.4±2.0	15.4±1.7	11.1±6.6
Sex ratio (male / total)	0.37	0.53	0.52	0.48
Fetal weight (g) ^b				
Male	3.88±0.30	3.79±0.23	3.74±0.18	3.03±0.72*
Female	3.69±0.25	3.60±0.17	3.63±0.17	2.79±0.64**
Placental weight (g) ^b				
Male	0.57±0.08	0.49±0.04	0.49±0.03	0.40±0.10**
Female	0.54±0.08	0.48±0.06	0.49±0.04	0.39±0.07**

^aSaline.

^bMean ± SD.

Asterisks indicate significant differences compared with the control group (*: p<0.05, **: p<0.01).

Table 2 Gross malformations of fetuses from pregnant rats received single intravenous administration of indium on day 9 of gestation

	Dose (mg/kg)			
	0(control) ^a	0.1	0.2	0.4
No. of pregnant rats with live fetus	8	9	9	10
No. of fetuses examined	94	139	139	111
No. of fetuses with gross malformation	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	70 (65.0)**
Kinked tail	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	60 (48.9)**
Brachyury	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	37 (36.2)**
Filamentous tail	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.3)
Oligodactyly	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	21 (15.2)
Cleft palate	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	15 (13.4)*
Club hand	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (2.9)
Micrognathia	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.9)

^aSaline.

Numbers in parentheses are means of incidences per litter.

Asterisks indicate significant differences compared with the control group (*: p<0.05, **: p<0.01).

Table 3 Visceral malformations of fetuses from pregnant rats received single intravenous administration of indium on day 9 of gestation

	Dose (mg/kg)			
	0(control) ^a	0.1	0.2	0.4
No. of pregnant rats with live fetus	8	9	9	9
No. of fetuses examined	45	68	68	52
No. of fetuses with visceral malformation	1 (2.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	10 (26.0)*
Undescended testis	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (8.6)*
Dilatation of renal pelvis	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (15.9)*
Persistent truncus arteriosus	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.6)
Ventricular septal defect	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (4.8)
Persistent left umbilical artery	1 (2.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.6)

^aSaline.

Numbers in parentheses are means of incidences per litter.

Asterisks indicate significant differences compared with the control group (*: p<0.05).

Table 4 Skeletal malformations of fetuses from pregnant rats received single intravenous administration of indium on day 9 of gestation

	Dose (mg/kg)			
	0(control) ^a	0.1	0.2	0.4
No. of pregnant rats with live fetus	8	9	9	10
No. of fetuses examined	49	71	71	59
No. of fetuses with skeletal malformation	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	23 (56.4)**
Fusion of sternebrae	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	13 (26.9)**
Fusion of ribs	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	17 (23.0)**
Fusion of vertebral arches	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.3)
Deformity of vertebral arches	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (6.4)
Splitting of vertebral arches	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (10.0)
Absence of vertebral bodies	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (14.6)
Deformity of scapula	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (2.9)

^aSaline.

Numbers in parentheses are means of incidences per litter.

Asterisks indicate significant differences compared with the control group (**: p<0.01).

Table 5 Skeletal variations of fetuses from pregnant rats received single intravenous administration of indium on day 9 of gestation

	Dose (mg/kg)			
	0(control) ^a	0.1	0.2	0.4
No. of pregnant rats with live fetus	8	9	9	10
No. of fetuses examined	49	71	71	59
No.(%) of fetuses with skeletal variation	13 (27.0)	16 (23.9)	20 (26.2)	42 (79.4)*
Wavy ribs	5 (9.5)	1 (1.6)	4 (5.3)	8 (10.8)
Nodulation of ribs	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.3)
Variation of verbral bodies ^b	1 (2.1)	0 (0.0)	1 (1.4)	32 (64.5)**
Variation of sternebrae ^c	2 (3.2)	1 (1.4)	6 (8.4)	7 (8.9)
Shortening of the 13 th rib	1 (1.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	10 (14.1)
No. of pre-sacral vertebrae	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (7.9)
Cervical rib	0 (0.0)	4 (5.6)	0 (0.0)	0 (0.0)
Lumber rib	4 (10.4)	11 (15.3)	10 (12.3)	10 (12.1)

^aSaline.

^bSplitting or deformity of ossification centers of vertebral bodies.

^cSplitting or asymmetry of sternebrae.

Numbers in parentheses are means of incidences per litter.

Asterisks indicate significant differences compared with the control group (*: p<0.05, **: p<0.01).

Table 6 States of ossification of fetuses from pregnant rats received single intravenous administration of indium on day 9 of gestation

	Dose (mg/kg)			
	0(control) ^a	0.1	0.2	0.4
No. of pregnant rats with live fetus	8	9	9	10
No. of fetuses examined	49	71	71	59
No. of ossified sternebrae ^b	5.4 ± 0.8	5.5 ± 0.4	5.5 ± 0.5	3.4 ± 1.7*
No. of ossified caudal vertebrae ^b	4.1 ± 0.3	4.2 ± 0.3	4.1 ± 0.4	2.0 ± 1.5

^a Saline.

^b Mean ± SD.

Asterisks indicate significant differences compared with the control group (*: p<0.05).

Table 7 Fetal growth in pregnant rats received single oral administration of indium on day 9 of gestation

	Dose (mg/kg)			
	0(control) ^a	75	150	300
No. of pregnant rats	10	9	7	9
No. of implants ^b	16.8±1.7	17.3±1.5	17.1±2.0	17.0±1.4
Mortality of implants (%)	8.3	7.9	5.7	16.0
No. of live fetuses ^b	15.4±1.8	16.0±2.9	16.1±2.1	14.1±5.3
Sex ratio (male / total)	0.52	0.51	0.59	0.56
Fetal weight (g) ^b				
Male	3.84±0.19	3.75±0.20	3.75±0.28	3.65±0.34
Female	3.69±0.18	3.53±0.15	3.54±0.27	3.49±0.29
Placental weight (g) ^b				
Male	0.50±0.04	0.53±0.08	0.51±0.07	0.48±0.04
Female	0.47±0.04	0.50±0.10	0.49±0.09	0.45±0.04

^aDistilled water.

^bMean ± SD.

Table 8 Gross malformations of fetuses from pregnant rats received single oral administration of indium on day 9 of gestation

	Dose (mg/kg)			
	0(control) ^a	75	150	300
No. of pregnant rats with live fetus	10	9	7	8
No. of fetuses examined	154	144	113	127
No. of fetuses with gross malformation	2 (1.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	14 (11.7)
Kinked tail	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	14 (11.7)
Brachyury	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	12 (10.0)
Filamentous tail	2 (1.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Short trunk	2 (1.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

^aDistilled water.

Numbers in parentheses are means of incidences per litter.

Table 9 Visceral malformations of fetuses from pregnant rats received single oral administration of indium on day 9 of gestation

	Dose (mg/kg)			
	0(control) ^a	75	150	300
No. of pregnant rats with live fetus	10	9	7	8
No. of fetuses examined	73	70	55	61
No. of fetuses with visceral malformation	2 (2.5)	0 (0.0)	2 (4.1)	5 (7.8)
Undescended testis	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (3.1)
Aberrant right subclavian artery	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (2.0)	1 (1.6)
Malposition of kidney	1 (1.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Persistent left umbilical artery	1 (1.1)	0 (0.0)	1 (2.0)	2 (3.1)

^aDistilled water.

Numbers in parentheses are means of incidences per litter.

Table 10 Skeletal malformations of fetuses from pregnant rats received single oral administration of indium on day 9 of gestation

	Dose (mg/kg)			
	0(control) ^a	75	150	300
No. of pregnant rats with live fetus	10	9	7	8
No. of fetuses examined	81	74	58	66
No. of fetuses with skeletal malformation	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.8)	6 (10.3)
Fusion of sternebrae	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (3.2)
Fusion of ribs	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (8.5)
Deformity of vertebral arches	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.8)
Bifurcation of ribs	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.8)
Absence of ribs	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.8)
Cleft of sternum	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.8)	0 (0.0)

^aDistilled water.

Numbers in parentheses are means of incidences per litter.

Table 11 Skeletal variations of fetuses from pregnant rats received single oral administration of indium on day 9 of gestation

	Dose (mg/kg)			
	0(control) ^a	75	150	300
No. of pregnant rats with live fetus	10	9	7	8
No. of fetuses examined	81	74	58	66
No. of fetuses with skeletal variation	16 (19.2)	7 (9.7)	11 (20.4)	14 (22.7)
Wavy ribs	4 (4.9)	1 (1.6)	0 (0.0)	8 (13.9)
Variation of verbral bodies ^b	2 (2.4)	0 (0.0)	2 (4.1)	5 (8.3)
Variation of sternebrae ^c	6 (7.2)	2 (2.5)	4 (6.3)	2 (3.2)
Cervical rib	1 (1.1)	1 (1.6)	0 (0.0)	0 (0.0)
Lumber rib	6 (7.2)	3 (4.0)	6 (12.0)	4 (5.9)

^aDistilled water.

^bSplitting or deformity of ossification centers of vertebral bodies.

^cSplitting or asymmetry of sternebrae.

Numbers in parentheses are means of incidences per litter.

Table 12 States of ossification of fetuses from pregnant rats received single oral administration of indium on day 9 of gestation

	Dose (mg/kg)			
	0(control) ^a	75	150	300
No. of pregnant rats with live fetus	10	9	7	8
No. of fetuses examined	81	74	58	66
No. of ossified sternebrae ^b	5.7±0.3	5.4±0.6	5.4±0.5	5.2±1.1
No. of ossified caudal vertebrae ^b	3.9±0.4	3.9±0.5	4.1±0.4	3.7±0.7

^aDistilled water.

^bMean ± SD.

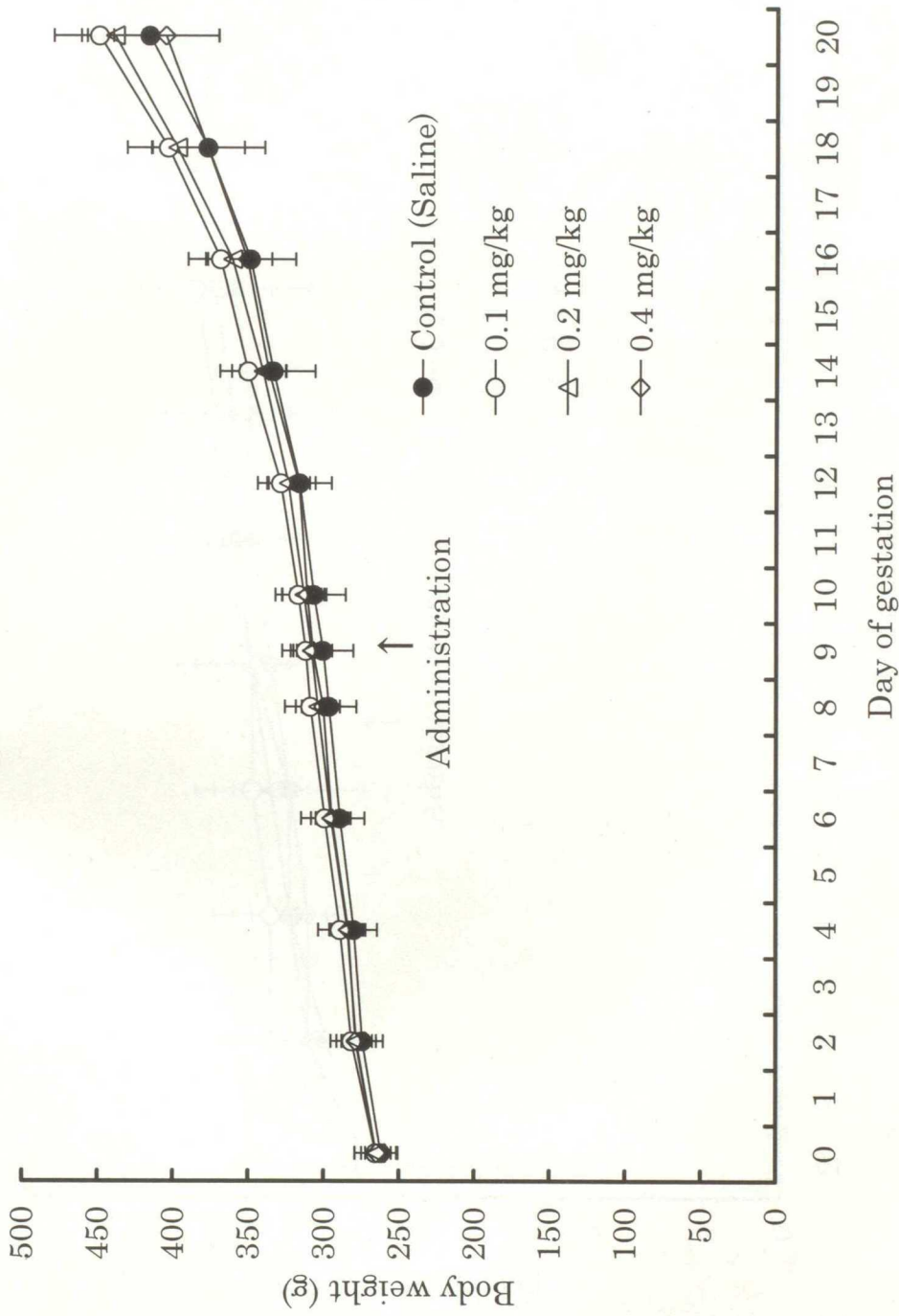


Fig.1 Body weight of pregnant rats received single intravenous administration of indium on day 9 of gestation. Vertical bars represent standard deviation.

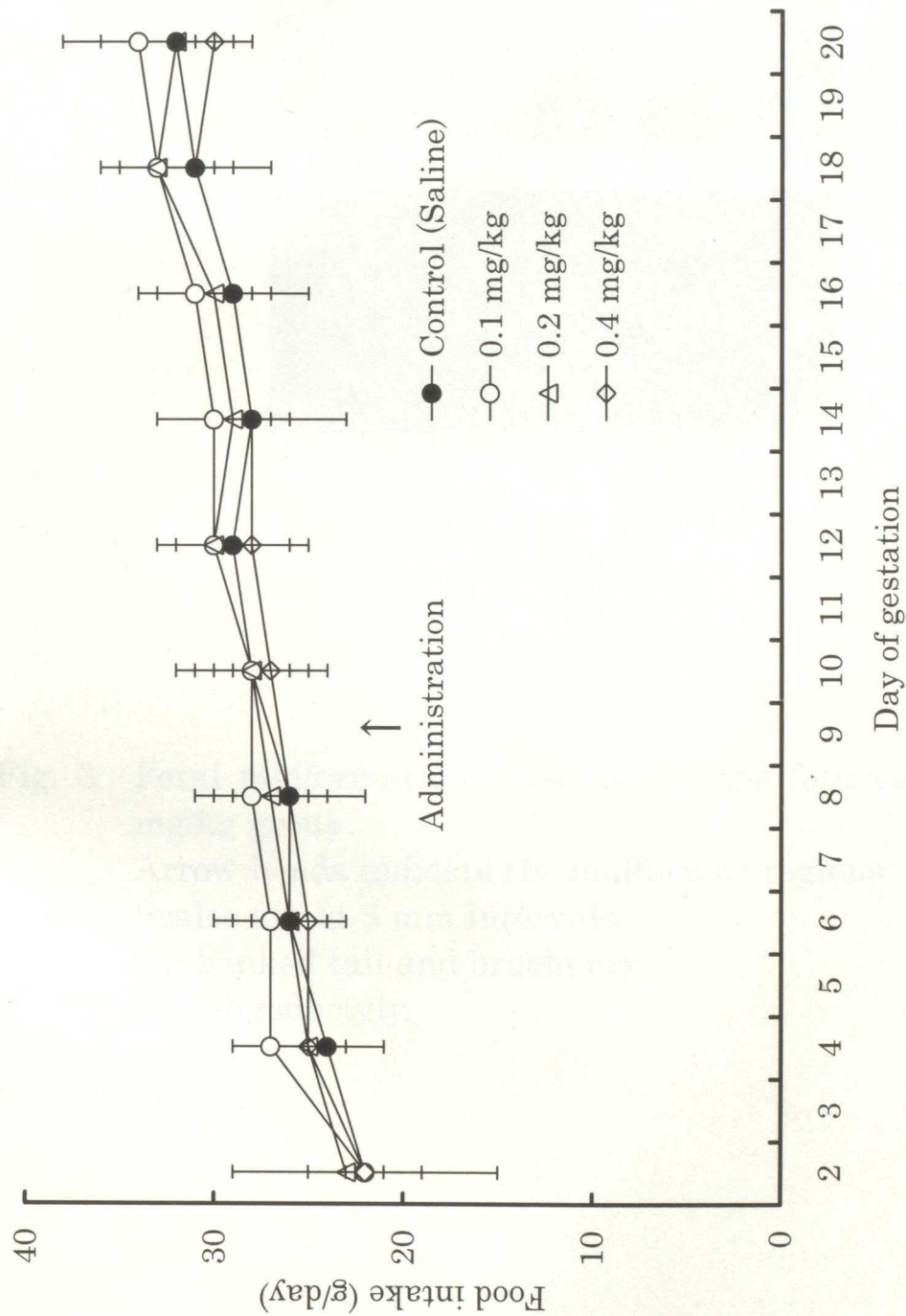


Fig.2 Food intake of pregnant rats received single intravenous administration of indium on day 9 of gestation. Vertical bars represent standard deviation.

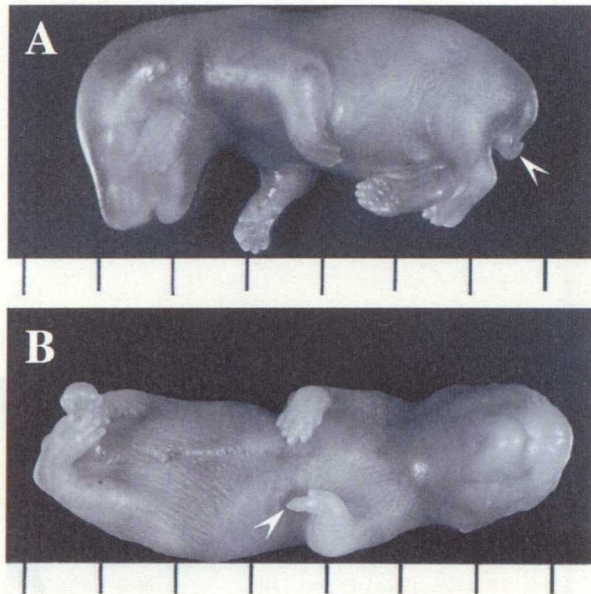


Fig. 3 Fetal malformations observed in the fetuses in the 0.4 mg/kg group.

Arrow heads indicate the malformed regions.

Scales are at 5 mm intervals.

(A) Kinked tail and brachyury.

(B) Oligodactyly.

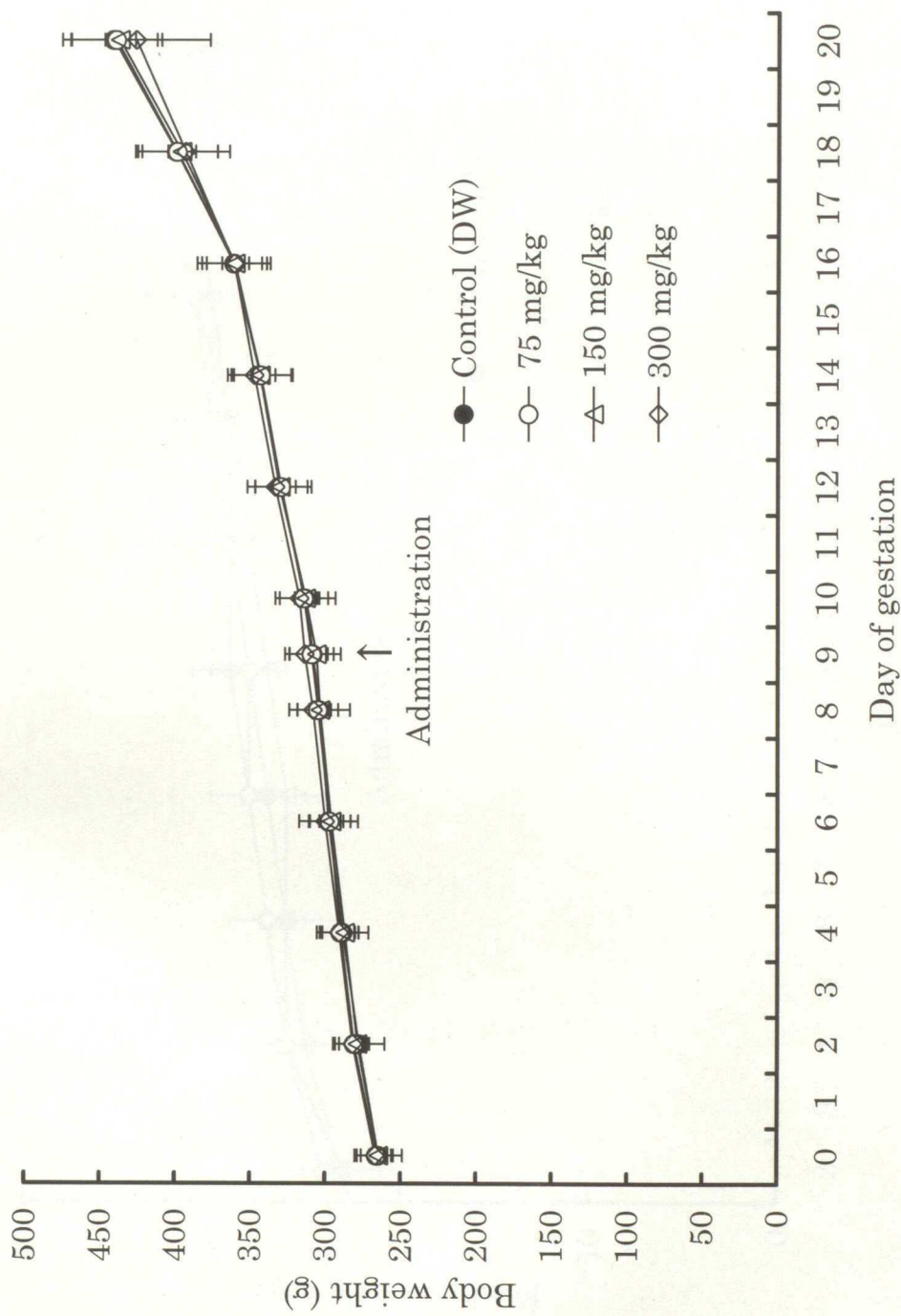


Fig.4 Body weight of pregnant rats received single oral administration of indium on day 9 of gestation. Vertical bars represent standard deviation.

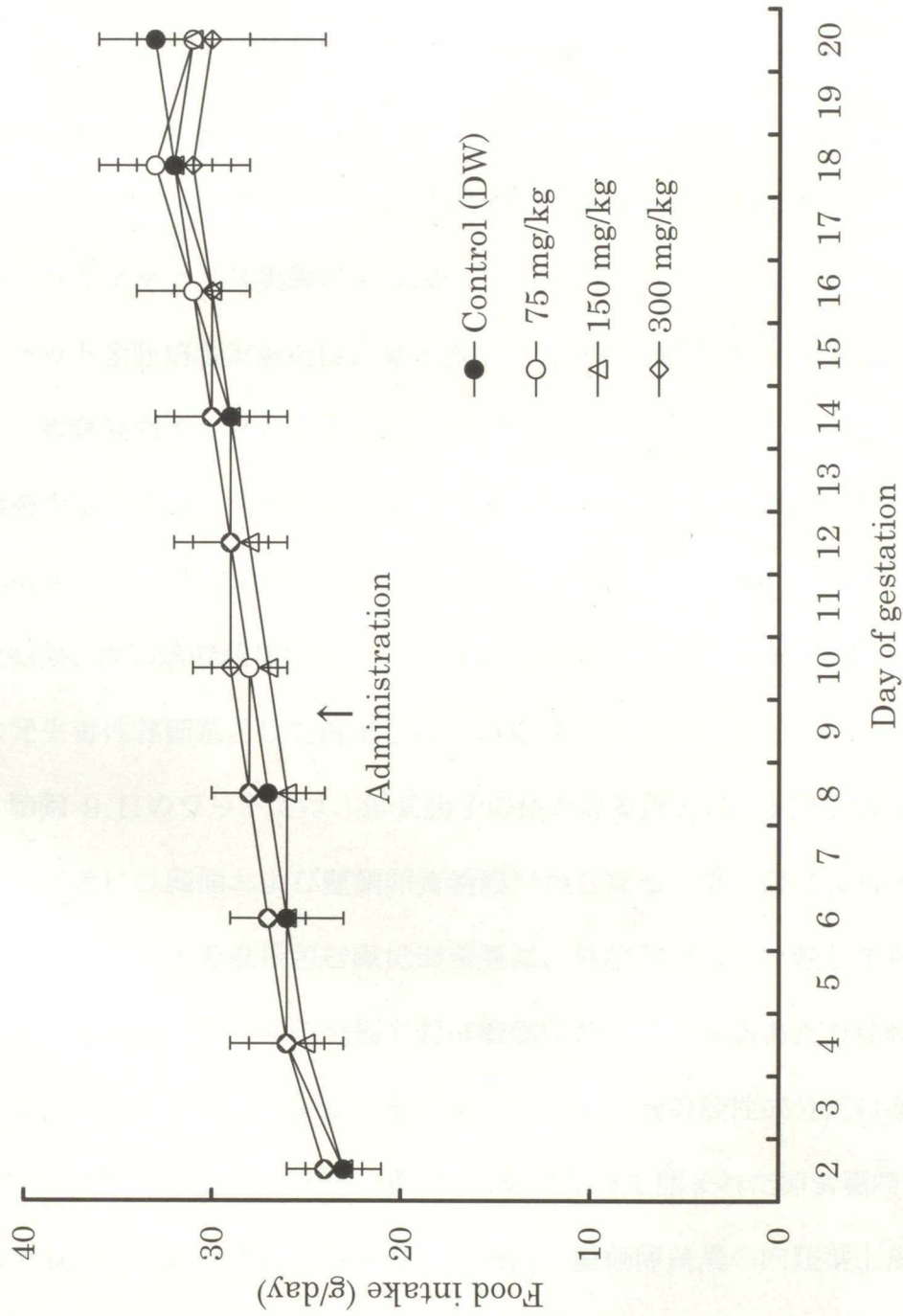


Fig.5 Food intake of pregnant rats received single oral administration of indium on day 9 of gestation. Vertical bars represent standard deviation.

第 2 章

ラット全胚培養およびトキシコキネティクス実験による

インジウムの発生毒性の検討

第 1 章では、インジウムはラットにおいて催奇形性、胚・胎子致死作用、胎子発育抑制等の発生毒性を示すことを明らかにした。また、インジウムの経口投与では、静脈内投与に比べ発生毒性が著しく弱いことを明らかにした (Nakajima et al., 1998)。

第 2 章では、インジウムの発生毒性について、ラット全胚培養実験およびトキシコキネティクス実験により調べた。

ラット全胚培養実験とは、着床後のラット胚を妊娠 9~11 日に子宮から摘出し、被験物質を加えたラット血清中で一定時間培養後、胚の発生状態を各種指標を設定して観察分析するものである。本実験法は、英国ケンブリッジ大学の New らにより開発され、オックスフォード大学の Cockroft らによって改良された結果、高い培養成功率が得られるようになり (New, 1990)、現在では *in vitro* の発生毒性評価系として汎用されている。

胎齢 9 日のラットでは、将来胎子の体となる部分は、臓側卵黄嚢と壁側卵黄嚢 (正確には臓側および壁側卵黄嚢膜) からなる二重の袋によって完全に包まれている。胎子を直接包む臓側卵黄嚢は、外胎盤円錐で反転して壁側卵黄嚢となる。脱落膜に分布する毛細血管は壁側卵黄嚢に接するあたりに特に豊富で、胎子全体を取り巻いている。そして、母体の血液の液性成分だけが壁側卵黄嚢をすり抜けて、壁側卵黄嚢と臓側卵黄嚢によって囲まれた卵黄嚢腔に流れ込む。この液性成分に含まれる種々の栄養物は、臓側卵黄嚢の内胚葉上皮に取り込まれ、そこで細胞内消化を受ける。そして代謝された物質は、卵黄嚢血管が形成

されるまでの間はおそらく胚外体腔に放出され、羊膜を通過して胎子に運ばれる。また胎齢 10 日頃に卵黄囊血管が形成されると、主としてこの血管を經由して胎子に運ばれ、胎子栄養として利用される。ラットの全胚培養では、通常ラット血清を培養液として利用する。従って、全胚培養系において、臓側卵黄囊に包まれた状態の胚（胎子）と培養液との関係は、子宮内における胎子と母体の関係に良く似ている。これが、ラットの全胚培養を可能にしている解剖学的背景である（三木, 1992）。

ラットにおける器官形成期の早期では、臓側卵黄囊は胎子栄養を吸収する場所だけでなく、母体-胎子間のガス交換の場所としても重要な働きをしている。しかし、子宮内ではやがて外胎盤円錐に脱落膜血管が侵入して血管網を形成し、また尿管膜が外胎盤円錐と連絡すると胎盤が完成し、機能を始める（胎齢 11 日の午後頃）。これに伴って胎子栄養の吸収やガス交換の中心は卵黄囊から胎盤へと移行する。胎盤が形成されるまでの間は、ラット胎子は全胚培養系でも子宮内に匹敵した発育を遂げるが、それ以降の発育は子宮内に比べて徐々に悪くなる。これは全胚培養系においては胎盤の形成が完全でなく、十分に機能しないことに起因する（三木, 1992）。従って、本実験では胎齢 9 日のラット胚を 48 時間培養することとした。

トキシコキネティクス実験とは、毒性物質の体内動態と毒性発現との関連を検討するものであり、近年、その重要性が強調されている（堀井&進藤, 2002）。

材料および方法

被験物質：

塩化インジウム 4 水和物 ($\text{InCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、和光純薬工業株式会社、大阪) を用いた。以下、インジウムと略して記載し、投与量は塩化インジウム重量で記載した。インジウムは、全胚培養実験ではハンクス平衡塩類溶液 (Invitrogen, USA)、トキシコキネティクス実験では静脈内投与時には生理食塩液 (株式会社大塚製薬工場、徳島)、経口投与時には蒸留水 (株式会社大塚製薬工場、徳島) に、それぞれ、溶解した。投与液の調製は投与直前に行った。

実験動物：

全胚培養実験、トキシコキネティクス実験とも Wistar 系ラットを用いた。また、培養液として用いる血清のドナーとして、SD 系ラット (雄、12~16 週齢) を用いた。

全胚培養実験では、妊娠ラット (9 週齢) を購入し、膣栓確認日を妊娠 0 日として起算した。トキシコキネティクス実験では、第 1 章の実験と同様に、発情徴候を示す雌 (12 週齢) を雄 (13 週齢) と 16 時前後から一夜同居させ、翌朝、膣垢の観察を行い精子が認められた動物を交尾確認動物として、その日を妊娠 0 日とした。胎子の胎齢は、母体の妊娠 1 日目を胎齢第 1 日目とした。動物の飼育条件は第 1 章と同様である。

培養液 (血清)：

Steele と New の方法 (Steele & New, 1974) に準じて培養液を作成した。すなわち、雄ラットを 16 時間以上絶食した後、エーテル麻酔下にて開腹し、腹大

動脈から採血し、凝固前に遠心分離した後、得られた血漿からフィブリン塊を取り除き血清（IC 血清：Immediately-Centrifuged serum）を採取した。得られた血清を 56°C で 30 分間非働化した後、10 mL あたり 10% グルコース（Sigma Chemical, USA）を 0.1 mL 添加し、0.22 μM のフィルター（Millex-GV, Millipore Corp., USA）で濾過滅菌し、培養液とした。

培養方法：

妊娠 9 日の午後にラットをエーテル麻酔下にて開腹し、子宮を摘出してハンクス平衡塩類溶液に入れた。ハンクス平衡塩類溶液中で、摘出した子宮からピンセットを用いて、脱落膜、ライヘルト膜および壁側卵黄囊膜を除去して、臓側卵黄囊膜に包まれた胚を摘出した。臓側卵黄囊膜に包まれた胎齢 9 日のラット胚は、長径 2 mm 弱、短径 1 mm 弱であり、米粒のような形をしている。胎子部は一方の先端に、強度に背屈した状態にあり、胎子部の反対側の先端には外胎盤円錐が付着している。培養開始時（胎齢 9 日）のラット胚の写真を Fig.6A に示した。

容量 30 mL のガラス製培養瓶に培養液を 3.9 mL、インジウム溶液あるいはハンクス平衡塩類溶液を 0.1 mL、胚を 2~3 個入れ、シリコンゴム製キャップをした後、酸素・二酸化炭素・窒素の混合ガスを供給し、37~38°C、35 rpm で回転式胎子培養装置（池本理化工業株式会社、東京）を用いて 48 時間回転培養した。胎齢と共に増加する胚の酸素要求量を満たすために、酸素濃度は培養開始時~24 時間を 5% とし、続いて培養 24 時間~30 時間を 20%、培養 30 時間~48 時間を 40% と漸増させた。胎子培養装置の模式図を Fig.7 に示した。

培養液中のインジウム濃度（ $a \mu\text{M}$ ）と曝露時間（ $b \text{ hr}$ ）の積を総曝露量（ $ab \mu\text{M} \cdot \text{h}$ ）と考え、総曝露量を比較できるようにインジウム濃度と曝露時間

を設定した。インジウムの曝露時間を調節するため、あらかじめ定めた時間に培養液を交換した。すなわち、25、50 または 200 μM のインジウムを 48、24 または 6 時間培養液に添加した。

培養胚の観察法：

本実験系において胎齢 9 日のラット胚を 48 時間培養すると、正常に発育した胚では、卵黄嚢の表面に血管網が形成されると共に心拍が認められる。また、胎子は体軸の回転が完了して“C”字型になり、神経管の閉鎖が認められる。従って、培養 48 時間後に、心拍および反転が認められない胚を死亡胚とした。生存胚について、実体顕微鏡の接眼マイクロメーターで卵黄嚢径を測定した。さらに、卵黄嚢を除去後、体節数、頭殿長の測定および形態異常の観察を行った。卵黄嚢径および頭殿長の測定部位を Fig.6B および 6C に示した。形態は、子宮内で発育した同胎齢（11 日）の胎子と比べて単なる発育の遅れとは考えられない形の違いを異常とした。

統計学的解析法：

対照群（0 μM ）と各インジウム曝露群の間で、卵黄嚢径、頭殿長および体節数については「Student の t 検定」を用いて実施した。また、生存胚数および形態異常胚数については「Fisher の直接確率計算」を用いて実施した。有意水準は 5% および 1% とした。5% の危険率で有意差がみられた場合、統計学的に有意であるとした。

トキシコキネティクス実験：

妊娠10日のラットに、発生毒性が認められる量のインジウムを投与して検討した。すなわち、静脈内投与では第1章で明らかな発生毒性が認められた0.4 mg/kgを、経口投与では軽度な発生毒性が認められた300 mg/kgを投与量とした。投与方法は第1章と同じである。血清は、投与20分、1、3および6時間後に腹大動脈から採血し、遠心分離した。試料をマイクロウェーブ法(Kojima et al., 1988)により分解した後、フレイムレス原子吸光法(偏光ゼーマン原子吸光分光光度計、株式会社日立製作所、茨城)により、母動物の血清中インジウム濃度を測定した。各採血ポイントにつき各1例の動物を供した。

結果

全胚培養実験（9日胚曝露）：

9日胚曝露による全胚培養実験の結果を Table 13 に示した。この実験では、培養開始時からインジウムを培養液に添加した。

胎齢9日のラット胚を、25 μM の濃度のインジウムに48時間曝露させた場合、卵黄嚢径、頭殿長、体節数の統計学的に有意な減少がみられ、胚発育が抑制されたが、死亡は認められなかった。一方、胎齢9日のラット胚を50 μM のインジウムに24時間曝露させた場合、25 μM での48時間曝露と総曝露量（1200 $\mu\text{M} \cdot \text{h}$ ）が等しいにも関わらず、全ての胚が死亡した。死亡胚では、心拍は認められず、また、著しい卵黄嚢の発育抑制がみられた。これらの全胚培養法を用いた実験結果は、インジウムの胚毒性は曝露時間に比べて曝露濃度により強く依存することを示唆している。

全胚培養実験（10日胚曝露）：

10日胚曝露による全胚培養実験の結果を Table 14 に示した。この実験では、インジウムの曝露時間を調節するために、培養24時間後からインジウムを培養液に添加した。

先に述べたように、9日胚曝露実験において、25 μM の濃度のインジウムで48時間曝露すると胚の発育抑制がみられたが、10日胚曝露実験における25 μM の24時間曝露では、インジウムは胚発育に影響を及ぼさなかった。また、先に述べた9日胚曝露実験では、50 μM のインジウムの24時間曝露においては全ての胚が死亡したが、10日胚曝露では50 μM の24時間曝露で胚発育の抑制のみがみられた。200 μM のインジウムの6時間曝露では、50 μM での24時間曝露

とインジウムの総曝露量 ($1200 \mu\text{M} \cdot \text{h}$) は等しいにも関わらず、全ての胚が死亡した。なお、 $25 \mu\text{M}$ の 24 時間曝露において、胚の形態異常が 2/9 例認められたが、対照群にもしばしばみられる神経管の蛇行であり、用量依存性もないことから偶発例と判断される。

これらの結果は、9 日胚と 10 日胚には、全胚培養条件下においてインジウムに対する感受性に差が認められるものの、10 日胚においてもインジウムの胚毒性は、曝露時間に比べて曝露濃度により強く依存することを示している。

トキシコキネティクス実験：

インジウムを投与した妊娠ラット血清中のインジウム濃度の変化を Fig.8 に示した。

血清中のインジウム濃度は、静脈内投与では投与 20 分後に $6.3 \mu\text{g/mL}$ ($55 \mu\text{M}$) を示し、その後徐々に減少した。経口投与時の血清中インジウム濃度は、投与 1 時間から 6 時間後まで $1.5 \mu\text{g/mL}$ ($13 \mu\text{M}$) 前後で、ほぼ一定の値を示した。静脈内投与と経口投与で、投与量には 750 倍差があるにも関わらず、経口投与における最高血清中濃度は静脈内投与の約 1/4 であった。

考察

全胚培養実験の結果は、インジウムは 25~50 μM の濃度での曝露により、胚の日齢、曝露濃度および曝露時間に依存してラット胚に毒性を及ぼすことを示している。トキシコキネティクス実験の結果、母体血清中のインジウム濃度は、300 mg/kg の経口投与ではラット全胚培養実験で毒性のみられた 25~50 μM より低く、0.4 mg/kg を静脈内投与した場合の母体最高血清中濃度は 55 μM であった。すなわち、*in vitro* で明らかな発生毒性を示す濃度は、*in vivo* で明らかな発生毒性を示す母体血清中濃度とよく一致した。以上のことから、インジウムの胚毒性は胚あるいは卵黄囊に対する直接作用であることが示唆された。また、第1章で述べた静脈内投与時と経口投与時のインジウムの発生毒性の強度の差は、胚の曝露濃度の差によるものと推論される。すなわち、インジウムの胚毒性発現には、バルプロ酸やカフェインにおける実験 (Nau, 1986) と同様に閾値が存在するものと思われる。

今回の全胚培養実験では、第1章で胎齢 20 日のラット胎子にみられた曲尾、短尾あるいは欠指等の外表奇形に関連する形態異常は認められなかった。これは、本実験系では培養期間が短いため、奇形を検出できるほどには尾や指が形成されていなかったことに起因すると考えられる。培養条件下においてインジウムの催奇形作用を検討するためには、培養期間の延長あるいは器官培養法の活用等が必要と考えられる。培養期間の延長については第5章で検討した。

インジウムの総曝露量 (曝露濃度 \times 曝露時間) を一定とした同一曝露条件 (1200 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$) 下では、胎齢 10 日に曝露された胚に比べて、9 日に曝露された胚において、より強い毒性が認められたことから、培養条件下において 9 日胚は 10 日胚に比べ、インジウムに対する感受性が高いものと考えられる。さら

に、インジウムの総曝露量（曝露濃度×曝露時間）が等しい場合には、高濃度の曝露でより強い胚毒性が認められることから、インジウムの胚毒性は曝露時間に比べて曝露濃度により強く依存すると考えられる。

さらに、ラット全胚培養系を用いた本実験の結果は、曝露量を変化させることにより、*in vivo* との比較検討において曝露量と発生毒性発現との因果関係を検討できることを示している。この全胚培養系による評価法は、化学物質の発生毒性試験結果をヒトへ外挿する際に、ヒトにおける血中濃度のデータを有効利用できる極めて有用な手法であると考えられる。

小括

ラット全胚培養実験系およびトキシコキネティクス実験系を用いて、インジウムの発生毒性について調べた。ラット全胚培養実験では、インジウムは 25～50 μM の濃度での曝露により、胚の日齢、曝露濃度および曝露時間に依存して胚毒性（胚致死作用、胚発育抑制作用）を示した。トキシコキネティクス実験における母体血清中のインジウム濃度は、ラット全胚培養実験で毒性のみられた 25～50 μM より 300 mg/kg の経口投与では低く、0.4 mg/kg を静脈内投与した場合の母体最高血清中濃度は 55 μM であった。すなわち、*in vitro* で明らかに発生毒性を示す濃度は、発生毒性を示す *in vivo* の母体血清中濃度とよく一致していた。以上のことから、インジウムの発生毒性は受胎産物（胚あるいは卵黄嚢）に対する直接作用であることが示唆された。総曝露量（曝露濃度×曝露時間）が等しい場合には、高濃度の曝露でより強い胚毒性が認められることから、インジウムの胚毒性は曝露時間に比べて曝露濃度により依存すると判断された。すなわち、インジウムの胚毒性が曝露濃度により強く依存していることから、第1章において明らかにした静脈内投与時と経口投与時のインジウムにおける発生毒性の強度の差は、胚の曝露濃度の差によるものであると推論された（Nakajima et al., 1999）。

Table 13 Effects of indium on cultured day 9 rat embryos[#]

	Indium (μ M)		
	0(control)	25(48 h)	50(48 h)
No. of embryos	12	12	12
No. of viable embryos	12	12	0**
Yolk sac diameter (mm) ^a	3.82 \pm 0.22	3.36 \pm 0.25**	N.D.
Crown-rump length (mm) ^a	3.47 \pm 0.20	3.13 \pm 0.26**	N.D.
No. of somite pairs ^a	25.5 \pm 0.8	24.4 \pm 1.1*	N.D.
No. of abnormal embryos	0	0	N.D.

[#]The exposure time is in the parentheses after the concentrations.

^aMean \pm S.D. N.D., not determined.

Asterisks indicate significant differences compared with the control group (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

Table 14 Effects of indium on cultured day 10 rat embryos[#]

	Indium (μM)			
	0(control)	25(24 h)	50(24 h)	200(6 h)
No. of embryos	12	9	9	5
No. of viable embryos	12	9	9	0**
Yolk sac diameter (mm) ^a	3.76 \pm 0.20	3.74 \pm 0.17	3.27 \pm 0.25**	N.D.
Crown-rump length (mm) ^a	3.44 \pm 0.20	3.38 \pm 0.12	3.03 \pm 0.26**	N.D.
No. of somite pairs ^a	25.0 \pm 0.7	24.6 \pm 1.0	23.4 \pm 0.5**	N.D.
No. of abnormal embryos	0	2	0	N.D.

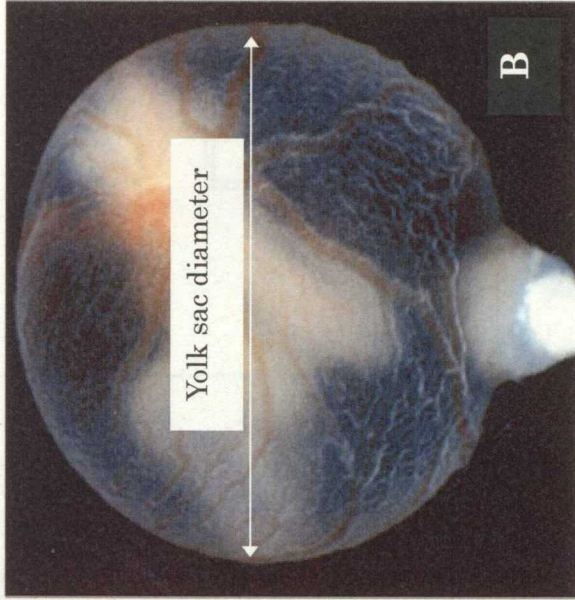
[#]The exposure time is in the parentheses after the concentrations.

^aMean \pm S.D. N.D., not determined.

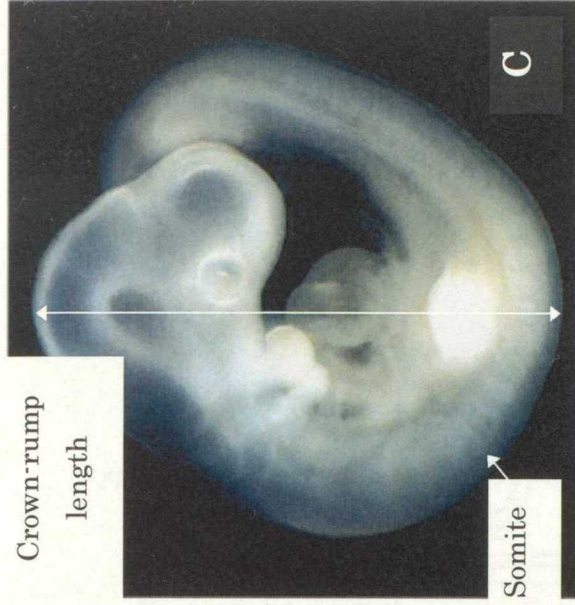
Asterisks indicate significant differences compared with the control group (**: $p < 0.01$).



Day 9 rat embryo



At end of culture



After removal of embryonic membrane

Fig.6 A guide to the dimensions for yolk-sac diameter and crown-rump length measurements after 48 h culture (not to scale)

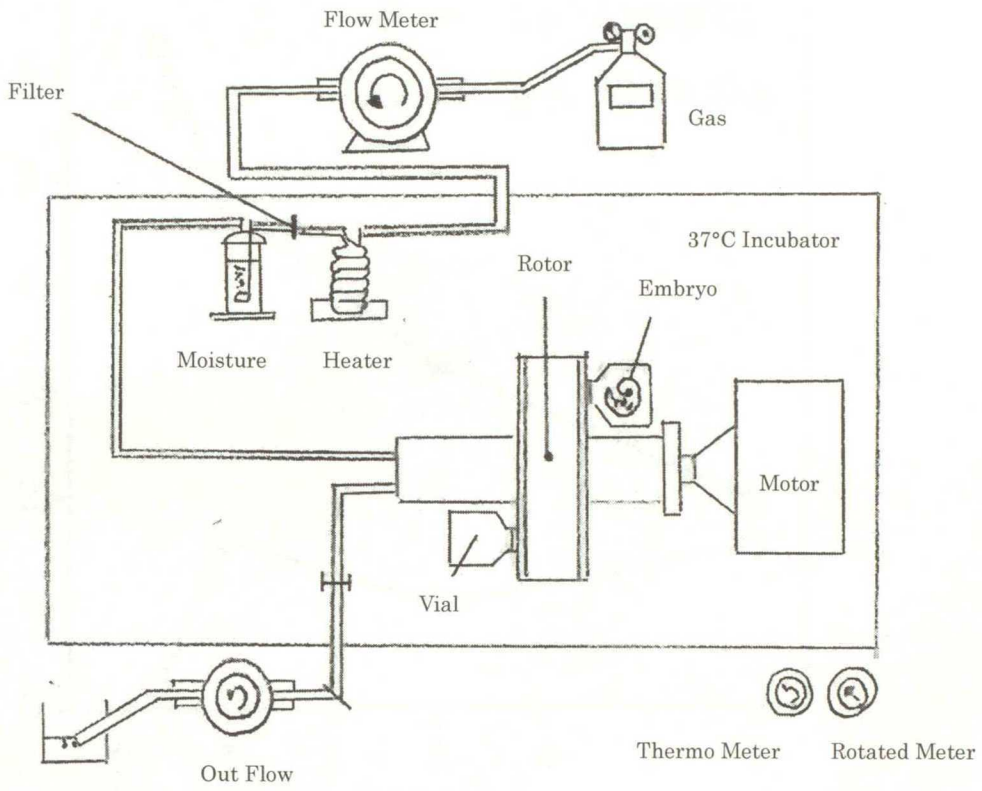


Fig.7 Embryo culture system

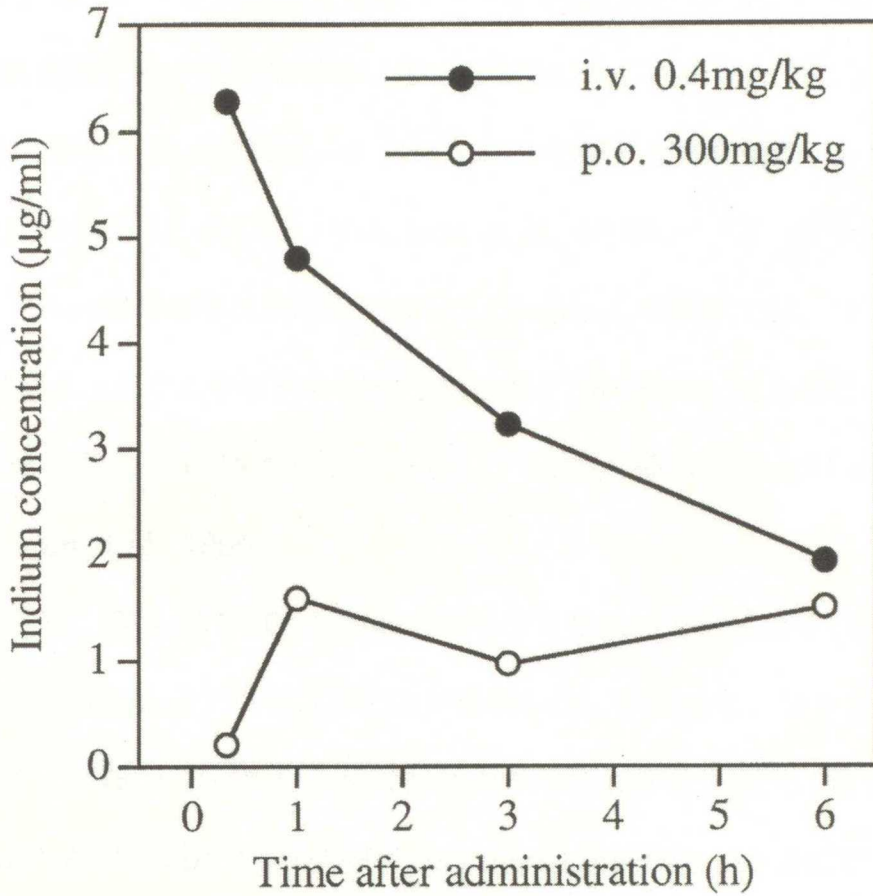


Fig. 8 Indium concentration in the serum of pregnant rats after intravenous (i.v.) or oral (p.o.) administration of indium. One animal / point was sacrificed.

第3章

ラットおよびマウスにおけるインジウムの発生毒性の種差の検討

第1章で、インジウムを妊娠ラットに静脈内投与すると、催奇形性、胚・胎児致死作用、胎児発育抑制等の発生毒性を示すことを明らかにした (Nakajima et al., 1998)。第2章では、インジウムの胚毒性は曝露濃度により強く依存して認められることを示した (Nakajima et al., 1999)。一方、マウスにおいてはインジウムの催奇形性は明らかでない。Chapin らの実験では、マウスの妊娠6～15日にインジウムを反復経口投与した際、150 mg/kg 以上の投与量において、胚・胎児死亡率の増加が認められているが、催奇形性は認められていない (Chapin et al., 1995)。

そこで、第3章ではラットおよびマウスを用いて、インジウムの発生毒性の種差を同様な実験プロトコルにより検討した。すなわち、ラットでは第1章において、妊娠9日における単回静脈内投与により発生毒性 (胎児奇形、胚・胎児死亡) がみられたインジウムの 0.4 mg/kg を妊娠9、10または11日に単回静脈内投与し、妊娠20日に胎児を観察した。マウスでは、0.8 および 1.6 mg/kg のインジウムを妊娠7、8または9日に単回静脈内投与し、妊娠18日に胎児を観察した。

材料および方法

被験物質：

塩化インジウム 4 水和物 ($\text{InCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、和光純薬工業株式会社、大阪) を用いた。以下、インジウムと略して記載し、投与量は塩化インジウム重量で記載した。

実験動物：

Wistar 系ラットおよび ICR 系マウスを用いた。妊娠ラット (9 週齢) および妊娠マウス (8 週齢) を購入し、それぞれ、膣栓確認日を妊娠 0 日として起算した。ラットは妊娠 6 日、マウスは妊娠 7 日に、それぞれ、無作為に各群に振り分けた。動物の飼育条件は第 1 章と同様である。

被験物質の投与：

インジウムを生理食塩液 (株式会社大塚製薬工場、徳島) に溶解した。投与液の調製は投与直前に行った。ラットへの投与量は、第 1 章において発生毒性 (胎子奇形、胚・胎子死亡) がみられた 0.4 mg/kg とした。マウスへの投与量は、 0.4 mg/kg のインジウムを妊娠 8 日のマウスに単回静脈内投与した予備試験において変化がみられなかったことから、 0.8 および 1.6 mg/kg とした。27G の注射針 (テルモ株式会社、東京) とディスプレイザブル注射筒 (テルモ株式会社、東京) を用いて、ラットでは妊娠 9、10 あるいは 11 日に尾静脈より 1 mL/kg の投与容量で投与した。マウスでは同様に妊娠 7、8 あるいは 9 日に尾静脈より 10 mL/kg の投与容量で投与した。対照群には生理食塩液を、ラットでは妊娠 9～11 日に、マウスでは妊娠 7～9 日に、それぞれ、同様に投与した。

観察および検査：

一般症状を毎日観察すると共に、ラットでは妊娠 6、8、9、10、11、12、14、18 および 20 日に、マウスでは妊娠 7、8、9、10、13、15 および 18 日に体重を測定した。ラットは妊娠 20 日に、マウスは妊娠 18 日に全例をエーテル麻酔下にて帝王切開して、母動物の主要器官を肉眼的に観察し、さらに、着床数、胚・胎子死亡率および生存胎子数を調べた。生存胎子については雌雄を判別した後、口腔内を含む外表奇形の有無を観察し、体重および胎盤重量を測定した。

統計学的解析法：

母動物のデータについては各個体を、胎子のデータについては同腹児の平均値を標本単位とした。母動物の体重、着床数、生存胎子数、胎子重量および胎盤重量については対照群と各インジウム投与群の間で「Student の t 検定」あるいは「Welch の t 検定」を行った。また、胚・胎子死亡率、性比および外表奇形発生率は対照群と各インジウム投与群の間で「Wilcoxon の順位和検定」を行った。有意水準は 5% および 1% とした。5% の危険率で有意差がみられた場合、統計学的に有意であるとした。

結果

ラットにおける実験：

妊娠 20 日における胎子の発育状況を Table 15 に示した。統計学的な有意差は認められなかったが、インジウムを投与した全ての群において、胚・胎子死亡率の増加傾向（対照群：4.1%に対し、妊娠 9 日投与群：21.2%、妊娠 10 日投与群：29.8%、妊娠 11 日投与群：35.2%）がみられた。胎子重量は全てのインジウム投与群において統計学的に有意に減少し、妊娠 10 日の投与において最も減少の程度が大きかった。同様に胎盤重量も減少傾向を示し、妊娠 9 日の投与における雌胎子、妊娠 10 日の投与における雌雄胎子では統計学的な有意差が認められた。

胎子の外表観察成績を Table 16 に示した。全てのインジウム投与群において外表奇形の発生率が統計学的に有意に増加した。外表奇形は妊娠 10 日の投与において最も高い発生率を示した（対照群：0%に対し、妊娠 9 日投与群：60.9%、妊娠 10 日投与群：99.0%、妊娠 11 日投与群：72.7%）。尾部奇形（曲尾、短尾あるいは無尾）が、外表奇形を有するすべての胎子に認められた。

母動物の一般症状、剖検において毒性変化は全く認められなかった。母動物の体重（Fig.9）についても対照群とインジウム投与群との間に有意な差は認められなかったことから、上記のインジウムによる発生毒性は母動物に対する毒性に起因する二次的な影響ではなく、インジウムの胎子に対する直接作用であると判断される。

マウスにおける実験：

妊娠 18 日における胎子の発育状況を Table 17 に示した。1.6 mg /kg のイン

ジウムを投与した全ての群において、統計学的に有意な胚・胎子死亡率の増加（対照群：4.8%に対し、妊娠7日投与群：36.9%、妊娠8日投与群：100%、妊娠9日投与群：91.8%）がみられ、妊娠8日の投与では全ての胚・胎子が死亡した。統計学的な有意差は認められなかったが、0.8 mg/kg を投与した群においても胚・胎子死亡率の増加傾向（対照群：4.8%に対し、妊娠7日投与群：9.0%、妊娠8日投与群：19.5%、妊娠9日投与群：12.1%）がみられた。1.6 mg/kg を妊娠8日あるいは9日に投与した群を除く全てのインジウム投与群において、統計学的に有意な胎子重量の減少が認められた。0.8 mg/kg 群の胎子重量では、妊娠8日の投与において減少の程度が最も大きかった。胎盤重量では、0.8 mg/kg の妊娠8日の投与および1.6 mg/kg の妊娠7日の投与において統計学的に有意な減少が認められた。なお、1.6 mg/kg を妊娠8日あるいは9日に投与した群の胎子重量および胎盤重量で統計学的有意差が検出されなかったのは、生存胎子を有する母動物が、妊娠8日では0例、妊娠9日では2例であり、統計学的有意差を検出するための標本数が不足したためである。

胎子の外表観察成績を Table 18 に示した。各インジウム投与群において、外表奇形を有する胎子は0または1例のみであり、外表奇形発生率について対照群との間に統計学的な有意差は認められなかった。

母動物の一般症状、剖検において毒性変化は全く認められなかった。母動物の体重を Fig.10 に示した。1.6 mg/kg を投与した全ての群および0.8 mg/kg を妊娠8日に投与した群において、対照群に比べ体重の低値がみられ、統計学的な有意差が認められた。これは、上記の群でみられた胚・胎子死亡率の増加および胎子重量の減少と関連するものと考えられる。すなわち、マウスにおいて誘発されたインジウムによる発生毒性も、母動物に対する毒性に起因する二次的な影響ではなく、インジウムの胎子に対する直接作用であると判断される。

考察

ラットでは妊娠 10 日のインジウム投与において、胎子重量および胎盤重量の減少ならびに胎子奇形発生率の増加の程度が最も著しかった。一方、マウスでは妊娠 8 日のインジウム投与において、胎子重量および胎盤重量の減少ならびに胚・胎子死亡率の増加の程度が最も著しかった。上記の妊娠日近辺のマウス胚の発生進行度はラットに比べ 1~2 日進んでいることが報告されており (DeSesso, 1997)、胎齢 8 日のマウス胚の発生進行度は胎齢 10 日のラット胚の発生進行度とほぼ一致すると推察される。すなわち、ラット、マウスともに胎子の器官形成期における同様な時期にインジウムの胚・胎子毒性 (胚・胎子致死作用、胎子発育抑制作用) に感受性を示すことが明らかになった。

しかし、インジウムの催奇形性 (胎子の外表奇形誘発作用) については、マウスはラットに比べ感受性が低いと判断される。なぜなら、母動物へのインジウムの投与により、ラットでは胎子奇形が高頻度に誘発されるにも関わらず、マウスではインジウムの胚・胎子毒性に感受性を有する胚発生時期 (ラットと同一の胚発生時期) に胚・胎子の致死量を母動物に投与しても胎子外表奇形誘発作用は認められなかったからである。なお、本実験においては胎子の外表奇形の検査のみを実施していることから、インジウムによりマウス胎子の内臓あるいは骨格に奇形が誘発される可能性は否定できないこと、ならびに本実験と異なる妊娠時期にインジウムを投与した際には胎子奇形が誘発される可能性も否定できないことを付記しておく。

インジウムの催奇形性に対する感受性にラットとマウスで種差がみられた原因は、現在のところ明らかでないが、培養条件下の胚において胚毒性を示すインジウムの濃度はラットとマウス (Chapin et al., 1995) で類似していることか

ら、一因としてトキシコキネティクスの違いが関与している可能性が考えられる。胎齢9日のマウス培養胚にインジウムを100 μM の濃度で24時間あるいは10 μM の濃度で48時間曝露させると、胚毒性（胚死亡あるいは胚発育抑制）を示すことが報告されている（Chapin et al., 1995）。また、胎齢9日および10日のラット培養胚にインジウムを25 μM の濃度で48時間曝露あるいは50 μM の濃度で24時間曝露させると、胚毒性を示すことを第2章で述べた。第2章では、さらに、ラットにおいてインジウムの総曝露量（培養液中のインジウム濃度と曝露時間の積）が等しい場合は、曝露濃度が高い場合の方が強い胚毒性を発現することから、インジウムの胚致死作用および胚発育抑制作用は曝露時間に比べ、曝露濃度により強く依存することを示した。しかしながら、いかなるトキシコキネティクス指標が胎児奇形の誘発に最も関与しているのかは明らかでない。

インジウムの発生毒性において、胚致死作用を呈するインジウムの曝露時間に比べ、奇形の誘発には、より長時間の曝露が必要とされるならば、*in vivo*実験のマウスではラットに比べ、投与後の母動物における血中インジウム濃度の消失が早く、それゆえ、低用量投与群では胎児奇形を誘発するに足る血中インジウム濃度が得られず、高用量投与群では催奇形作用が胚・胎児致死作用によりマスクされた可能性も考えられる。この推論は、胚・胎児毒性を呈するマウスにおけるインジウムの静脈内投与量は、ラットより2~4倍高く、マウスにおいては投与後の母動物における血中インジウム濃度の消失が早いことが示唆されていることから一部支持される。この推論を検証するためには同様な実験プロトコルによるラットおよびマウスを用いたインジウムの静脈内投与によるトキシコキネティクス実験が必要となるであろう。

小括

ラットおよびマウスを用いて、インジウムの発生毒性に種差があるか否かについて検討した。ラットでは 0.4 mg/kg のインジウムを妊娠 9、10 または 11 日に単回静脈内投与し、妊娠 20 日に胎子を観察した。マウスでは 0.8 および 1.6 mg/kg のインジウムを妊娠 7、8 または 9 日に単回静脈内投与し、妊娠 18 日に胎子を観察した。その結果、ラットでは胚・胎子死亡が 21.2~35.2%、外表奇形（主に尾の奇形）が 60.9~99.0%出現し（対照群は 4.1 および 0%）、第 1 章の実験結果が再現された。一方、マウスでは胚・胎子死亡が 0.8 mg/kg 投与で 9.0~19.5%、1.6 mg/kg 投与で 36.9~100%出現し（対照群は 4.8%）、インジウム投与量に依存して胚・胎子死亡が増加したが、胎子外表奇形は殆ど観察されなかった（0~1.5%）。以上の結果から、器官形成期に投与されたインジウムは、ラット及びマウスに対して胚・胎子毒性（胚・胎子致死作用、胎子発育抑制作用）を及ぼすことから、両者はインジウムに対して感受性を有するが、インジウムの催奇形性（胎子の外表奇形誘発作用）に注目すると、マウスはラットに比べ感受性が低いことが明らかになった（Nakajima et al., 2000）。

Table 15 Fetal growth in pregnant rats received single intravenous administration of indium on day 9, 10 or 11 of gestation

	Dose and gestation day of administration		
	0 mg/kg (control) ^a	0.4 mg/kg	
	Days 9-11	Day 9	Day 10
No. of pregnant rats	8	8	7
No. of implants ^b	14.9±2.7	16.9±2.1	14.1±2.0
Mortality of implants (%)	4.1	21.2	35.2
No. of live fetuses ^b	14.4±3.2	13.1±5.3	9.6±6.8
Sex ratio (male / total)	0.52	0.46	0.40
Fetal weight (g) ^b			
Male	3.58±0.35	2.84±0.63*	2.56±0.42 **
Female	3.47±0.28	2.68±0.68*	2.35±0.51**
Placental weight (g) ^b			
Male	0.50±0.09	0.43±0.11	0.39±0.07*
Female	0.46±0.04	0.39±0.08*	0.37±0.06**

^aSaline.

^bMean ± SD.

Asterisks indicate significant differences compared with the control group (*: p<0.05, **: p<0.01).

Table 16 Fetal gross malformations in pregnant rats received single intravenous administration of indium on day 9, 10 or 11 of gestation

	Dose and gestation day of administration				
	0 mg/kg (control) ^a		0.4 mg/kg		
	Days 9-11	Day 9	Day 10	Day 11	Day 11
No. of pregnant rats with live fetus	8	8	7	5	5
No. of fetuses examined	115	105	78	67	67
No. of fetuses with gross malformation					
Brachyury	0 (0.0)	57 (60.9)*	77 (99.0)**	45 (72.7)**	45 (72.7)**
Kinked tail	0 (0.0)	50 (43.0)*	64 (72.7)**	16 (27.0)*	16 (27.0)*
Cleft palate	0 (0.0)	50 (42.7)*	48 (54.1)**	40 (64.4)**	40 (64.4)**
Oligodactyly	0 (0.0)	20 (17.2)	9 (17.4)*	5 (8.8)	5 (8.8)
Anury	0 (0.0)	23 (31.9)*	19 (30.2)*	1 (1.7)	1 (1.7)
Abnormality of abdomen	0 (0.0)	3 (14.4)	9 (22.6)	0 (0.0)	0 (0.0)
Anal atresia	0 (0.0)	3 (2.2)	6 (7.6)*	0 (0.0)	0 (0.0)
Club hand	0 (0.0)	1 (12.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Edema	0 (0.0)	1 (12.5)	0 (0.0)	1 (1.8)	1 (1.8)
Omphalocele	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (9.4)	2 (3.5)	2 (3.5)
Micrognathia	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (8.2)	0 (0.0)	0 (0.0)
Meromelia	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (7.1)	0 (0.0)	0 (0.0)
Meningoencephalocele	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (7.1)	0 (0.0)	0 (0.0)
Hydrocephaly	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (5.0)	3 (5.0)
				1 (1.7)	1 (1.7)

^aSaline.

Numbers in parentheses are means of incidences per litter.

Asterisks indicate significant differences compared with the control group (*: p<0.05, **: p<0.01).

Table 17 Fetal growth in pregnant mice received single intravenous administration of indium on day 7, 8 or 9 of gestation

	Dose and gestation day of administration									
	0 mg/kg (control) ^a			0.8 mg/kg			1.6 mg/kg			
	Days 7-9	Day 7	Day 8	Day 9	Day 7	Day 8	Day 9	Day 7	Day 8	Day 9
No. of pregnant mice	7	7	6	7	7	7	6	7	7	6
No. of implants ^b	14.6±1.8	15.7±2.1	14.7±1.4	15.1±1.5	14.4±2.8	14.0±3.1	14.5±2.4	14.4±2.8	14.0±3.1	14.5±2.4
Mortality of implants(%)	4.8	9.0	19.5	12.1	36.9*	100.0**	91.8**	36.9*	100.0**	91.8**
No. of live fetuses ^b	13.9±1.9	14.3±2.8	11.7±1.8	13.3±1.6	9.6±6.4	0**	1.2±2.0**	9.6±6.4	0**	1.2±2.0**
Sex ratio (male / total)	0.41	0.48	0.39	0.46	0.42	N.D.	0.80	0.42	N.D.	0.80
Fetal weight (g) ^b										
Male	1.49±0.05	1.37±0.10*	1.28±0.09**	1.39±0.04**	1.23±0.18*	N.D.	1.09±0.08	1.23±0.18*	N.D.	1.09±0.08
Female	1.44±0.03	1.33±0.09*	1.17±0.08**	1.35±0.04**	1.23±0.09**	N.D.	1.03	1.23±0.09**	N.D.	1.03
Placental weight (g) ^b										
Male	0.12±0.02	0.11±0.02	0.10±0.02*	0.11±0.01	0.10±0.01**	N.D.	0.09±0.00	0.10±0.01**	N.D.	0.09±0.00
Female	0.11±0.01	0.10±0.01	0.09±0.01**	0.10±0.01	0.09±0.01*	N.D.	0.08	0.09±0.01*	N.D.	0.08

^aSaline.

^bMean ± SD.

N.D., not determined.

Asterisks indicate significant differences compared with the control group (*: p<0.05, **: p<0.01).

Table 18 Fetal gross malformations in pregnant mice received single intravenous administration of indium on day 7, 8 or 9 of gestation

	Dose and gestation day of administration									
	0 mg/kg (control) ^a			0.8 mg/kg			1.6 mg/kg			
	Days 7-9	Day 7	Day 8	Day 9	Day 7	Day 8	Day 9	Day 7	Day 8	Day 9
No. of pregnant mice with live fetus	7	7	6	7	6	0	2	6	0	2
No. of fetuses examined	97	100	70	93	67	0	7	67	0	7
No. of fetuses with gross malformation	0 (0.0)	1 (1.4)	1 (1.5)	0 (0.0)	1 (1.5)	N.D.	0 (0.0)	1 (1.5)	N.D.	0 (0.0)
Exencephaly	0 (0.0)	1 (1.4)	1 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	N.D.	0 (0.0)	0 (0.0)	N.D.	0 (0.0)
Open eyelids	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.5)	N.D.	0 (0.0)	1 (1.5)	N.D.	0 (0.0)

^aSaline.

N.D., not determined.

Numbers in parentheses are means of incidences per litter.

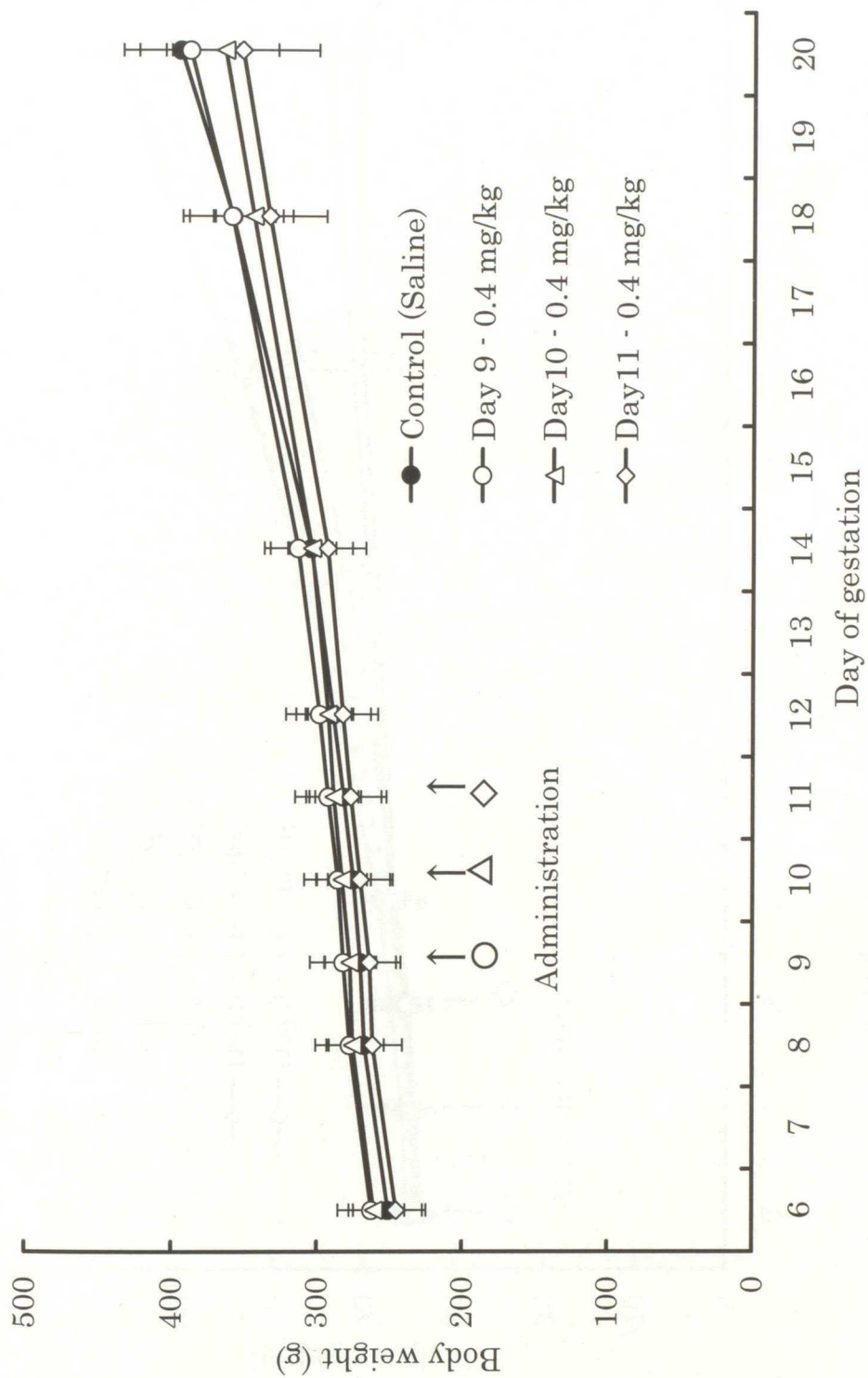


Fig.9 Body weight of pregnant rats received single intravenous administration of indium on day 9, 10 or 11 of gestation. Vertical bars represent standard deviation.

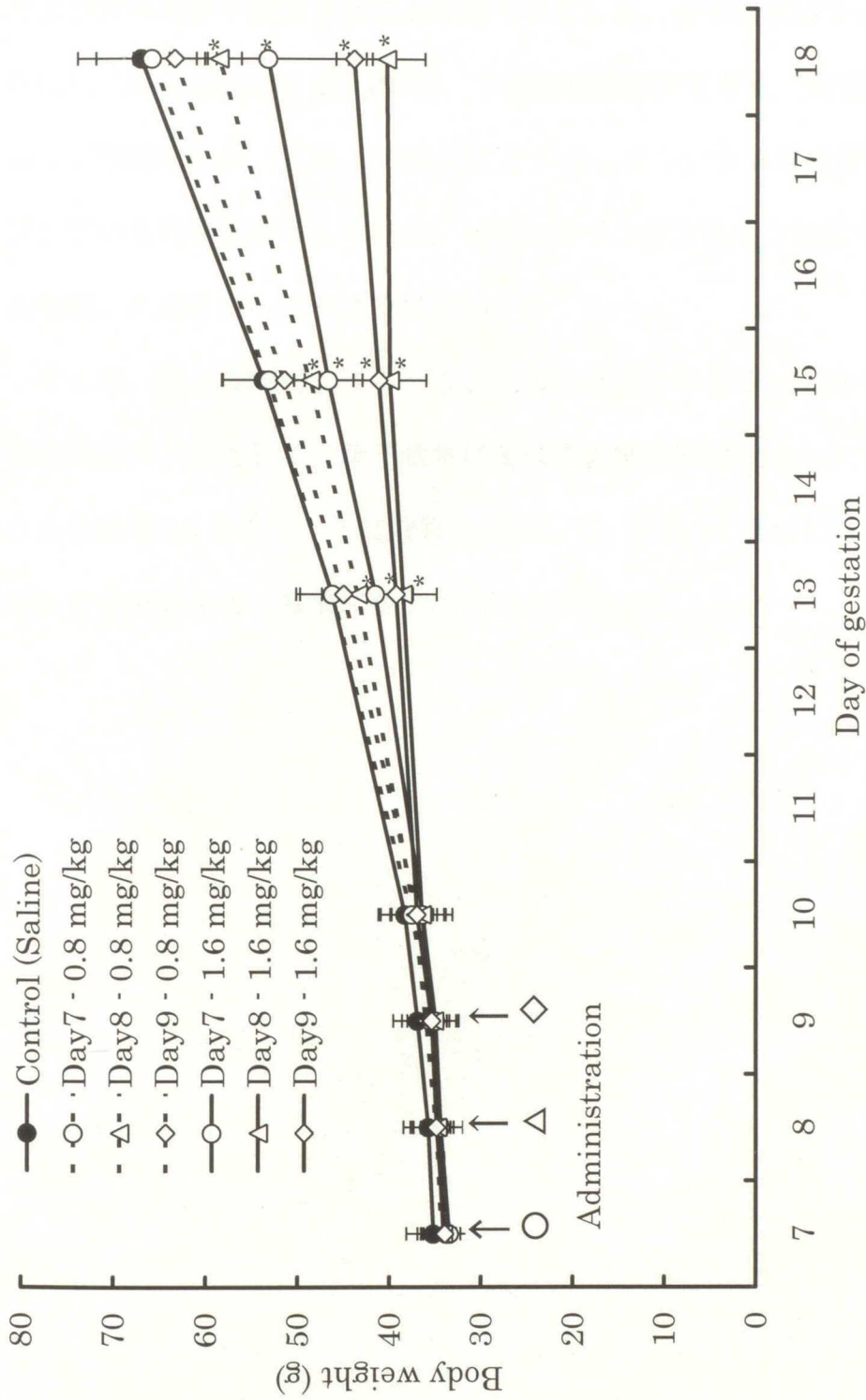


Fig.10 Body weight of pregnant mice received single intravenous administration of indium on day 7, 8 or 9 of gestation.
 Vertical bars represent standard deviation.
 Asterisks indicate significant differences from control (*P<0.05, **P<0.01).

第4章

インジウムのラット胎子軟骨発生に及ぼす影響の検討

第1章で、インジウムを妊娠ラットに静脈内投与すると、胎子の外表、内臓および骨格奇形を誘発することを明らかにした。骨格奇形は主に中軸骨格にみられた (Nakajima et al., 1998)。中軸骨格は軟骨性骨化 (軟骨からの置換) によって形成される (江口, 1979b) ことから、インジウムは軟骨発生に影響を及ぼしている可能性が考えられる。母体へのインジウム投与後にラット胎子軟骨を観察した報告は、これまでにない。

そこで、第4章では、インジウムにより誘発されるラット胎子骨格奇形発現機序検討の一環として、胎子軟骨に及ぼす影響を検討した。すなわち、インジウムを妊娠10日のラットに静脈内投与して、妊娠21日における胎子の骨および軟骨の形態を骨・軟骨二重染色法により調べた。

材料および方法

被験物質：

塩化インジウム 4 水和物 ($\text{InCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、和光純薬工業株式会社、大阪) を用いた。以下、インジウムと略して記載し、投与量は塩化インジウム重量で記載した。

実験動物：

SD 系ラットを用いた。妊娠ラット (9~11 週齢) を購入し、膣栓確認日を妊娠 0 日として起算した。妊娠 6 日における各群の平均体重がほぼ等しくなるように各群に振り分けた。動物の飼育条件は第 1 章と同様である。

被験物質の投与：

インジウムを生理食塩液 (株式会社大塚製薬工場、徳島) に溶解した。投与液の調製は投与直前に行った。投与量は、0.1、0.2 および 0.3 mg/kg とした。27G の注射針 (テルモ株式会社、東京) とディスプレイザブル注射筒 (テルモ株式会社、東京) を用いて、妊娠 10 日に尾静脈より 1 mL/kg の投与容量で投与した。対照群には生理食塩液を同様に投与した。

観察および検査：

一般症状を毎日観察すると共に、妊娠 6、8、10、12、14、16、18 および 21 日に体重を測定した。妊娠 21 日に全例をエーテル麻酔下にて帝王切開して、母動物の主要器官を肉眼的に観察し、さらに、着床数、胚・胎子死亡率および生存胎子数を調べた。生存胎子については雌雄を判別した後、口腔内を含む外表

奇形の有無を観察し、体重および胎盤重量を測定した。各腹の生存胎子の約半数を Dawson 法 (Dawson, 1926) に準じて骨単染色標本を、残りを井上法 (Inouye, 1976) に準じてアリザリンレッド及びアルシアンブルーによる骨・軟骨二重染色標本を作製し、骨格観察を行った。

統計学的解析法：

第1章と同様な方法で実施した。

結果

母動物の体重を Fig.11 に、摂餌量を Fig.12 に示した。体重および摂餌量について、対照群と各インジウム投与群との間に統計学的な有意差は認められなかった。また、母動物の一般症状および剖検所見に異常は認められなかった。すなわち、母動物に毒性変化は認められなかった。

妊娠 21 日における胎子の発育状況を Table 19 に示した。インジウムの 0.1 および 0.2 mg/kg 群においては、対照群との間に統計学的有意差は認められなかった。しかし、0.3 mg/kg 群においては、胎子重量および胎盤重量の減少ならびに胚・胎子死亡率の増加がみられ、対照群との間に統計学的有意差が認められた。

胎子の外表奇形を Table 20 に示した。0.1 mg/kg 群において異常はみられなかったが、0.2 mg/kg 群では 41.3%、0.3 mg/kg 群では 92.9%の胎子に外表奇形が認められた。尾部の異常（短尾、曲尾、無尾）および指の異常（欠指）等が高頻度に認められた。0.2 mg/kg 群における曲尾の発生率は 0.3 mg/kg 群より高かった。一方、0.3 mg/kg 群では短尾および無尾の発生率が高かった。このことは、曲尾はインジウムにより誘発される尾部奇形のうち程度の軽い表現形と考えられる。

アリザリンレッド S による骨単染色を施した胎子の観察結果を Table 21 に示した。0.2 および 0.3mg/kg 群で統計学的に有意な骨格奇形発生率の増加が認められた。主に中軸骨格、すなわち、椎骨、肋骨および胸骨核の奇形が認められた。さらに、0.3 mg/kg 群では長骨および指骨の奇形も認められた。

アリザリンレッド S とアルシアンブルーによる骨軟骨二重染色を施した胎子の観察結果を Table 22 に示した。軟骨の奇形が 0.3 mg/kg 群で、椎骨、肋骨および指骨に高頻度で認められた。二重染色標本の未化骨部位でみられた重度の

軟骨奇形（肋軟骨の癒合、短縮および欠損）の写真を Fig.13 に示した。骨化部位に関しても、0.2 mg/kg 群では統計学的有意差は認められなかったが、単染色標本と同様に、0.2 および 0.3 mg/kg 群で奇形発生率の増加がみられた。奇形がみられた骨では軟骨奇形を伴っていた。また、肋軟骨における奇形発生率は肋骨の骨化部位における奇形発生率より高かった。

残念ながら、無尾、短尾、曲尾等を有する胎子の尾椎骨における形態異常の詳細な判別／分類は困難であり、他の部位と合せて椎骨奇形として集計したことから、尾部でみられた外表奇形について尾椎骨奇形と関連付けて解析することは困難であった。

考察

本実験の結果は、妊娠 10 日のラットにインジウムを単回静脈内投与することにより胎子に軟骨奇形が誘発されることを明示している。

骨の発生における骨化には 2 種類の異なる現象、すなわち、結合組織性骨化と軟骨性骨化がある。結合組織性骨化では、結合組織内で直接骨化現象が起こる。これによってできた骨を膜性骨と呼ぶ。まず、結合組織の一部で血管の新生が盛んになり、結合組織の幼弱な間葉細胞が骨芽細胞となる。次いで、結合組織の線維束は石灰化し、その表面に骨芽細胞が付着して骨基質を作り、骨芽細胞はそのままその中に包まれて骨細胞となる。この形式でできる骨は、頭蓋の天井と、側面の前頭骨、頭頂骨および側頭骨の一部である。膜性骨を付加骨あるいは二次骨と呼ぶこともある。軟骨性骨化というのは、まず間葉性結合組織の中で軟骨が作られ、次いで軟骨の内部あるいは外部から骨化がおこるもので、内外共同して骨を作る。この骨化形式に従うものは、体幹、四肢、頭骨の約半分および舌骨などである。初めに軟骨を生じ、次いで骨に変わるので、置換骨形成といい、それによってできる骨を置換骨と呼ぶことがある（江口, 1979b）。

本実験において、中軸骨格の奇形を有する胎子は同骨の軟骨における奇形を伴っていた。中軸骨格および四肢の長骨は、前述した如く間葉由来の軟骨からの置換により形成されることを踏まえると、母体へのインジウム投与によって誘発される胎子軟骨の形成異常が胎子骨格奇形発現の一因となっていると考えられる。この推論は、インジウムは軟骨細胞の活性を阻害するという報告；インジウムの 400 mg/kg をラットの妊娠期間中に毎日経口投与すると、胎齢 21 日のラット胎子大腿骨軟骨細胞におけるオリゴ糖が減少する（Ungvary et al.,

2001)、によっても支持される。

なお本実験は、SD系ラットを用いたグループ研究の1テーマとして実施したことから、第1章および3章で用いたWistar系ラットではなく、SD系ラットを用いた。本実験でみられた主たる胎子奇形の型は、第1章および3章で用いたWistar系ラットでみられた胎子奇形と同様であったことから、インジウムにより誘発される胎子奇形にSD系ラットとWistar系ラットの間に明らかな系統差はないものと考えられた。

小括

インジウムにより誘発されるラット胎子骨格奇形発現機序を検討するために、妊娠 10 日のラットにインジウムを静脈内投与して、妊娠 21 日における胎子の骨および軟骨の形態を骨・軟骨二重染色法により調べた。妊娠 10 日ラットへインジウム 0.3 mg/kg を投与すると、胎子の骨および軟骨の著しい形態異常が誘発された。中軸骨格の奇形は軟骨の奇形を伴っていた。中軸骨格および四肢の長骨は間葉由来の軟骨からの置換により形成されることを踏まえると、母体へのインジウム投与によって誘発される胎子軟骨の形成異常が胎子骨格奇形発現の一因となっていることが示唆された (Nakajima et al., 2007)。

Table 19 Fetal growth in pregnant rats received single intravenous administration of indium on day 10 of gestation

	Dose (mg/kg)			
	0(control) ^a	0.1	0.2	0.3
No. of pregnant rats	8	10	9	10
No. of implants ^b	13.3±1.3	13.6±2.1	13.6±1.9	14.6±2.8
Mortality of implants (%)	1.0	4.5	3.3	31.3**
No. of live fetuses ^b	13.1±1.5	13.0±2.3	13.1±1.8	10.1±4.4
Sex ratio (male / total)	0.49	0.52	0.46	0.48
Fetal weight (g) ^b				
Male	5.73±0.43	5.46±0.44	5.33±0.32	3.76±1.16**
Female	5.48±0.28	5.21±0.48	5.05±0.27	3.47±0.95**
Placental weight (g) ^b				
Male	0.45±0.05	0.45±0.04	0.45±0.04	0.38±0.13
Female	0.54±0.06	0.45±0.06	0.44±0.07	0.35±0.11*

^aSaline.

^bMean ± SD.

Asterisks indicate significant differences compared with the control group (*: p<0.05, **: p<0.01).

Table 20 Gross malformations of fetuses from pregnant rats received single intravenous administration of indium on day 10 of gestation

	Dose (mg/kg)			
	0(control) ^a	0.1	0.2	0.3
No. of pregnant rats with live fetus	8	10	9	10
No. of fetuses examined	105	130	118	101
No. of fetuses with gross malformation	1 (0.8)	0 (0.0)	48 (41.3)	93 (92.9)**
Micrognathia	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (2.4)
Cleft palate	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (2.3)
Anal atresia	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	31 (38.5)*
Anury	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	39 (43.0)**
Kinked tail	0 (0.0)	0 (0.0)	47 (40.6)*	32 (28.0)
Brachyury	1 (0.8)	0 (0.0)	38 (32.9)	52 (48.1)**
Short trunk	1 (0.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.7)
Small limb	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	43 (41.3)**
Club foot	1 (0.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	26 (27.7)
Oligodactyly	1 (0.8)	0 (0.0)	3 (2.4)	69 (72.6)**
Distorted abdomen	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (5.4)

^aSaline.

Numbers in parentheses are means of incidences per litter.

Asterisks indicate significant differences compared with the control group (*: p<0.05, **: p<0.01).

Table 21 Skeletal abnormalities in alizarin red S-stained fetal specimens from pregnant rats received single intravenous administration of indium on day 10 of gestation

	Dose (mg/kg)			
	0(control) ^a	0.1	0.2	0.3
No. of pregnant rats with live fetus	8	10	9	10
No. of fetuses examined	50	61	56	49
No. of fetuses with skeletal malformation	0 (0.0)	0 (0.0)	29 (54.1)*	45 (91.3)**
Deformed vertebra	0 (0.0)	0 (0.0)	29 (54.1)*	44 (89.3)**
Deformed rib	0 (0.0)	0 (0.0)	9 (17.0)	38 (80.0)
Deformed sternebra	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (13.9)	37 (77.8)**
Deformed scapula	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (6.7)
Absent ulna	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	25 (55.6)**
Absent or deformed femur	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (7.7)
Absent tibia	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (6.0)
Deformed forepaw phalanx	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	32 (70.5)**
No. of fetuses with skeletal variation	8 (16.5)	5 (8.5)	6 (11.2)	2 (5.0)
Cervical rib	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (5.6)	2 (5.0)
Short supernumerary rib	8 (16.5)	5 (8.5)	3 (5.7)	0 (0.0)

^aSaline.

Numbers in parentheses are means of incidences per litter.

Asterisks indicate significant differences compared with the control group (*: p<0.05, **: p<0.01).

Table 22 Skeletal abnormalities in double-stained fetal specimens from pregnant rats received single intravenous administration of indium on day 10 of gestation

	Dose (mg/kg)			
	0(control) ^a	0.1	0.2	0.3
No. of pregnant rats with live fetus	8	10	9	10
No. of fetuses examined	55	69	62	52
No. of fetuses with skeletal malformation	3 (5.1)	8 (12.0)	31 (53.7)	51 (98.3)**
Cartilage malformation	3 (5.1)	8 (12.0)	29 (49.5)	51 (98.3)**
Deformed vertebra	1 (1.6)	0 (0.0)	6 (11.0)	29 (62.1)**
Deformed rib	3 (5.1)	8 (12.0)	25 (43.1)	49 (95.6)**
Absent metacarpal	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (3.4)
Deformed forepaw phalanx	1 (1.6)	0 (0.0)	2 (3.4)	37 (74.6)**
Deformed hindpaw phalanx	1 (1.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	9 (23.1)
Bone malformation	1 (1.6)	0 (0.0)	30 (51.9)	51 (98.3)**
Deformed vertebra	1 (1.6)	0 (0.0)	30 (51.9)	50 (97.2)**
Deformed rib	1 (1.6)	0 (0.0)	4 (7.5)	46 (89.7)**
Deformed sternebra	0 (0.0)	0 (0.0)	8 (14.7)	42 (83.6)**
Deformed scapula	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	9 (24.0)*
Absent ulna	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	25 (55.2)**
Absent or deformed femur	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (2.2)	11 (25.6)**
Absent tibia	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	9 (22.5)**
Deformed ilium	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.4)
Deformed forepaw phalanx	1 (1.6)	0 (0.0)	2 (3.4)	37 (74.6)**
Deformed hindpaw phalanx	1 (1.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	9 (23.1)
No. of fetuses with skeletal variation	9 (16.2)	7 (9.5)	6 (9.2)	6 (15.6)
Cervical rib	0 (0.0)	1 (1.3)	1 (1.6)	2 (7.0)
Short supernumerary rib	9 (16.2)	6 (8.2)	5 (7.6)	4 (8.6)

^aSaline.

Numbers in parentheses are means of incidences per litter.

Asterisks indicate significant differences compared with the control group (**: p<0.01).

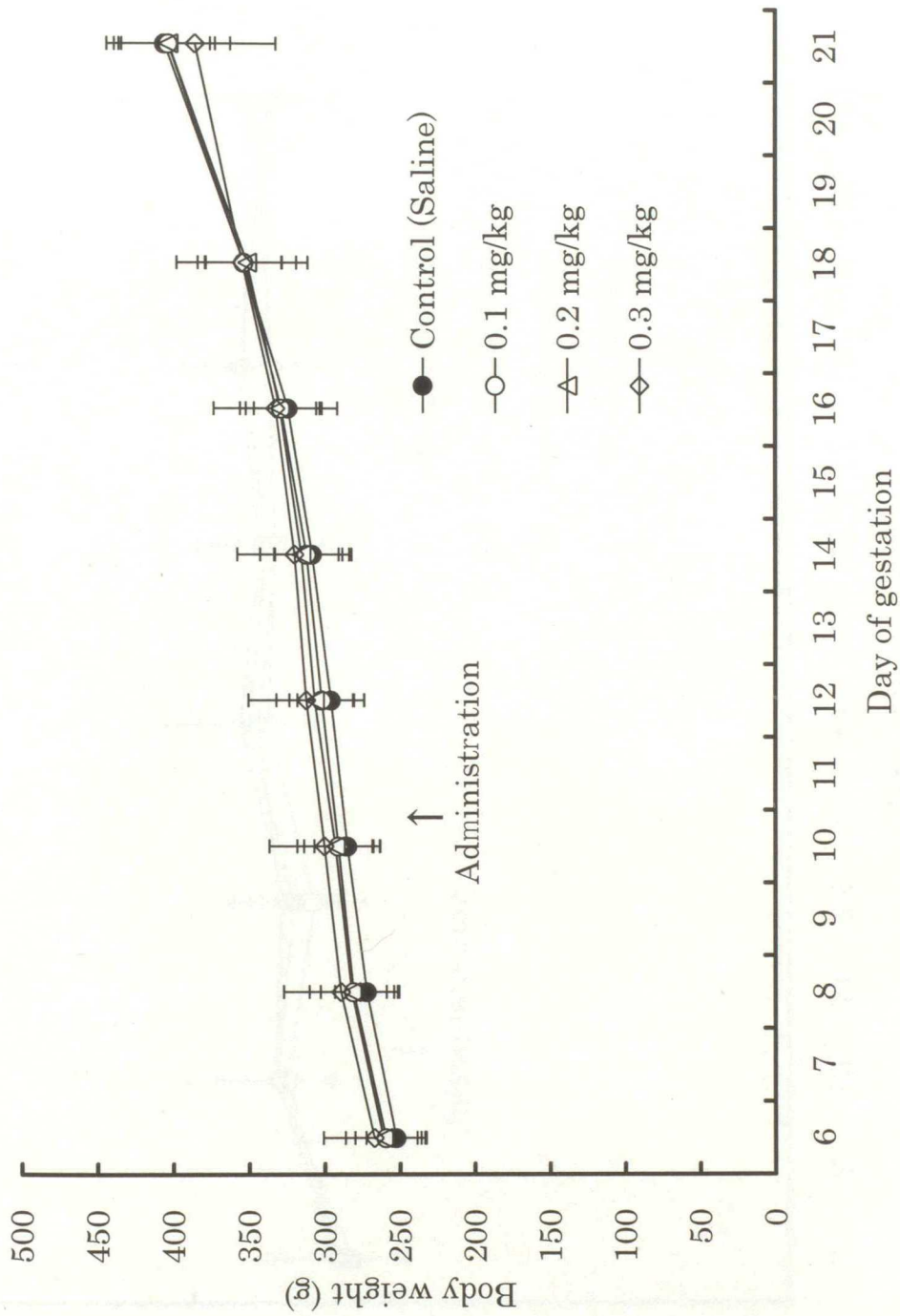


Fig.11 Body weight of pregnant rats received single intravenous administration of indium on day 10 of gestation.
Vertical bars represent standard deviation.

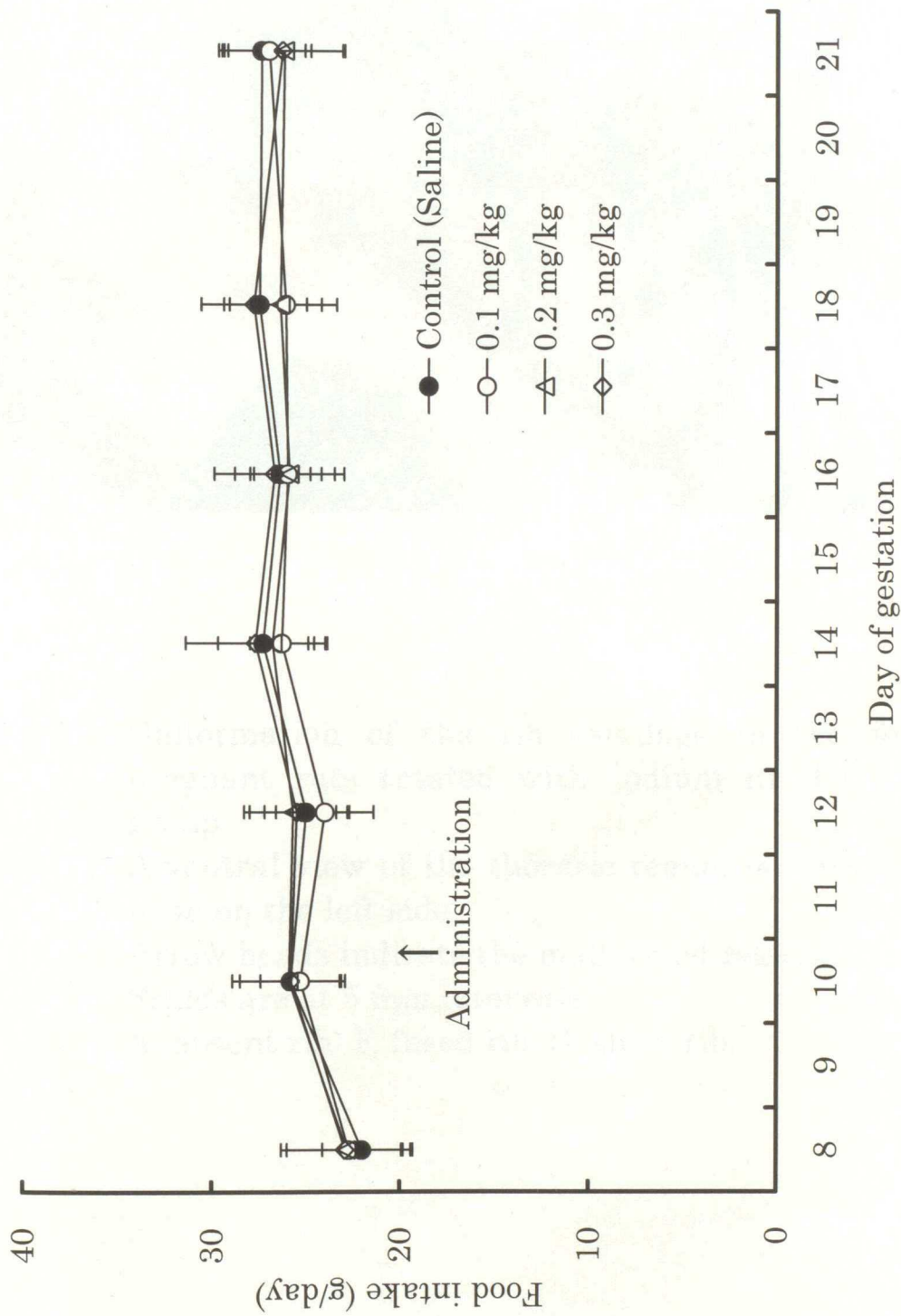


Fig. 12 Food intake of pregnant rats received single intravenous administration of indium on day 10 of gestation.
Vertical bars represent standard deviation.

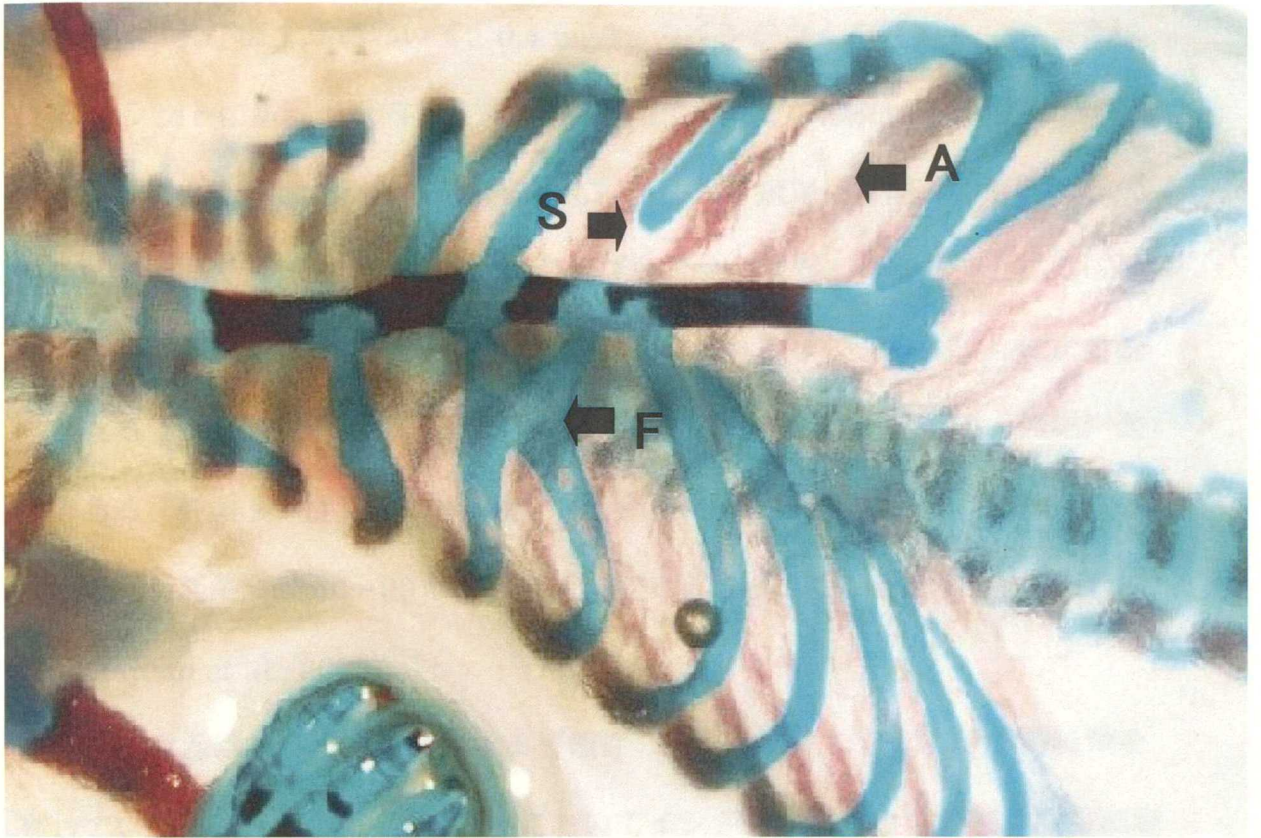


Fig.13 Malformation of the rib cartilage in the fetuses of pregnant rats treated with indium in the 0.3 mg/kg group.

A ventral view of the thoracic region is shown with the head on the left side.

Arrow heads indicate the malformed regions.

Scales are at 5 mm intervals.

A, absent rib; F, fused rib; S, short rib.

第5章

インジウムによるラット胎子尾部奇形発現機序の検討

第1章および第3章において、0.4 mg/kgのインジウムを妊娠9、10または11日のラットに単回静脈内投与すると、胎子の外表、内臓および骨格奇形が誘発されることを示した。外表奇形としては、曲尾、短尾、無尾、鎖肛および欠指など、内臓奇形としては停留精巣および腎盂拡張など、骨格奇形としては椎骨、肋骨および胸骨核の奇形が認められた。母体へのインジウム投与により誘発されるラット胎子奇形の特徴は、高頻度の尾部奇形（曲尾、短尾、無尾）発現である。妊娠9～11日の単回静脈内投与（0.4 mg/kg）により、尾部奇形（曲尾、短尾、無尾）が60～99%という高頻度で認められたことを第3章で示した（Nakajima et al., 2000）。

インジウムは胎子奇形を誘発する可能性のある、いくつかの毒性学的特徴を有している。例えば、*in vitro* 実験においてインジウムはラット肢芽の間葉細胞の軟骨細胞への分化を抑制し、分化を50%抑制する濃度は5.5 μM であること（Yonemoto & Kawagoe, 1992）、インジウムは100 μM の濃度でラットの初代培養肝細胞においてギャップ結合を介した細胞間コミュニケーションを抑制すること（Guo et al., 1992）ならびに10 μM の濃度で胸腺細胞にアポトーシスを誘発すること（Bustamante et al., 1997）が報告されている。妊娠ラットを用いた *in vivo* 実験では、インジウムは胎子軟骨細胞の活性を阻害すること（Ungvary et al., 2001）が報告されており、また、第4章では妊娠ラットへのインジウム投与が胎子軟骨の形態異常を惹起することを示した（Nakajima et al., 2007）。

インジウムの催奇形性の発現機序ならびに病態形成機序を検討する手段とし

て、ラット全胚培養実験は有用と考えられる。なぜなら、ラット全胚培養では胎齢9日あるいは10日の胚を24~48時間培養可能であり、この期間は第3章で示したインジウムの催奇形性に感受性のある期間と一致する。しかしながら、第2章の実験では、胎齢9日のラット胚を25 μM のインジウムに48時間、あるいは胎齢10日の胚を50 μM のインジウムに24時間曝露させても胚の形態異常は認められなかった。この矛盾は、第2章のトキシコキネティクス実験結果、すなわち、妊娠ラットにインジウムを投与した際の母体血清中のインジウム濃度は投与直後に高濃度を示し、以後、急速に減少すること、一方、培養液中では一定のインジウム濃度に維持されていることを踏まえると、*in vitro* と *in vivo* の実験において胚に対するインジウムの曝露条件が異なることが原因であると考えられる。また、インジウムにより引き起こされる形態異常は胎齢の進んだ胚でないと明確に観察されない可能性がある。さらに、母体側の因子がインジウムによる胎児奇形の形成に関与していることも考えられる。

本章では、*in vitro* および *in vivo* 実験により、インジウムによるラット胎児尾部奇形の病態形成機序を検討した。*in vivo* 実験では、催奇形性量のインジウムを妊娠10日のラットに静脈内投与後、妊娠11~13日に解剖して胚を摘出し、尾部の形態異常の発現時期を調べた。*in vitro* 実験では、胎齢10日のラット胚をインジウムを含む培養液中で24時間培養後、インジウムを含まない培養液中でさらに24時間培養して、胎齢12日相当まで発育させた状態での影響を調べた。さらに、インジウムによる尾部奇形の病態形成機序を解明する一環として、胚の尾芽におけるアポトーシスの発現について検討した。

材料および方法

被験物質：

塩化インジウム 4 水和物 ($\text{InCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、和光純薬工業株式会社、大阪) を用いた。以下、インジウムと略して記載し、投与量は塩化インジウム重量で記載した。

実験動物：

Wistar 系ラットを使用した。飼育条件および妊娠動物の作成は第 1 章と同様である。胎子の胎齢は、母体の妊娠 1 日目を胎齢第 1 日目とした。

in vivo 実験：

第 1 章と同様な方法で、インジウムの 0.4 および 1 mg/kg を妊娠 10 日のラットに静脈内投与した。0.4 mg/kg 投与では妊娠 11、12 または 13 日、1 mg/kg 投与では妊娠 11 日の、それぞれ午前中にラットをエーテル麻酔下にて開腹し、子宮を摘出した。ハンクス平衡塩類溶液中で、摘出した子宮からピンセットを用いて、胚を摘出した。第 2 章と同様な方法で胚の生死、形態異常の有無を観察し、さらに体節数および頭殿長を測定した。

in vitro 実験：

胎齢 10 日のラット胚を 24 時間あるいは 48 時間培養し、それぞれ、胎齢 11 日あるいは 12 日相当まで発育させた。すなわち、妊娠 10 日の午後にラットをエーテル麻酔下にて開腹し、子宮を摘出した。ハンクス平衡塩類溶液中で、摘出した子宮からピンセットを用いて、胚を摘出した。培養開始時における各群

の卵黄囊径の平均値がほぼ等しくなるように各群に振り分けた。1 胚当たり 0.8 ~1 mL の培養液を入れたガラス製培養瓶 (50 mL) に胚を入れた。培養液には培養開始から 24 時間、ハンクス平衡塩類溶液に溶解したインジウムを最終濃度が 50 あるいは 100 μM となるように添加した (0.2 mL/5 mL)。対照群にはハンクス平衡塩類溶液のみを同様に添加した。酸素・二酸化炭素・窒素の混合ガスを培養ビンに連続して供給し、37~38°C、35 rpm で 24 または 48 時間回転培養した。培養液および培養装置は第 2 章と同様である。胎齢と共に増加する胚の酸素要求量を満たすために、酸素濃度は培養開始時~6 時間を 20% とし、続いて培養 6 時間~24 時間を 40% と漸増させた。48 時間の培養では、培養 24 時間 (胎齢 11 日相当まで発育) 後にインジウムを含まない新しい培養液 (1 胚当たり 1.7 mL) に交換後、酸素濃度を 95% とし、さらに 24 時間培養した。培養終了後、胚の生死、形態異常の有無を観察し、さらに体節数、卵黄囊径および頭殿長を第 2 章と同様な方法で測定した。

アポトーシスの検出：

in vivo 実験における胎齢 11 日の胚および *in vitro* 実験における 24 時間培養胚 (胎齢 11 日に相当) を、Alles らの方法 (Alles et al., 1989) に準じて 0.002% 硫酸ナイルブルー (NBS) で 37°C、30 分間生体染色し、アポトーシスによる死細胞を観察した。さらに、Fernandez らの方法 (Fernandez et al., 2003) に準じた *In Situ* Cell Death Detection Kit, AP (Roche Diagnostics, Germany) を用いる whole-mount TUNEL 法により *in vitro* 実験における 24 時間培養胚 (胎齢 11 日に相当) の尾部における DNA 断片を染色し、アポトーシスを観察した。

統計学的解析法：

in vivo 実験における胚のデータについては同腹児の平均値を標本単位とした。各検査日毎に対照群とインジウム投与群 (0.4 mg/kg) の間で、卵黄嚢径、頭殿長および体節数については「Student の t 検定」を用いて実施した。また、生存胚数および形態異常胚数については「Fisher の直接確率計算」あるいは「Wilcoxon の順位和検定」を用いて実施した。なお、1 mg/kg 投与群については、同群内の胚について、卵黄嚢径と頭殿長を「対応のある t 検定」で比較した。有意水準は 5% および 1% とした。5% の危険率で有意差がみられた場合、統計学的に有意とした。

結果

in vivo 実験：

インジウム 0.4 mg/kg 投与における胎子の発育状況を Table 23 に示した。インジウム群の胚の生存率は胎齢の進行に伴い低下する傾向がみられ、妊娠 13 日では 2/5 腹において全ての胚が死亡した。インジウム群の頭殿長については、胎齢 13 日では対照群との間に統計学的有意差は認められなかったものの、胎齢 11 および 12 日において対照群に比べて有意に減少した。一方、インジウム群の体節数は、全ての検査日において対照群に比べて有意に減少した。

全ての検査日において、インジウム群の生存胚の全例で尾芽の低形成が認められた (Fig.14)。胎齢 11 日の生存胚について、NBS を用いてアポトーシスによる死細胞を染色したところ、対照群においては胚の尾芽で散発的な NBS 染色部位がみられたのみであったが (Fig.14G)、インジウム群では NBS 染色部位が広く、かつ染色性も強かった (Fig.14H) ことから、インジウムにより胚の尾芽におけるアポトーシスが誘発されたと考えられた。

妊娠 10 日のラットにインジウムの 1 mg/kg を投与し、胎齢 11 日の胚を観察した結果、弱い心拍は認められたものの、生存・成長することが困難な状況と推察された。全ての胚で卵黄嚢の萎縮がみられ、また、卵黄嚢径は頭殿長よりも有意に短かった (Table 24)。萎縮した卵黄嚢では卵黄嚢膜の血液循環および卵黄嚢腔の拡張に乏しく、卵黄嚢とライヘルト膜の間隔が異常に狭かった (Fig.15A, B)。しかしながら、これらの胚は正常の 11 日胚に比べ小さく、また特に尾芽の低形成がみられるものの、ほぼ胎齢に

応じた外形的特長を有していた (Fig.15C, D)。

in vitro 実験：

胎齢 10 日のラット胚の培養結果を Table 25 に示した。胎齢 10 日のラット胚は、50 μ M の濃度のインジウムに 24 時間曝露された場合、24 時間および 48 時間培養のいずれにおいても、卵黄嚢径および頭殿長が対照群に比べて有意に減少した。インジウム群の胚の生存率および体節数については 24 時間培養 (胎齢 11 日相当まで発育) では対照群と差はみられなかったが、48 時間培養 (胎齢 12 日相当まで発育) では対照群に比べて有意に減少した。

胚の形態について、24 時間培養 (胎齢 11 日相当まで発育) では、インジウム群の大部分の胚は、*in vivo* 実験における 11 日胚とは異なり、尾芽の低形成はみられず、見かけ上の形態は正常であった (Fig.16A, B)。一方、48 時間培養 (胎齢 12 日相当まで発育) では、インジウム群の全ての胚で *in vivo* 実験における 12 日胚と同様に、尾芽の低形成が認められた (Fig.16C, D)。24 時間培養の生存胚 (胎齢 11 日に相当) について、NBS を用いてアポトーシスによる死細胞を染色したところ、*in vivo* 実験の 0.4 mg/kg 群の胎齢 11 日の生存胚に比べると染色の程度は弱かったものの、同様な尾芽における NBS 染色が対照群よりも強く認められた (Fig.16E, F)。TUNEL 法による断片化した DNA の染色においても、NBS 染色と同様に、24 時間培養胚 (胎齢 11 日に相当) では尾芽におけるアポトーシスが認められた (Fig.16G, H)。

100 μ M の濃度のインジウムで胎齢 10 日のラット胚を処理した場合、24 時間の培養で胚死亡および卵黄嚢膜の萎縮がみられ (Fig.17A, B)、48 時間の培養では、さらに著しい卵黄嚢膜の萎縮が認められた (Fig.17C, D)。なお、

100 μM 群の 24 時間培養における死亡胚は対照群に比べ明らかに小さく、特に尾芽の低形成がみられた (Fig.17B) が、死亡胚であることから詳細な形態観察を実施しなかった。

考察

本章の *in vivo* 実験における結果は、妊娠ラットへのインジウム投与により誘発される妊娠末期胎子の尾部奇形は、妊娠初期のラット胚においては尾芽の低形成として観察されることを示している。インジウム群の胚では尾芽においてアポトーシスの増加が認められた。本実験で妊娠 10 日のラットにインジウムの 0.4 mg/kg を投与した際、胎齢 11、12 または 13 日胚における尾芽の低形成の発生率は 100%であったこと、ならびに第 3 章の実験で妊娠 10 日のラットに同量のインジウムを投与した際の妊娠 20 日における胎子尾部奇形（曲尾、短尾あるいは無尾）発生率は 99%であったことから、胎齢 11~13 日の胚で観察される尾芽の低形成は殆ど回復せず、妊娠末期における胎子尾部奇形に至るものと推測される。この推論は、体節は頭部側から尾部側に向かって形成される（Neubuser et al., 1997）ことを踏まえると、本 *in vivo* 実験のインジウム群の胎齢 13 日胚において、有意な頭殿長の減少がみられないにも関わらず体節数の減少が認められたことから一部支持される。以上のことから、インジウムにより誘発されるラット胎子尾部奇形（曲尾、短尾、無尾）は、アポトーシスが増加することによって細胞死が多く誘発され、その結果として尾芽の形成が抑制される可能性が示唆された。

本章の *in vivo* 実験結果は、ラット胚の培養時間をインジウムの 24 時間曝露後、さらに 24 時間培養期間を延長した *in vitro* 実験結果と一致した。インジウム群では 24 時間培養において胚の発育抑制、尾芽におけるアポトーシスの増加および卵黄囊膜の萎縮が 50 μ M で認められた。48 時間の培養では、胚の生存率の減少、体節数の減少および尾芽の低形成が認められた。以上の結果から、第 2 章で述べた如く、インジウムによる胚毒性は受胎産物（胚あるいは卵黄囊）に

対する直接作用と考えられる。

in vivo および *in vitro* 実験における高用量あるいは高濃度のインジウム群 (1 mg/kg および 100 μ M) の胚の観察において、卵黄囊膜が著しく萎縮しているにも関わらず、胚は尾芽の低形成を除けば、ほぼ胎齢に応じた外形を呈していた。これは、卵黄囊膜はインジウムの毒性に対して、胚 (胎子) に比べてより感受性が高いことを示している。さらに、*in vitro* 実験ではインジウム群において、24 時間の培養に比べ、48 時間の培養では卵黄囊膜の萎縮が顕著であった、すなわち、胎齢の進行に伴いインジウム群の卵黄囊の萎縮は進行した。以上のことから、インジウムによる胚死亡には、卵黄囊膜の血液循環の低下ならびに機能低下に伴い、胚への栄養共有が不足することが大きく関与していると考えられた。

ラットとヒトにおいて、卵黄囊の形態と機能は異なる (Garbis-Berkvens & Peters, 1987)。それゆえ、ヒトにおける安全性を考察する上でインジウムの卵黄囊に対する毒性について考察することは重要である。卵黄囊を介する機序により奇形を誘発する催奇形性物質については、種差がある。例えば、ウシ赤血球由来のヘモグロビンを主とする酸素担体 (HBOC) は卵黄囊に対して特異的な毒性を有し、ラットにおいて催奇形性を示すが、反転卵黄囊を有さないイヌにおいては催奇形性を示さない (Holson et al., 2005)。しかしながら、インジウムはラットと同様な反転卵黄囊を有するマウスに対し、胎子死亡は誘発するが胎子奇形は誘発しないことから、催奇形性を含めたインジウムの発生毒性の発現機序を、その卵黄囊に対する毒性だけで説明することはできない。

in vivo および *in vitro* 実験におけるインジウムの曝露量を比較すると、インジウムによる胎子奇形の発現は曝露時間に比べて曝露濃度により強く依存することが示唆される。第2章で述べた如く、全胚培養系において、臓側卵黄囊に

包まれた状態の胚（胎子）と培養液との関係は、子宮内における胎子と母体の関係に良く似ていることから、*in vitro*におけるインジウムの曝露濃度と *in vivo*における母体血清中のインジウム濃度を比較するのは生物学的に妥当である。第2章の実験で、妊娠ラットにインジウムの 0.4 mg/kg を静脈内投与した際の、母動物中血清中のインジウム濃度は 20 分後に 6.3 $\mu\text{g/mL}$ (55 μM) を示し、3 時間後には半減した。このことから、*in vitro* 実験における 50 μM での 24 時間曝露におけるインジウムの総曝露量（曝露濃度 \times 時間）は、*in vivo* 実験でインジウム 0.4 mg/kg を投与した際の総曝露量より大きいと考えられる。さらに、第2章で胎齢 9 日の胚を 50 μM の濃度のインジウムに 48 時間曝露させた際、全ての胚が死亡し、奇形は確認できず、また、本章の実験 100 μM では死亡胚において尾芽の低形成がみられた。それゆえ、本試験において 50 μM の濃度のインジウムで 24 時間培養した際に尾芽の低形成が生じなかったのは、*in vivo* の 0.4 mg/kg 投与に比べて曝露濃度が低かったためと考えられた。

48 時間培養において、遅発性に形態異常と死亡がみられたことは、インジウムの胚毒性は培養液からインジウムを除去した後にも観察されたことを示している。妊娠ラットにインジウムを経口投与した場合、投与量に応じて胎子中にインジウムが移行したと報告されている (Ungvary et al., 2000) ことを踏まえると、インジウムによる胚毒性の残存は閉じられた培養環境下で胚中にインジウムが取り込まれていることにもよるのかもしれない。また、ハムスターにインジウムを投与した 30 日後においても σ -aminolevulinic acid dehydrate の阻害がみられたとの報告 (Conner et al., 1995) もあることから、インジウムは曝露期間中に分子レベルで不可逆的な影響を及ぼしている可能性も考えられる。

結論すると、妊娠ラットへのインジウム投与により誘発される胎子尾部奇形（曲尾、短尾、無尾）の病態形成機序は、アポトーシスが増加することによっ

て細胞死が多く誘発され、その結果として尾芽の形成が抑制される可能性が示唆された。インジウムによりアポトーシスが誘発される機序ならびにアポトーシスとインジウムの胚毒性の関係については、今後さらに検討が必要である。また、インジウムによる胚毒性は直接作用であり、インジウムにより卵黄囊膜の機能低下が引き起こされることが、胚死亡の一因となっていると推察された。

小括

in vitro および *in vivo* 実験により、インジウムによるラット胎子尾部奇形の病態形成機序を検討した。*in vivo* 実験では 0.4 mg/kg のインジウムを妊娠 10 日のラットに静脈内投与し、妊娠 11、12 または 13 日に胚を観察した。*in vitro* 実験では妊娠 10 日のラット胚を 50 μ M のインジウムを含むラット血清で 24 時間培養あるいは、その後インジウムを含まない血清でさらに 24 時間培養した。*in vivo* 実験ではインジウム投与群において尾部の低形成が胎齢 11 日から認められ、また、胎齢 11 日胚において尾芽にナイルブルー陽性細胞が認められた。この所見は *in vitro* 実験で再現された。培養 24 時間後の胚（胎齢 11 日に相当）の尾部にアポトーシス（TUNEL 陽性細胞）が確認され、48 時間後（胎齢 12 日に相当）に尾部の発育阻害が認められた。従って、インジウムにより誘発されるラット胎子尾部奇形（曲尾、短尾、無尾）は、アポトーシスが増加することによって細胞死が多く誘発され、その結果として尾芽の形成が抑制される可能性が示唆された（Nakajima et al., 2008a）。

Table 23 Effects of indium on the growth of rat embryos after maternal administration on day 10 of gestation

	Control ^a			Indium (0.4 mg/kg)				
	Day 11	Day 12	Day 13	Day 11	Day 12	Day 13	Day 12	Day 13
No. of litters	3	3	3	3	3	5		
No. of implants per litter ^b	15.7±1.2	17.0±1.0	15.7±0.6	15.7±1.2	15.3±0.6	14.8±1.3		
Viability of embryos (%)	94.1	94.2	97.9	100	86.8	54.7		
No. of litters with live embryos	3	3	3	3	3	3		
No. of live embryos per litter ^b	14.7±0.6	16.0±1.0	15.3±0.6	15.7±1.2	13.3±1.5	13.7±2.1		
Crown-rump length (mm) ^b	4.05±0.26	6.06±0.17	8.23±0.21	3.37±0.13*	4.88±0.07**	7.54±0.43		
No. of somite pairs ^a	27.2±0.80	37.5±1.11	52.6±0.46	24.3±1.04*	28.9±1.26**	38.3±4.69*		
No. of abnormal embryos	0	0	0	47 (100%)*	40 (100%)*	41 (100%)*		
Caudal hypoplasia	0	0	0	47 (100%)*	40 (100%)*	41 (100%)*		

Embryos were removed and observed on designated days.

^aSaline.

^bMean±S.D.

Asterisks indicate significant differences compared with the control group (*: p<0.05, **: p<0.01).

Table 24 Effects of indium on the yolk sac of day 11 rat embryos after maternal administration on day 10 of gestation

	Indium (1 mg/kg)
No. of litters	3
No. of embryos per litter ^a	17.3±1.5
Yolk sac diameter (mm) ^a	2.64±0.25**
Crown-rump length (mm) ^a	2.81±0.25
No. of somite pairs ^a	23.5±0.68
No. of abnormal embryos	52 (100%)
Caudal hypoplasia	52 (100%)

^a Mean±S.D.

Asterisks indicate significant differences compared with the crown-rump length by paired t-test (**: p<0.01).

Table 25 Effects of indium on the growth of rat embryos cultured from day 10 of gestation

	Control			Indium (50 μ M·24 h)			Indium (100 μ M·24 h)		
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	
No. of cultured embryos	16	18	16	21	2	3			
No. of live embryos	16 (100%)	17 (94.4%)	16 (100%)	13 (61.9%)*	0**	0**			
Yolk sac diameter (mm) ^a	4.60±0.28	6.10±0.33	4.36±0.40*	5.34±0.30**	ND	ND			
Crown-rump length (mm) ^a	4.24±0.36	5.74±0.35	3.97±0.34**	5.11±0.27**	ND	ND			
No. of somite pairs ^a	26.4±1.36	36.6±0.81	26.3±1.40	34.8±1.16**	ND	ND			
No. of abnormal embryos	0 (0%)	0 (0%)	4 (25.0%)	12 (92.3%)**	ND	ND			
Caudal hypoplasia	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	12 (92.3%)**					
Irregular somite	0 (0%)	0 (0%)	3 (18.8%)	0 (0%)					
Swollen rhombencephalon	0 (0%)	0 (0%)	1 (6.3%)	0 (0%)					

Rat embryos were exposed to indium for the initial 24 h of the culture.

^a Mean±S.D. is shown.

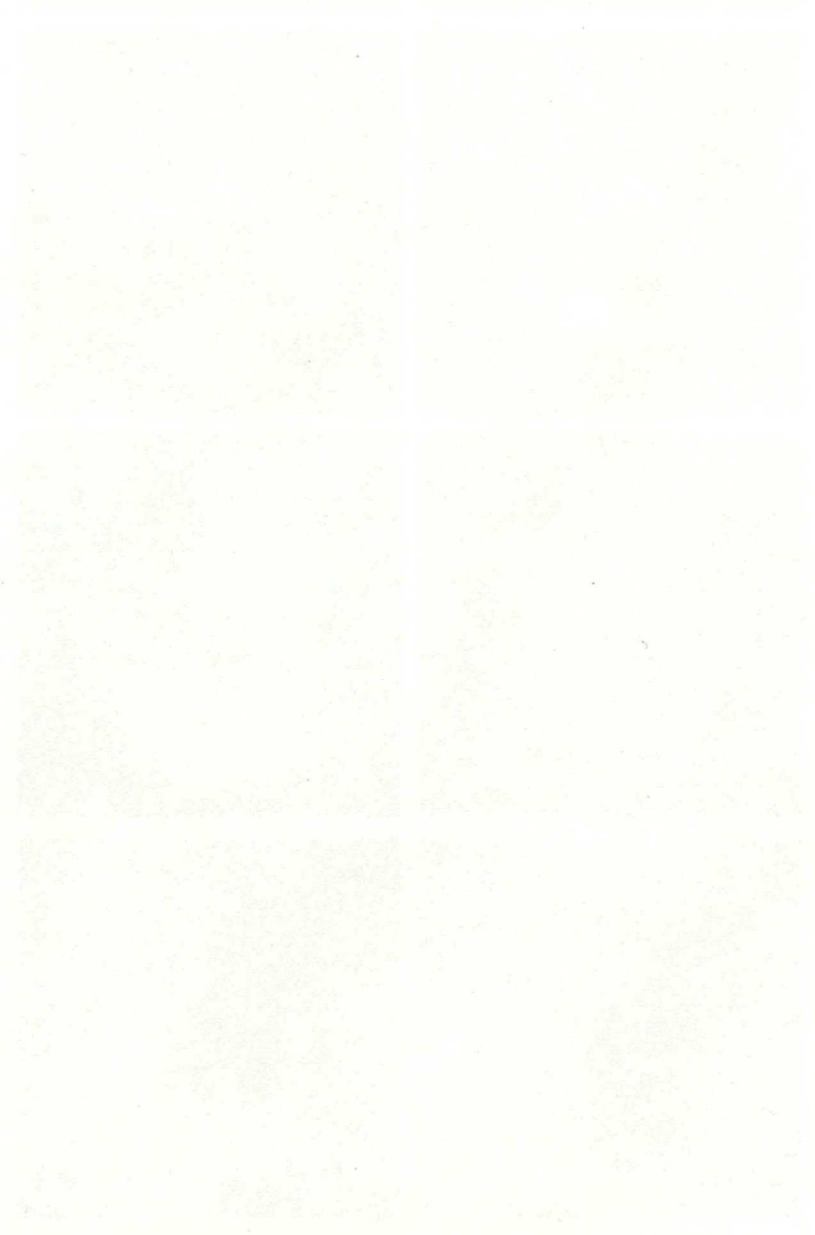
Asterisks indicate significant differences compared with the control group (*: p<0.05, **: p<0.01).

ND means 'not determined because of no live embryos.'

Fig. 14 Rat embryos from pregnant rats treated with intravenous administration of indium at 0.4 mg/kg on day 10 of gestation.

Scale bar = 1 mm.

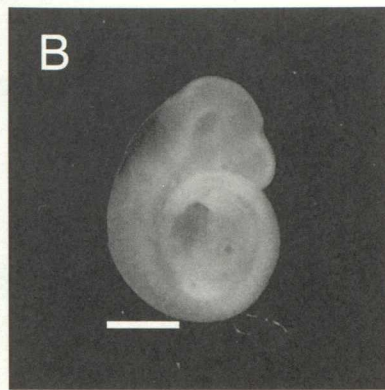
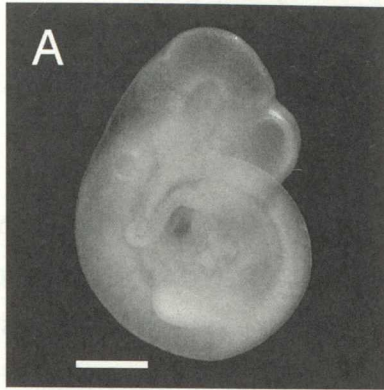
Arrowheads indicate the increased apoptosis stained with NBS.



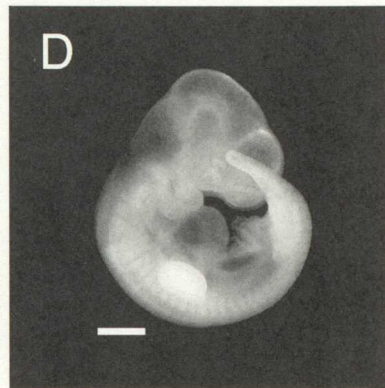
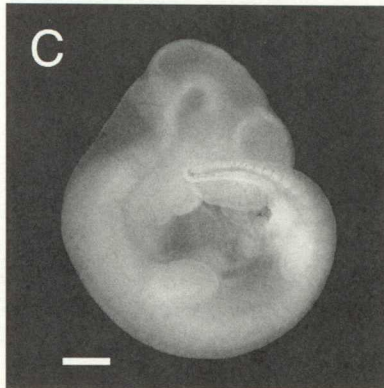
Control

Indium
(0.4 mg/kg)

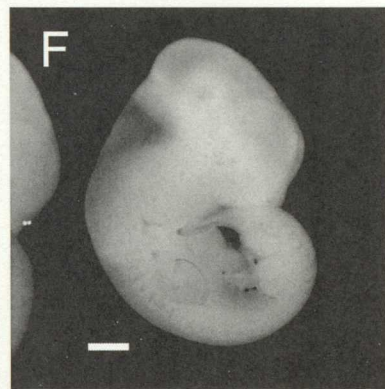
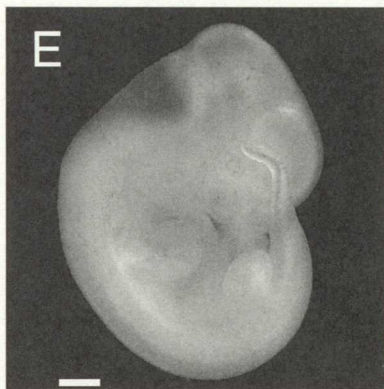
Day 11



Day 12



Day 13



Day 11
tailbud
stained with
NBS

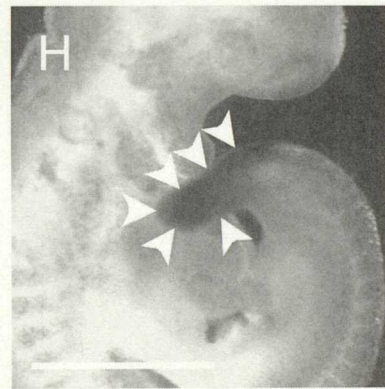


Fig. 15 Rat embryos from pregnant rats treated with intravenous administration of indium at 1 mg/kg on day 10 of gestation.

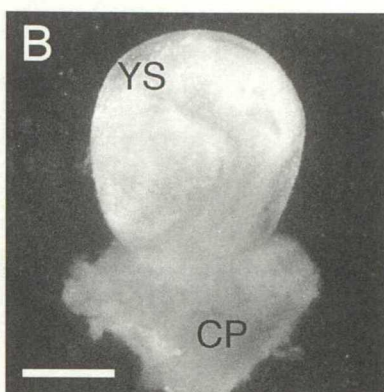
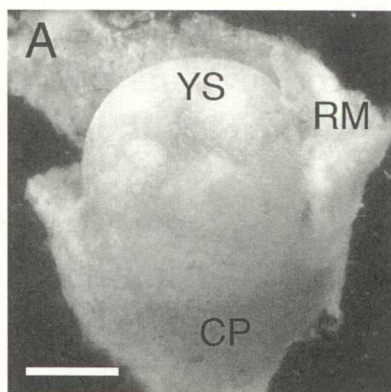
CP: Chorio-allantoic placenta.

RM: Reichert's membrane and decidual tissue.

YS: Yolk sac membrane.

Scale bar = 1 mm.

Day11
Before
removal of
embryonic
membranes



Day11
After
removal of
embryonic
membranes

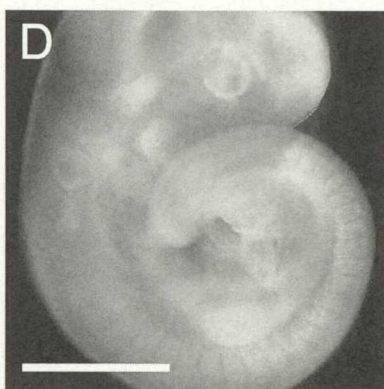
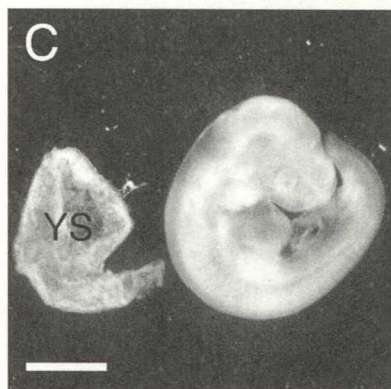
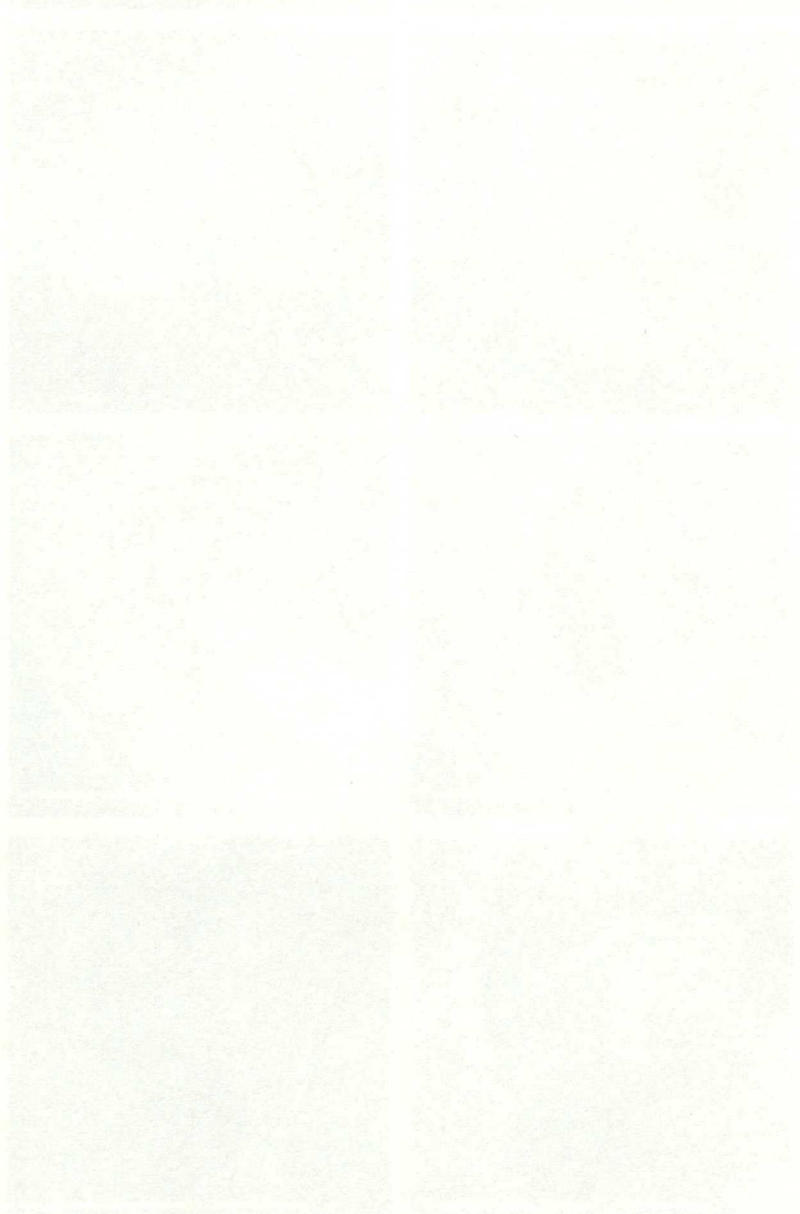


Fig. 16 Rat embryos cultured for 24 or 48 h with 24 h exposure to indium at 50 μ M from day 10 of gestation.

Scale bar = 1 mm.

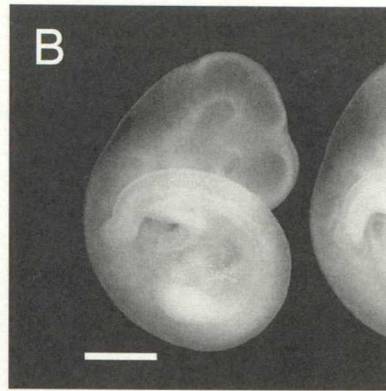
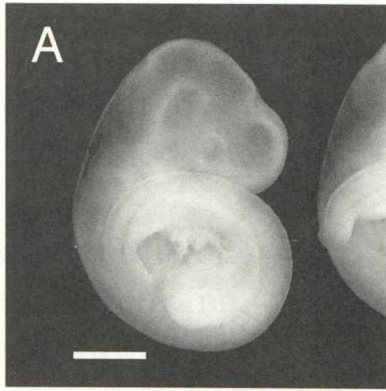
Arrowheads indicate the increased apoptosis stained with NBS or the TUNEL method.



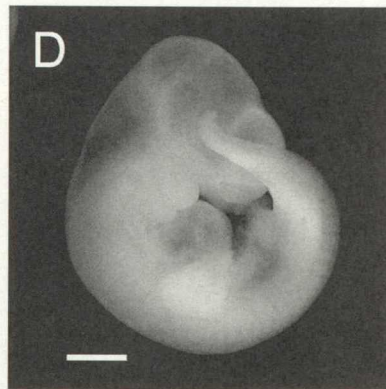
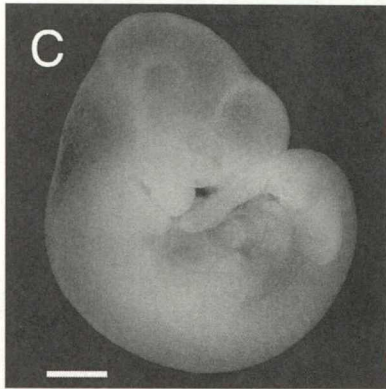
Control

Indium
(50 μ M · 24 h)

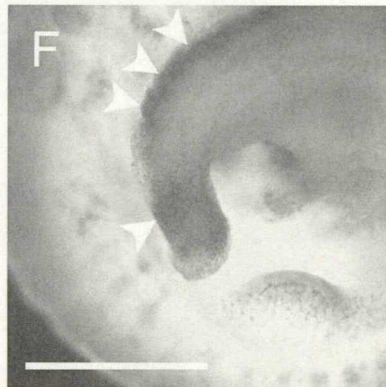
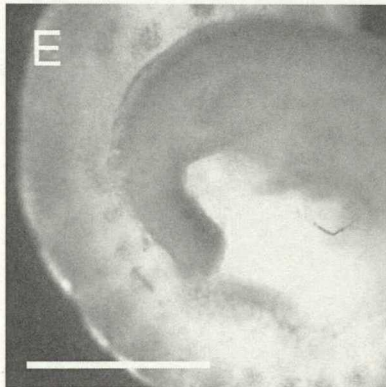
24 h



48 h



24 h
tailbud
stained with
NBS



24 h
tailbud
stained with
TUNEL

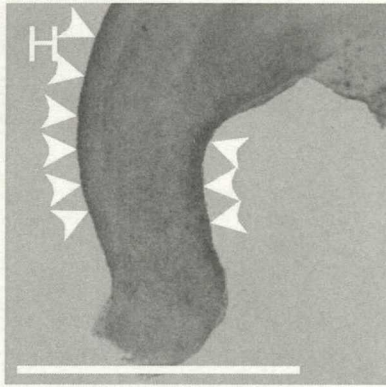
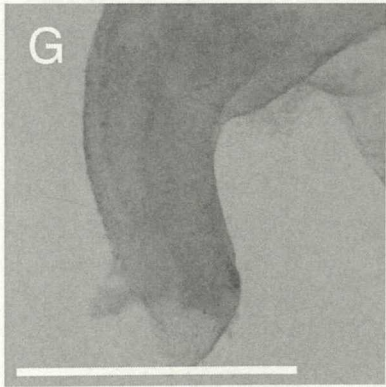
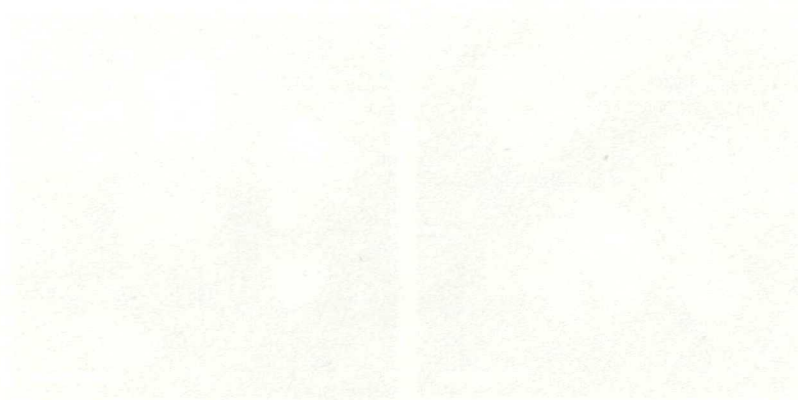


Fig. 17 Rat embryos cultured for 24 or 48 h with 24 h exposure to indium at 100 μ M from day 10 of gestation.

CP: Chorio-allantoic placenta.

YS: Yolk sac membrane.

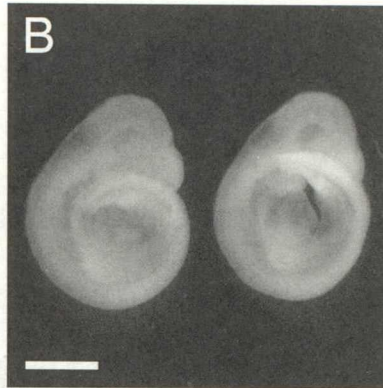
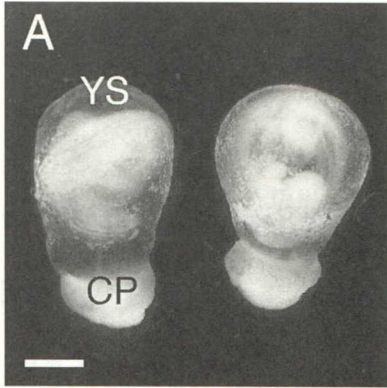
Scale bar = 1 mm.



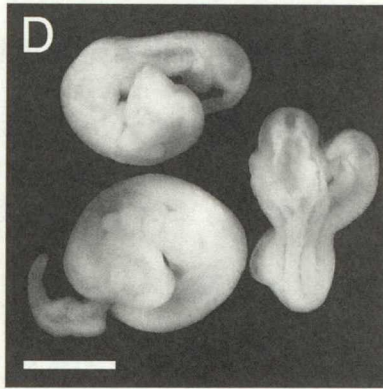
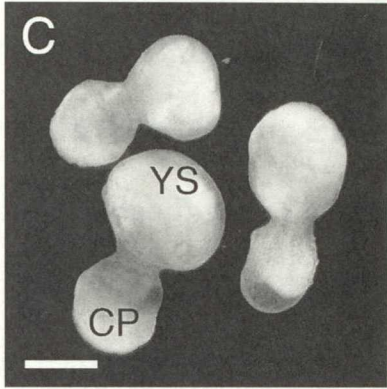
At end of
culture

After removal
of embryonic
membranes

24 h



48 h



第6章

母体ラットへのインジウム投与が引き起こす胎子尾部の
BMP-4 mRNA 発現量の変化

Bone Morphogenetic Protein (BMP) は、1965年に Urist によって骨基質中に軟骨および骨を誘導する物質として初めて同定された (Urist, 1965)。BMP は TGF- β スーパーファミリーに属する因子で、このうち、BMP-2、BMP-4～BMP-7 および BMP-9 は骨誘導活性を有することが報告されており、また、BMP-4 は軟骨細胞の分化を誘導するシグナルに関与すると考えられている (Bandyopadpadhyay et al., 2006; Chen et al., 2004)。

第1章で、インジウムを妊娠9日のラットに静脈内投与すると、胎子の外表、内臓および骨格奇形を誘発することを明らかにした。外表奇形は主に尾部にみられた (Nakajima et al., 1998)。そこで、第6章では、妊娠ラットにインジウムを投与した場合に発生する胎子尾部の奇形の発現に関与している因子を明らかにするため、まず、胎子尾椎の骨形成因子である BMP-4 の mRNA 発現量の変化を調べた。

材料および方法

被験物質：

塩化インジウム 4 水和物 ($\text{InCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、和光純薬工業株式会社、大阪) を用いた。以下、インジウムと略して記載し、投与量は塩化インジウム重量で記載した。

実験動物：

Wistar 系ラットを用いた。ラットは一定の明暗周期 (12 時間明期、12 時間暗期) および温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ の条件下で飼育し、飼料 (Labo MR Breeder、日本農産工業株式会社、神奈川) と水は自由摂取させた。雌雄を一晩同居させ、翌朝、膣垢の観察を行い精子が認められた動物を交尾確認動物として、その日を妊娠 0 日とした。胎子の胎齢は、母体の妊娠 1 日目を胎齢第 1 日目とした。

被験物質の投与：

第 1 章と同様な方法で、インジウムの 0.2、0.4、0.6 および 0.8 mg/kg を妊娠 9 日のラットに静脈内投与した。対照群には生理食塩液を同様に投与した。

剖検：

妊娠 17 および 19 日に母体ラットを安楽死させ、直ちに帝王切開して子宮から胎子を取り出し、着床数、胚・胎子死亡率および生存胎子数を調べた。生存胎子については体重を測定した後、尾部を採取し、RNA later (Ambion, USA) に浸漬して一晩放置後、 -80°C にて保存し、RNA 抽出に用いた。

RNA 抽出 :

胎子の尾部は2個体分をまとめて ISOGEN (和光純薬工業株式会社、大阪) 0.8 mL を用いてホモジナイズした後、クロロホルム 0.2 mL を加え、30 秒攪拌後、4°C で5分間放置し、遠心分離 (12 K×g、15 分、4°C) した。上清は別のチューブに回収し、さらに遠心分離 (12 K×g、15 分、4°C) し、上清を回収した。上清に Ethachinmate (株式会社ニッポンジーン、東京) 3 μL とイソプロパノール 0.8 mL を加え、4°C で一晩放置後、遠心分離 (12 K×g、15 分、4°C) した。上清を除去後、70%エタノールを 1 mL 加え、遠心分離 (7.5 K×g、15 分、4°C) し、70%エタノールを除き、風乾した後、DNase & RNase-FREE WATER (INC Biomedicals Inc., USA) 0.1 mL を加え、自然溶解させた。これを 50 倍希釈して、分光光度計 (株式会社島津製作所、京都) にて、260 nm および 280 nm の吸光度 (OD) を測定し、 $OD_{260}/25$ の計算により RNA 量を算出した。また OD_{260}/OD_{260} 比から抽出した RNA の純度を確認した。

RT-PCR 法 :

逆転写反応には、Antisense Primer 法を用いた。試薬は、SuperScript™One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen, USA) を用いた。RNA (BMP-4: 10 ng、 β -actin: 1 ng)、2X Reaction Mix を 25 μL、Sense および Antisense Primer (BMP-4: 0.2 μM、 β -actin: 0.5 μM) を 1 μL、RT/Platinum Taq Mix を 1 μL、DNase & RNase-FREE WATER を含む反応液を 50 μL として攪拌し、サーマルサイクラー (BIO-RAD, USA) を用いて、RT-PCR を行った。増幅した DNA は、2.5%アガロースゲル/TAE buffer にて泳動し、Ethidium Brmide 溶液 10 mg/mL (BIO-RAD, USA) を用いて 25 分

染色した。紫外線照射のもと、分離したバンドをデジタルカメラで撮影し、NIH 画像解析ソフトを用いてバンドの濃度を測定した。1 個体につき 2 回 RT-PCR を行い、その平均値を算出した。BMP-4 mRNA の発現量は内部標準である β -actin mRNA の発現量に対する相対比で表した。用いたプライマーの塩基配列は、BMP-4 については、sense primer: CAT CCC AGA GAA TGA GGT GA、antisense primer: TTC CCA CCG TGT CAC ATT GT であり、 β -actin については、sense primer: CAG CCT TCC TTC CTG GGT AT、antisense primer: TAG AGC CAC CAA TCC ACA CA であり、生成物は、それぞれ、202 および 246 bp であった。温度および時間設定を以下に示した。

		BMP-4		β -actin		
逆転写反応		50°C	30 分	50°C	30 分	
		94°C	2 分	94°C	2 分	
増幅	×35	94°C	30 秒	×28	94°C	30 秒
		52°C	30 秒		60°C	30 秒
		75°C	30 秒		75°C	30 秒
		75°C	4 分		75°C	4 分

統計学的解析法：

「Student の t 検定」を用いた。

結果

胎齢 17 および 19 日における胎子の発育状況を Table 26 に示した。胎齢 17 日では 0.4 mg/kg 群の胎子重量は、対照群および 0.2 mg/kg 群と比較して有意に減少した。しかし、0.6 mg/kg 群の胎子重量は、0.4 mg/kg 群と比較して有意に増加した。胎齢 19 日では 0.4 mg/kg 群の胎子重量は対照群に比べて有意に減少した。0.8 mg/kg 群の胎子は、剖検時には全て吸収されていた。0.6 mg/kg 群でも胚・胎子死亡率は 50% と高値であった。

胎齢 17 および 19 日の胎子尾部における BMP-4 mRNA 発現量を Table 27 および Fig.18 に示した。胎齢 17 日の 0.4 および 0.6 mg/kg 群の胎子尾部における BMP-4 mRNA 発現量は、0.2 mg/kg 群の値と比較して有意に減少した。さらに、0.6 mg/kg 群の BMP-4 mRNA 発現量は、0.4 mg/kg 群の値と比較して有意に減少した。しかし、胎齢 19 日の、0.4 mg/kg 群の胎子尾部における BMP-4 mRNA 発現量は、対照群の値と比較して有意に増加した。

考察

本章では、妊娠ラットにインジウムを投与した場合に発生する胎子尾部の奇形の発現に関与している因子を明らかにするため、妊娠9日のラットにインジウムを静脈内投与し、妊娠17および19日の胎子尾部における BMP-4 mRNA の発現を調べた。

本実験において胎齢17日の0.4 mg/kg 群の胎子重量は対照群および0.2 mg/kg 群に比べ有意に減少していた。また、胎齢19日の0.4 mg/kg 群の胎子重量も対照群と比べ有意に減少しており、第1章の実験と同一の投与量(0.4 mg/kg)で胎子発育抑制作用が確認された。本実験の0.8 mg/kg 群では生存胎子を得ることはできず、0.8 mg/kg は100%胎子致死量と判断された。なお、胎齢17日の0.6 mg/kg 群の胎子重量は0.4 mg/kg 群の胎子重量と比べ有意に増加していた。これは、0.6 mg/kg 群の1腹当たりの生存胎子数が0.4 mg/kg 群に比べて少なかった(0.4 mg/kg 群: 8.1 匹/腹、0.6 mg/kg 群: 6.5 匹/腹)ことに起因すると考えられた。

本実験では、胎齢17日において BMP-4 mRNA 発現量はインジウムの投与用量に依存して減少したことから、尾部における BMP-4 mRNA 発現量がインジウム投与の影響で減少したと考えられる。また、対照群と0.2 mg/kg 群との間に有意差はなく、0.2 mg/kg 群と0.4 mg/kg 群との間に有意差が認められたことから、本実験条件下において胎子尾部の BMP-4 mRNA 発現を阻害するインジウムの投与量は0.4 mg/kg 以上ということが示唆された。

胎子尾部の BMP-4 は Sonic hedgehog (: Shh) という細胞の分化誘導のシグナルとして働く遺伝子の下流に存在する遺伝子であり、さらに Shh タンパク質の分泌を調節しているのが胎子期に特有の脊索である(Qi et al., 2004)。本実験で

は、BMP-4 mRNA 発現量に関してのみ検討したので、今後 BMP-4 より上流の遺伝子に関しても検討する必要がある。胎齢 19 日では、0.4 mg/kg 群の BMP-4 mRNA 発現量は、対照群と比較して有意に増加しており、胎齢 17 日の結果についての考察と矛盾すると思われる。しかし、マウスの骨折の再生過程において、BMP-4 mRNA の発現量やその受容体が過剰に発現し、骨再生を促進しているという報告がある (Nakase et al., 1994)。このことからインジウム投与群の尾部の BMP-4 mRNA 発現量が過剰になるということは、胎齢 17 日では抑制されていた骨形成が、胎齢 19 日では BMP-4 mRNA の発現を回復させることによって、骨形成の遅れを取り戻そうという作用が働いた可能性が考えられる。今後、さらなる検討が必要である。

小括

妊娠ラットにインジウムを投与した場合に発生する胎子尾部の奇形の発現に関与している因子を明らかにするため、妊娠9日のラットに0.2 mg/kgあるいは0.4 mg/kgのインジウムを静脈内投与し、妊娠17および19日の胎子尾部におけるBMP-4 (Bone Morphological Protein-4) mRNAの発現を調べた。胎齢17日においてBMP-4 mRNA発現量はインジウムの投与用量に依存して減少したことから、インジウム投与は、尾部におけるBMP-4 mRNA発現量を減少させたと考えられた。また、BMP-4 mRNA発現量は、対照群と0.2 mg/kg群との間では有意差はなく、0.2 mg/kg投与群と0.4 mg/kg投与群との間の発現量に有意差が認められたことから、本実験条件下において胎子尾部のBMP-4 mRNA発現を阻害するインジウムの投与量は0.4 mg/kg以上であることが明らかとなった。しかし、胎齢19日の0.4 mg/kg群の胎子尾部におけるBMP-4 mRNA発現量は、対照群の値と比較して有意に増加していた。インジウム投与群の尾部のBMP-4 mRNA発現量が過剰になるということは、胎齢17日では抑制されていた骨形成が、胎齢19日ではBMP-4 mRNAの発現を回復させることによって、骨形成の遅れを取り戻そうという作用が働いた可能性が示唆された (Nakajima et al., 2008b)。

Table 26 Fetal growth in pregnant rats treated with indium

Embryonic age	Group	No. of pregnant rats	Mortality of implants (%)	No. of live fetuses	Fetal weight (g)
17	Control	3	10.3	31	0.81±0.14 a
	Indium 0.2 mg/kg	4	20	35	0.77±0.17 a
	Indium 0.4 mg/kg	11	18.3	89	0.69±0.17 b
	Indium 0.6 mg/kg	4	50	26	0.78±0.16 a
	Indium 0.8 mg/kg	3	100	0	
19	Control	2	0	13	2.12±0.05 a
	Indium 0.4 mg/kg	7	23.6	59	1.84±0.04 b

a, b: Significant differences between different letters in the same age ($p < 0.05$).

Table 27 Levels of BMP-4 mRNA expression in fetal tails

Embryonic age	Group	No. of fetuses examined	BMP-4 mRNA expression
17	Control	8	1.15±0.14 a
	Indium 0.2 mg/kg	6	1.05±0.11 a
	Indium 0.4 mg/kg	15	0.67±0.04 b
	Indium 0.6 mg/kg	4	0.41±0.10 c
19	Control	5	0.64±0.04 a
	Indium 0.4 mg/kg	11	0.74±0.02 b

a, b, c: Significant differences between different letters in the same age ($p < 0.05$).

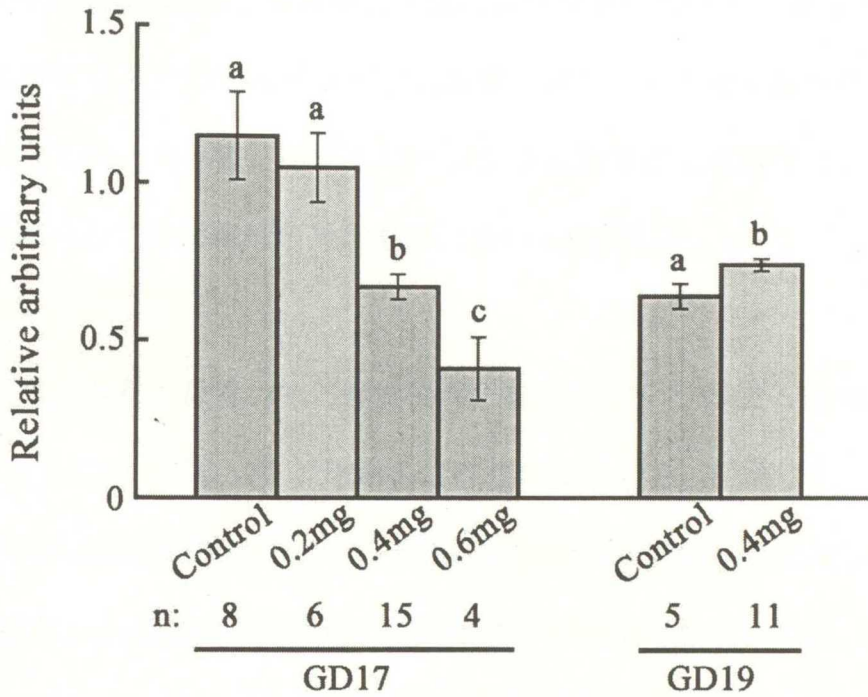


Fig. 18 Effect of the maternal administration of indium on the mRNA level of BMP-4 in fetal tails measured by semiquantitative transcription-PCR.

Values expressed as a ratio to the housekeeping gene, β -actin.

Doses shown as mg indicate mg/kg.

a,b,c : Significant differences between different letters in the same age ($p < 0.05$).

総括

本論文ではインジウムの発生毒性の特徴および毒性発現機序について詳細に検討した。まず、インジウムの発生毒性、特に催奇形性の有無をラットを用いて検討した。次に、ラット全胚培養実験およびトキシコキネティクス実験により、インジウムの曝露濃度、曝露時間と発生毒性発現との関連を調べた。次に、ラットおよびマウスを用いてインジウムの発生毒性、特に催奇形性の動物種差について検討した。さらに、母体へのインジウム投与により誘発されるラット胎子の骨格ならびに尾部奇形の発現機序について検討した。

1. インジウムの発生毒性、特に催奇形性の有無を明らかにするため、妊娠 9 日のラットにインジウムを静脈内または経口投与して、妊娠 20 日に胎子の発育ならびに形態を調べた。その結果、インジウムはラットに対して胚・胎子致死作用、胎子発育抑制作用、催奇形性等の発生毒性を示した。筆者の知る限りにおいて、インジウムのラットに対する催奇形性を明らかにした実験は本実験が初めてである。静脈内単回投与により奇形を誘発するインジウムの投与量は 0.4 mg/kg であり、主に尾部および指の外表奇形が認められた。一方、300 mg/kg を経口投与した場合、静脈内投与実験と同一の型の外表奇形が誘発されたが、その数は僅か（低頻度）であった。すなわち、インジウムの経口投与は、静脈内投与に比べ発生毒性が著しく弱いことが明らかとなった (Nakajima et al., 1998)。
2. ラット全胚培養実験系およびトキシコキネティクス実験系を用いて、インジウムの発生毒性について調べた。ラット全胚培養実験では、インジウムは 25

～50 μM の濃度での曝露により、胚の日齢、曝露濃度および曝露時間に依存して胚毒性（胚致死作用、胚発育抑制作用）を示した。トキシコキネティクス実験における母体血清中のインジウム濃度は、ラット全胚培養実験で毒性のみられた 25～50 μM より 300 mg/kg の経口投与では低く、0.4 mg/kg を静脈内投与した場合の母体最高血清中濃度は 55 μM であった。すなわち、*in vitro* で明らかに発生毒性を示す濃度は、発生毒性を示す *in vivo* の母体血清中濃度とよく一致していた。以上のことから、インジウムの発生毒性は受胎産物（胚あるいは卵黄嚢）に対する直接作用であることが示唆された。総曝露量（曝露濃度×曝露時間）が等しい場合には、高濃度の曝露でより強い胚毒性が認められることから、インジウムの胚毒性は曝露時間に比べて曝露濃度により依存すると判断された。すなわち、インジウムの胚毒性が曝露濃度により強く依存していることから、静脈内投与時と経口投与時のインジウムにおける発生毒性の強度の差は、胚の曝露濃度の差によるものであると推論された（Nakajima et al., 1999）。

3. ラットおよびマウスを用いて、インジウムの発生毒性に種差があるか否かについて検討した。ラットでは 0.4 mg/kg のインジウムを妊娠 9、10 または 11 日に単回静脈内投与し、妊娠 20 日に胎子を観察した。マウスでは 0.8 および 1.6 mg/kg のインジウムを妊娠 7、8 または 9 日に単回静脈内投与し、妊娠 18 日に胎子を観察した。その結果、ラットでは胚・胎子死亡が 21.2～35.2%、外表奇形（主に尾の奇形）が 60.9～99.0% 出現した（対照群は 4.1 および 0%）。一方、マウスでは胚・胎子死亡が 0.8 mg/kg 投与で 9.0～19.5%、1.6 mg/kg 投与で 36.9～100% 出現し（対照群は 4.8%）、インジウム投与量に依存して胚・胎子死亡が増加したが、胎子外表奇形は殆ど観察されなかつ

た（0～1.5%）。以上の結果から、器官形成期に投与されたインジウムは、ラット及びマウスに対して胚・胎子毒性（胚・胎子致死作用、胎子発育抑制作用）を及ぼすことから、両者はインジウムに対して感受性を有するが、インジウムの催奇形性（胎子の外表奇形誘発作用）に注目すると、マウスはラットに比べ感受性が低いことが明らかになった（Nakajima et al., 2000）。

4. インジウムにより誘発されるラット胎子骨格奇形発現機序を検討するために、妊娠 10 日のラットにインジウムを静脈内投与して、妊娠 21 日における胎子の骨および軟骨の形態を骨・軟骨二重染色法により調べた。妊娠 10 日ラットへインジウム 0.3 mg/kg を投与すると、胎子の骨および軟骨の著しい形態異常が誘発された。中軸骨格の奇形は軟骨の奇形を伴っていた。中軸骨格および四肢の長骨は間葉由来の軟骨からの置換により形成されることを踏まえると、母体へのインジウム投与によって誘発される胎子軟骨の形成異常が胎子骨格奇形発現の一因となっていることが示唆された（Nakajima et al., 2007）。

5. *in vitro* および *in vivo* 実験により、インジウムによるラット胎子尾部奇形の病態形成機序を検討した。*in vivo* 実験では 0.4 mg/kg のインジウムを妊娠 10 日のラットに静脈内投与し、妊娠 11、12 または 13 日に胚を観察した。*in vitro* 実験では妊娠 10 日のラット胚を 50 μ M のインジウムを含むラット血清で 24 時間培養あるいは、その後インジウムを含まない血清でさらに 24 時間培養した。*in vivo* 実験ではインジウム投与群において尾部の低形成が胎齢 11 日から認められ、また、胎齢 11 日胚において尾芽にナイルブルー陽性細胞が認められた。この所見は *in vitro* 実験で再現された。培養 24 時間後

の胚（胎齢 11 日に相当）の尾部にアポトーシス（TUNEL 陽性細胞）が確認され、48 時間後（胎齢 12 日に相当）に尾部の発育阻害が認められた。従って、インジウムにより誘発されるラット胎子尾部奇形（曲尾、短尾、無尾）は、アポトーシスが増加することによって細胞死が多く誘発され、その結果として尾芽の形成が抑制される可能性が示唆された（Nakajima et al., 2008a）。

6. 妊娠ラットにインジウムを投与した場合に発生する胎子尾部の奇形の発現に関与している因子を明らかにするため、妊娠 9 日のラットに 0.2 mg/kg あるいは 0.4 mg/kg のインジウムを静脈内投与し、妊娠 17 および 19 日の胎子尾部における BMP-4 (Born Morphological Protein-4) mRNA の発現を調べた。胎齢 17 日において BMP-4 mRNA 発現量はインジウムの投与用量に依存して減少したことから、インジウム投与は、尾部における BMP-4 mRNA 発現量を減少させたと考えられた。また、BMP-4 mRNA 発現量は、対照群と 0.2 mg/kg 群との間では有意差はなく、0.2 mg/kg 投与群と 0.4 mg/kg 投与群との間の発現量に有意差が認められたことから、本実験条件下において胎子尾部の BMP-4 mRNA 発現を阻害するインジウムの投与量は 0.4 mg/kg 以上であることが明かとなった。しかし、胎齢 19 日の 0.4 mg/kg 群の胎子尾部における BMP-4 mRNA 発現量は、対照群の値と比較して有意に増加していた。インジウム投与群の尾部の BMP-4 mRNA 発現量が過剰になるということは、胎齢 17 日では抑制されていた骨形成が、胎齢 19 日では BMP-4 mRNA の発現を回復させることによって、骨形成の遅れを取り戻そうという作用が働いた可能性が示唆された（Nakajima et al., 2008b）。

以上の結果から、インジウムの発生毒性の特徴および毒性発現機序について

- ・ インジウムはラットにおいて、胚・胎子致死作用、胎子発育抑制作用、催奇形性等の発生毒性を示す、
- ・ インジウムの発生毒性は、受胎産物（胚あるいは卵黄嚢）に対する直接作用である、
- ・ インジウムの胚致死作用および胚発育抑制作用は、曝露時間に比べて曝露濃度により依存することが示唆される、
- ・ インジウムはマウスに対してもラットと同様な胚・胎子致死作用および胎子発育抑制作用を及ぼすが、催奇形性に注目すると、マウスはラットに比べ感受性が低い、
- ・ インジウムにより誘発される胎子軟骨の形成異常がラット胎子骨格奇形発現の一因となっていることが示唆される、
- ・ インジウムにより誘発されるラット胎子尾部奇形（曲尾、短尾、無尾）は、アポトーシスが増加することによって細胞死が多く誘発され、その結果として尾芽の形成が抑制される可能性が示唆される、
- ・ 妊娠9日ラットへ催奇形性量のインジウムを投与すると、胎齢17日の胎子尾部における BMP-4 mRNA 発現が阻害されたことから、BMP-4 mRNA は尾部奇形発現に関連する因子である可能性が示唆される、

ことが明らかとなった。

謝辞

本研究については、絶えざる御指導を賜った麻布大学獣医学部解剖学第 2 研究室の有嶋和義教授、山本雅子教授に感謝申し上げます。また、本研究遂行に当たって絶えざる御助成を賜った国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター薬理部の宇佐見誠先生に感謝申し上げます。さらに、多くの御助言を賜った麻布大学獣医学部動物工学研究室の滝沢達也教授、解剖学第 1 研究室の浅利昌男教授に感謝申し上げます。

文献

Alles AJ and Sulik KK (1989).

Retinoic acid-induced limb-reduction defects: perturbation of zones of programmed cell death as a pathogenetic mechanism.

Teratology, 40: 163-171.

Bandyopadhyay A, Tsuji K, Cox K, Harfe BD, Rosen V and Tabin CJ (2006).

Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, BMP7 in limb patterning and skeletogenesis.

PLoS genetics, 2: 2116-2130.

Brown NA and Fabro S (1981).

Quantitation of rat embryonic development in vitro: a morphological scoring system.

Teratology, 24: 65-78.

Bustamante J, Dock L, Vahter M, Fowler B and Orrenius S (1997).

The semiconductor elements arsenic and indium induce apoptosis in rat thymocytes.

Toxicology, 118: 129-136.

Castronovo FP and Wagner HN (1971).

Factors affecting the toxicity of the element indium.

Br J Exp Pathol, 52:543-559.

Chapin RE, Harris MW, Hunter ES III, Davis BJ, Collins BJ and Lockhart AC (1995).

The reproductive and developmental toxicity of indium in the Swiss mouse.
Fundam Appl Toxicol, 27:140-148.

Cockroft DL (1979).

Nutrient requirements of rat embryos undergoing organogenesis in vitro.
J Reprod Fertil, 57:505-510.

Conner EA, Yamauchi H and Fowler BA (1995).

Alterations in the heme biosynthetic pathway from the III-V semiconductor metal, indium arsenide (InAs).
Chem Biol Interact, 96:273-285.

Dawson AB (1926).

Note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red S.
Stain Technol, 1:123-124.

DeSesso JM (1997).

Comparative embryology.
In: Hood RD ed, Handbook of developmental toxicology, pp111-174, CRC Press,

Boca Raton.

江口保暢 (1979a).

胚子発生.

In: 家畜発生学, pp20-66, 文永堂, 東京.

江口保暢 (1979b).

骨の発生.

In: 家畜発生学, pp136-143, 文永堂, 東京.

Ferm VH and Carpenter SJ (1970).

Teratogenic and embryopathic effects of indium, gallium, and germanium.

Toxicol Appl Pharmacol, 16:166-170.

Fernandez EL, Gustafson AL, Andersson M, Hellman B and Encker L (2003).

Cadmium-induced changes in apoptotic gene expression levels and DNA damage in mouse embryos are blocked by zinc.

Toxicol Sci, 76: 162-170.

Garbis-Berkvens JM and Peters PWJ (1987).

Comparative morphology and physiology of embryonic and fetal membranes.

In: Nau H and Scott WJ Jr eds, Pharmacokinetics in Teratogenesis, Vol. I, Interspecies Comparison and Maternal/Embryonic-Fetal Drug Transfer,

pp13-44, CRC Press, Boca Raton.

Gregg NM (1941).

Congenital cataract following German measles in the mother.

Trans Ophthalmol Soc Aust, 3:35-46.

Gunberg DL (1976).

In vitro development of postimplantation rat embryos cultured on dialyzed rat serum.

Teratology, 14:65-70.

Guo X, Ohno Y, Kawanishi T, Sunouchi M and Takanaka A (1992).

Indium inhibits gap junctional communication between rat hepatocytes in primary culture.

Toxicol Lett, 60:99-106.

Hoar RM and Monie IW (1981).

Comparative development of specific organ systems.

In: Kimmel CA and Buelk-Sam J eds, Developmental toxicology, pp13-33, Raven Press, New York.

Holson JF, Stump DG, Pearce LB, Watson RE and DeSesso JM (2005).

Mode of action: yolk sac poisoning and impeded histiotrophic nutrition-HBOC-related congenital malformations.

Crit Rev Toxicol, 35:739-745.

堀井郁夫 and 進藤英俊 (2002).

トキシコキネティクス.

In:日本トキシコロジー学会教育委員会 編集, トキシコロジー, pp67-79, 朝倉書店, 東京.

Inouye M (1976)

Differential staining of cartilage and bone in fetal mouse skeleton by alcian blue and alizarin red S.

Congenit Anom (Kyoto), 16:171-173.

Kameyama Y (2001).

Prehistory of the Japanese teratology society: The pioneers of teratology in Japan and the founders of the society.

Congenit Anom (Kyoto), 41:22-30.

木原隆英 and 谷村孝 (2002).

生殖発生毒性.

In:日本トキシコロジー学会教育委員会 編集, トキシコロジー, pp157-175, 朝倉書店, 東京.

Knudsen TB (1997).

Cell Death.

In: Kavlock RJ and Daston GP eds, Drug Toxicity in Embryonic Development I, pp 211-244, Springer, Berlin.

Kojima I, Uchida T and Iida C (1988).

Pressurized microwave digestion of biological samples for metal determination.

Anal Sci, 4:211-214.

Lewis DR (1986).

Dopant materials used in the microelectronics industry.

Occup Med, 1:35-47.

McCord CP, Meek SJ, Harold GC and Heussner CE (1942).

The physiologic properties of indium and its compounds.

J Ind Hyg, 24:243-254.

三木明德 (1992).

哺乳類の全胚培養系における卵黄囊の役割.

組織培養, 18:105-108.

Nakajima M, Takahashi H, Sasaki M, Kobayashi Y, Awano T, Irie D, Sakemi K, Ohno Y and Usami M (1998).

Developmental toxicity of indium chloride by intravenous or oral administration in rats.

Teratog Carcinog Mutagen, 18: 231-238.

Nakajima M, Sasaki M, Kobayashi Y, Ohno Y and Usami M (1999).

Developmental toxicity of indium in cultured rat embryos.

Teratog Carcinog Mutagen, 19:205-209.

Nakajima M, Takahashi H, Sasaki M, Kobayashi Y, Ohno Y and Usami M (2000).

Comparative developmental toxicity study of indium in rats and mice.

Teratog Carcinog Mutagen, 20: 219-227.

Nakajima M, Takahashi H, Nakazawa K and Usami M (2007).

Fetal cartilage malformation by intravenous administration of indium trichloride to pregnant rats.

Reprod Toxicol, 24:409-413.

Nakajima M, Mitsunaga K, Nakazawa K and Usami M (2008a) .

In vivo/in vitro study in rat embryos on indium-caused tail malformations.

Reprod Toxicol, 25:426-432.

Nakajima M, Usami M, Nakazawa K, Arishima K and Yamamoto M (2008b).

Developmental toxicity of indium: Embryotoxicity and teratogenicity in experimental animals.

Congenit Anom (Kyoto), 48:145-150.

Nakase T, Nomura S and Yoshikawa H (1994)

Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing.

J Bone Miner Res, 9: 651-659.

Nau H (1986).

Species differences in pharmacokinetics and drug teratogenesis.

Environ Hlth Perspect, 70: 113-129.

Neubüser A, Balling R. Axial Skeleton (1997).

Drug Toxicity in Embryonic Development.

In: Kavlock RJ and Daston GP eds, Vol. I, Advances in Understanding Mechanisms of Birth Defects: Morphogenesis and Processes at Risk, pp77-112, Springer, Berlin.

New DAT (1990).

Introduction.

In: Copp AJ and Cockroft DL eds, Postimplantation mammalian embryos: a practical approach, pp1-14, Oxford University Press, Oxford.

Nishimura K (1974).

A microdissection method for detecting thoracic visceral malformations in mouse and rat fetuses.

Congenit Anom (Kyoto), 14:23-40.

Priscott PK, Gough PG and Barnes RD (1983).

Rat post-implantation embryo culture using heterologous serum.

Aust J Exp Biol Med Sci, 61: 47-55.

Qi BQ, Beasley SW and Arsic D (2004)

Abnormalities of the vertebral column and ribs associated with anorectal malformations.

Pediatr Surg Int, 20: 529-533.

Schardein JL (2000a).

Thalidomide: The prototype teratogen.

In: Chemically induced birth defects (3rd ed.), pp89-119, Marcel Dekker, New York.

Schardein JL (2000b).

Principles of teratogenesis applicable to drug and chemical exposure.

In: Chemically induced birth defects (3rd ed.), pp1-65, Marcel Dekker, New York.

東海林隆次郎 (1992).

In vitro 試験.

In: 谷村孝 編集, 毒性試験講座 11 発生毒性, pp331-342, 地人書館, 東京.

谷村孝 (1992).

生殖・発生毒性の歴史と定義.

In: 谷村孝 編集, 毒性試験講座 11 発生毒性, pp1-8, 地人書館, 東京.

Urist MR (1965).

Bone formation by autoinduction.

Science, 150:893-988.

US Food and Drug Administration (1980).

Federal Register, 45:69817-69838.

Ungváry G, Szakmáry E, Tátrai E, Hudák A, Náráy M and Morvai V (2000).

Embryotoxic and teratogenic effects of indium chloride in rats and rabbits.

J Toxicol Environ Hlth Part A, 59: 27-42.

Ungváry G, Tátrai E, Szakmáry E and Náráy M (2001).

The effect of prenatal indium chloride exposure on chondrogenic ossification.

J Toxicol Environ Hlth Part A, 62:387-396.

Venugopal B and Luckey TD (1978).

Toxicity of group III metal.

In: Venugopal B and Luckey TD eds, Metal toxicity in Mammals, Vol.2, pp116-121, Plenum Press, New York.

Warkany J & Roth CB (1948).

Congenital malformations induced in rats by maternal vitamin A deficiency.

II. Effect of varying the preparatory diet upon the yield of abnormal young.

J Nutr, 35:1-12.

Warkany J (1965).

Development of experimental mammalian teratology.

In: Wilson JG and Warkany J eds, Teratology: principles and techniques, pp1-11, University of Chicago Press, Chicago.

Wilson JG (1965).

Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals.

In: Wilson JG and Warkany J eds, Teratology: principles and techniques, pp262-277, University of Chicago Press, Chicago.

Yonemoto J and Kawagoe A (1992).

Limb bud cell culture for in vitro teratogen screening: validation study for

metals and related compounds.

Environ Sci, 1:127-135.

要旨

インジウムは周期律表のⅢbに属する金属で、産業的には金属の表面塗装、合金あるいはガラスの製造等に長期にわたって使用されてきた (Venugopal & Luckey, 1978) が、近年ではマイクロエレクトロニクス産業で多用されるようになり (Lewis, 1986)、レアメタルであることから液晶パネルの透明電導膜等からのリサイクル技術の開発が求められており、その詳細な安全性評価が必要である。インジウムを含む化合物は、実験動物において血液毒性、肺、肝臓、腎臓および心臓等に炎症性の変化や組織変性をきたすことが報告されている (McCord et al., 1942, Castronovo & Wagner, 1971)。しかしながら、インジウムの発生毒性に関する情報は極めて少なく、催奇形性の有無については明確でない。妊娠ハムスターにおいては、妊娠 8 日に硝酸インジウムを単回静脈内投与した場合、0.5 mg/kg 以上の投与量において、胚・胎児死亡率および胎子の外表奇形発生率の増加が認められている (Ferm & Carpenter, 1970)。一方、妊娠マウスにおいては、妊娠 6~15 日に塩化インジウムを反復経口投与すると、150 mg/kg 以上の投与量において、胚・胎児死亡率の増加が認められているが、催奇形性は報告されていない (Chapin et al., 1995)。ハムスターとマウスにおける実験結果の相違は、動物種差による感受性の違いによるものか、あるいは実験条件の違い (投与経路、投与期間および硝酸インジウムと塩化インジウムの違い) によるものか明らかではない。また、インジウムを含む化合物のラットに対する催奇形性に関する報告は、これまでにない。

そこで、本論文ではインジウムの発生毒性の特徴および毒性発現機序について詳細に検討した。まず、インジウムの発生毒性、特に催奇形性の有無をラットを用いて検討した。次に、ラット全胚培養実験およびトキシコキネティクス

実験により、インジウムの曝露濃度、曝露時間と発生毒性発現との関連を調べた。次に、ラットおよびマウスを用いてインジウムの発生毒性、特に催奇形性の動物種差について検討した。さらに、母体へのインジウム投与により誘発されるラット胎子の骨格ならびに尾部奇形の発現機序について検討した。なお、本論文ではインジウムとして塩化インジウム 4 水和物を使用した。以下、インジウムと略して記載し、投与量は塩化インジウム重量で記載した。

第 1 章では、インジウムの発生毒性、特に催奇形性の有無を明らかにするため、妊娠 9 日のラットにインジウムを静脈内または経口投与して、妊娠 20 日に胎子の発育ならびに形態を調べた。その結果、インジウムはラットに対して胚・胎子致死作用、胎子発育抑制作用、催奇形性等の発生毒性を示した。筆者の知る限りにおいて、インジウムのラットに対する催奇形性を明らかにした実験は本実験が初めてである。静脈内単回投与により奇形を誘発するインジウムの投与量は 0.4 mg/kg であり、主に尾部および指の外表奇形が認められた。一方、300 mg/kg を経口投与した場合、静脈内投与実験と同一の型の外表奇形が誘発されたが、その数は僅か（低頻度）であった。すなわち、インジウムの経口投与は、静脈内投与に比べ発生毒性が著しく弱いことが明らかとなった。

第 2 章では、ラット全胚培養実験系およびトキシコキネティクス実験系を用いて、インジウムの発生毒性について調べた。ラット全胚培養実験では、インジウムは 25~50 μM の濃度での曝露により、胚の日齢、曝露濃度および曝露時間に依存して胚毒性（胚致死作用、胚発育抑制作用）を示した。トキシコキネティクス実験における母体血清中のインジウム濃度は、ラット全胚培養実験で毒性のみられた 25~50 μM より 300 mg/kg の経口投与では低く、0.4 mg/kg を

静脈内投与した場合の母体最高血清中濃度は 55 μM であった。すなわち、*in vitro* で明らかに発生毒性を示す濃度は、発生毒性を示す *in vivo* の母体血清中濃度とよく一致していた。以上のことから、インジウムの発生毒性は受胎産物（胚あるいは卵黄嚢）に対する直接作用であることが示唆された。総曝露量（曝露濃度 \times 曝露時間）が等しい場合には、高濃度の曝露でより強い胚毒性が認められることから、インジウムの胚毒性は曝露時間に比べて曝露濃度により依存すると判断された。すなわち、インジウムの胚毒性が曝露濃度により強く依存していることから、第 1 章において明らかにした静脈内投与時と経口投与時のインジウムにおける発生毒性の強度の差は、胚の曝露濃度の差によるものと推論された。

第 3 章では、ラットおよびマウスを用いて、インジウムの発生毒性に種差があるか否かについて検討した。ラットでは 0.4 mg/kg のインジウムを妊娠 9、10 または 11 日に単回静脈内投与し、妊娠 20 日に胎子を観察した。マウスでは 0.8 および 1.6 mg/kg のインジウムを妊娠 7、8 または 9 日に単回静脈内投与し、妊娠 18 日に胎子を観察した。その結果、ラットでは胚・胎子死亡が 21.2~35.2%、外表奇形（主に尾の奇形）が 60.9~99.0% 出現し（対照群は 4.1 および 0%）、第 1 章の実験結果が再現された。一方、マウスでは胚・胎子死亡が 0.8 mg/kg 投与で 9.0~19.5%、1.6 mg/kg 投与で 36.9~100% 出現し（対照群は 4.8%）、インジウム投与量に依存して胚・胎子死亡が増加したが、胎子外表奇形は殆ど観察されなかった（0~1.5%）。以上の結果から、器官形成期に投与されたインジウムは、ラット及びマウスに対して胚・胎子毒性（胚・胎子致死作用、胎子発育抑制作用）を及ぼすことから、両者はインジウムに対して感受性を有するが、インジウムの催奇形性（胎子の外表奇形誘発作用）に注目すると、マウス

はラットに比べ感受性が低いことが明らかになった。

第4章では、インジウムにより誘発されるラット胎子骨格奇形発現機序を検討するために、妊娠10日のラットにインジウムを静脈内投与して、妊娠21日における胎子の骨および軟骨の形態を骨・軟骨二重染色法により調べた。妊娠10日ラットへインジウム0.3 mg/kgを投与すると、胎子の骨および軟骨の著しい形態異常が誘発された。中軸骨格の奇形は軟骨の奇形を伴っていた。中軸骨格および四肢の長骨は間葉由来の軟骨からの置換により形成されることを踏まえ、母体へのインジウム投与によって誘発される胎子軟骨の形成異常が胎子骨格奇形発現の一因となっていることが示唆された。

第5章では、*in vitro* および *in vivo* 実験により、インジウムによるラット胎子尾部奇形の病態形成機序を検討した。*in vivo* 実験では0.4 mg/kgのインジウムを妊娠10日のラットに静脈内投与し、妊娠11、12または13日に胚を観察した。*in vitro* 実験では妊娠10日のラット胚を50 μ Mのインジウムを含むラット血清で24時間培養あるいは、その後インジウムを含まない血清でさらに24時間培養した。*in vivo* 実験ではインジウム投与群において尾部の低形成が胎齢11日から認められ、また、胎齢11日胚において尾芽にナイルブルー陽性細胞が認められた。この所見は*in vitro* 実験で再現された。培養24時間後の胚（胎齢11日に相当）の尾部にアポトーシス（TUNEL陽性細胞）が確認され、48時間後（胎齢12日に相当）に尾部の発育阻害が認められた。従って、インジウムにより誘発されるラット胎子尾部奇形（曲尾、短尾、無尾）は、アポトーシスが增加することによって細胞死が多く誘発され、その結果として尾芽の形成が抑制される可能性が示唆された。

第 6 章では、妊娠ラットにインジウムを投与した場合に発生する胎子尾部の奇形の発現に関与している因子を明らかにするため、妊娠 9 日のラットに 0.2 mg/kg あるいは 0.4 mg/kg のインジウムを静脈内投与し、妊娠 17 および 19 日の胎子尾部における BMP-4 (Bone Morphological Protein-4) mRNA の発現を調べた。胎齢 17 日において BMP-4 mRNA 発現量はインジウムの投与用量に依存して減少したことから、インジウム投与は、尾部における BMP-4 mRNA 発現量を減少させたと考えられた。また、BMP-4 mRNA 発現量は、対照群と 0.2 mg/kg 群との間では有意差はなく、0.2 mg/kg 投与群と 0.4 mg/kg 投与群との間の発現量に有意差が認められたことから、本実験条件下において胎子尾部の BMP-4 mRNA 発現を阻害するインジウムの投与量は 0.4 mg/kg 以上であることが明かとなった。しかし、胎齢 19 日の 0.4 mg/kg 群の胎子尾部における BMP-4 mRNA 発現量は、対照群の値と比較して有意に増加していた。インジウム投与群の尾部の BMP-4 mRNA 発現量が過剰になるということは、胎齢 17 日では抑制されていた骨形成が、胎齢 19 日では BMP-4 mRNA の発現を回復させることによって、骨形成の遅れを取り戻そうという作用が働いた可能性が示唆された。

以上の結果から、インジウムの発生毒性の特徴および毒性発現機序について

- ・ インジウムはラットにおいて、胚・胎子致死作用、胎子発育抑制作用、催奇形性等の発生毒性を示す、
- ・ インジウムの発生毒性は、受胎産物（胚あるいは卵黄嚢）に対する直接作用である、
- ・ インジウムの胚致死作用および胚発育抑制作用は、曝露時間に比べて曝露濃度により依存することが示唆される、

- ・ インジウムはマウスに対してもラットと同様な胚・胎子致死作用および胎子発育抑制作用を及ぼすが、催奇形性に注目すると、マウスはラットに比べ感受性が低い、
 - ・ インジウムにより誘発される胎子軟骨の形成異常がラット胎子骨格奇形発現の一因となっていることが示唆される、
 - ・ インジウムにより誘発されるラット胎子尾部奇形（曲尾、短尾、無尾）は、アポトーシスが増加することによって細胞死が多く誘発され、その結果として尾芽の形成が抑制される可能性が示唆される、
 - ・ 妊娠9日ラットへ催奇形性量のインジウムを投与すると、胎齢17日の胎子尾部における BMP-4 mRNA 発現が阻害されたことから、BMP-4 mRNA は尾部奇形発現に関連する因子である可能性が示唆される、
- ことが明らかとなった。

ABSTRACT

Developmental toxicity of indium

By Mikio Nakajima

Indium, a precious metal classified in group 13 (IIIb) in the periodic table, is widely distributed in nature in very minute quantities. In industry, it has been used for surface protection of metals or alloys and for manufacture of glass (Venugopal & Luckey, 1978) and is increasingly used as a dopant material in the microelectronic industry (Lewis, 1986). It has been shown that exposure to various indium compounds induces hemorrhagic lesions or inflammatory and degenerative changes in the lung, liver, kidney and heart in laboratory animals (McCord et al., 1942, Castronovo & Wagner, 1971).

The results of teratogenicity studies of indium, however, are inconclusive. In hamsters, the intravenous administration of indium nitrate causes a high incidence of malformations of the digits in the fetuses (Ferm & Carpenter, 1970). In mice, on the other hand, the oral administration of indium trichloride to pregnant animals caused fetal death, but no increase in fetal

malformations (Chapin et al., 1995). It is uncertain that this discrepancy is due to the species difference or to the differences in the test conditions, i.e., routes and periods of administration and chemical forms of indium.

In the present study, developmental toxicity of indium was examined with reference to its possible pathogeneses and mechanisms. The present study is composed of 6 chapters.

Chapter 1

Pregnant rats were treated with single intravenous or oral administration of indium trichloride on day 9 of pregnancy, and their fetuses were examined for growth and malformation on day 20 of pregnancy. By intravenous administration, fetal weight was significantly decreased and the incidences of fetal mortality and malformation were significantly increased at 0.4 mg/kg. Fetal malformations of the tail and digits, e.g., kinked tail, brachyury and olygodactyly, were observed at high incidences. By oral administration, similar tendencies in the fetal effects were observed, but there were no significant differences compared to the control even at 300 mg/kg. It was concluded from these results that indium had teratogenicity

in rats. Oral treatment with indium may be developmentally toxic at 300 mg/kg, but this is difficult to state with certainty given the limited number of animals that were used in this study.

Chapter 2

Developmental toxicity of indium was examined using rat embryo culture with reference to toxicokinetics. Rat embryos at day 9 of pregnancy were cultured for 48 hr under various exposure conditions to indium. Indium was toxic to cultured rat embryos at 25-50 μM , depending on the exposure concentration more than the exposure time. Indium concentration in the serum of pregnant rats was determined for 6 hr after intravenous (0.4 mg/kg) or oral (300 mg/kg) administration of indium trichloride. After the intravenous administration, indium concentration in the serum was 55 μM , which is comparative to the toxic concentration in cultured embryos, and exponentially decreased. After the oral administration, indium concentration detected in the serum was lower and relatively constant around 13 μM . It was considered from these results that developmental toxicity of indium is a direct effect on the embryo or yolk sac and that weak

developmental toxicity of indium by oral administration was due to low exposure concentrations in the embryo.

Chapter 3

The developmental toxicity of indium was examined in both rats and mice using comparable experimental protocols. Pregnant rats received a single intravenous administration of indium trichloride at 0.4 mg/kg, on day 9, 10 or 11 of pregnancy and their fetuses were examined on day 20. Pregnant mice were treated in the same manner at 0.8 or 1.6 mg/kg on day 7, 8 or 9 of pregnancy and their fetuses were examined on day 18. In rats, indium caused fetal weight decrease and fetal external malformations, such as brachyury, kinked tail, cleft palate and oligodactyly, most severely by the administration on day 10. In mice, however, indium did not cause fetal external malformations, although it caused fetal weight decrease at 0.8 mg/kg or more and fetal death at 1.6 mg/kg most severely by the administration on day 8. It was concluded from these results that rats and mice were susceptible to the embryotoxicity of indium at similar developmental stages in the early organogenetic period, but mice were less

susceptible to the teratogenicity of indium than rats in terms of external malformation. Toxicokinetic factors may be involved in this different susceptibility.

Chapter 4

The effects of indium on bone and cartilage development in rat fetuses were examined. Pregnant rats were treated with indium trichloride (0.1, 0.2, or 0.3 mg/kg) by single intravenous administration on day 10 of pregnancy, and their fetuses were examined on day 21. Half of each litter was prepared for skeletal examinations using a skeletal double-staining technique to allow evaluation of cartilage as well as bone. Dose-related increased incidences of external and skeletal fetal malformations occurred at doses of 0.2 mg/kg or more. The incidences of cartilage malformations in the vertebrae, ribs and forepaw phalanges were significantly increased at 0.3 mg/kg. Malformations of the axial bone were accompanied by cartilage malformations. It was concluded from these results that indium produced cartilage malformations that were considered to be the underlying cause for the majority of fetal skeletal malformations observed in rats in this study.

Chapter 5

Pathogenesis of indium-caused tail malformations was investigated by *in vivo* and *in vitro* experiments. In the *in vivo* experiment, pregnant rats received single intravenous administration of indium trichloride at 0.4 mg/kg on day 10 of pregnancy, and their embryos were examined on days 11, 12 and 13. Embryos in the indium group showed caudal hypoplasia from day 11. Increased apoptosis was observed in their tailbud on day 11. Similar effects were observed in the *in vitro* experiment, when day 10 rat embryos were cultured in the presence of indium at 50 μ M for 24 hr and for further 24 hr in the absence of indium. It was considered from these results that caudal hypoplasia probably due to excessive cell loss by increased apoptosis in the tailbud accounted for indium-caused tail malformations in rat fetuses, and that indium-caused embryotoxic effects were direct effects on the conceptus.

Chapter 6

We focused our attention on malformations developing in the tail of

fetuses of indium-administered, pregnant rats, and examined the changes in the level of BMP-4 mRNA expression in the fetal tail. Pregnant rats were treated with single intravenous administration of indium trichloride (0.2, 0.4 or 0.6 mg/kg) on day 9 of pregnancy, and their fetuses were examined on days 17 and 19. The expression levels of BMP-4 mRNA in the fetal tail on day 17 in the 0.4 and 0.6 mg/kg groups were significantly lower than in the control group. However, the BMP-4 mRNA expression level in the fetal tail on day 19 was significantly higher in the 0.4 mg/kg than in the control group. In this experiment, the BMP-4 mRNA expression level on day 17 decreased in an indium dose-dependent manner, suggesting that the reduced BMP-4 mRNA expression in the tail is due to the effect of indium administration. The BMP-4 mRNA expression level on day 19 was significantly higher in the 0.4 mg/kg than in the control group, which appears to contradict the results on day 17. However, BMP-4 and receptor mRNA were reported to be overexpressed in the process of bone regeneration after fracture, thereby promoting bone regeneration. Thus, we speculate that BMP-4 mRNA became overexpressed in the tails of fetuses from indium-administered rats on day 19 to reverse the suppressed bone

regeneration on day 17.