

- スクリーニング試験法、測定法、毒性試験
:In vivo 系を用いた暴露試験による評価,
日本臨床、58、12、121-127, 2000
- 8) 菅野 純 内分泌かく乱化学物質の生物影響
ファルマシア 3月号,35:219-223,1999
- 9) 菅野 純 内分泌攪乱化学物質について-
生物学的立場から- 有機合成化学協会誌
57(1):35-39,1999
- 10) 菅野 純 内分泌かく乱化学物質につい
て-生物影響の立場から- (特別講演の
抄録)ビルと環境 84:10-15,1999
- 11) 菅野 純 内分泌攪乱のメカニズムを考慮
した生物試験 医学のあゆみ
190(7-8):751-752,1999
2. 学会発表
- 1) Kanno J, Kato H, Inoue T, Uterotrophic
effect of dietary genistein/daidzein-
Modification of NIH-07open formula-
Hormones and Endocrine Disrupters in Foo
d and Water: Possible Impact on Human
Health Copenhagen, Denmark, 27-30
May 2000
- 2) Kimie Sai , Jun Kanno, Tohru Inoue, and
Toyozo Kaneko, Effects of TCDD on GJIC
and cell growth in v-ras-transfected
rat liver epithelial cells. Dioxin 2000,
August 13-17, 2000
- 3) Jun Kanno, Kimie Sai, Ryuichi Hasegawa,
James. E. Trosko and Tohru Inoue,
Prevention of the down-regulation of gap
junctional inter-cellular communication
by green tea in the liver of mice fed
pentachlophenol. The 2nd Congress of
Asian Society of Toxicology ASIATOX II,
August 23-25, 2000
- 4) A. Ono, J. Kanno and T. Inoue, Confor-
mational changes on ERα induced by endo-
crine disrupting chemicals (EDCs).
Keystone symposia, 2000
- 5) 佐井君江、菅野 純、黒川 雄二、井上
達:Pentachlorophenol の肝培養細胞におけ
るアポトーシス阻害作用ならびにギャップ結
合細胞間連絡阻害との関連: 第 58 回日本
癌学会総総会、広島(平成 11 年9月 29 日
-10 月 1 日)
- 6) 平林容子、高木篤也、児玉幸夫、菅野
純、黒川雄二、井上達:Mn-SOD 遺伝子導
入マウス骨髄細胞での紫外線抵抗性:第 58
回日本癌学会総会、広島(平成 11 年9月
29 日-10 月 1 日)
- 7) 松島裕子、菅野 純、宮城恵理、井上 達、
卵巣摘出ラットにおけるエストロゲン枯渇期間
と子宮肥大反応の関係について、日本内分泌
攪乱化学物質学会第2回研究発表会 1999
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

細胞接着分子に対する影響とプロモーター作用

— in vitro ギャップ結合細胞間連絡阻害機構を指標として —

分担研究者 井上 達

国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

研究協力者 佐井 君江

研究要旨

ダイオキシンの持つ発がん性の機構の解明の一貫として、p53 遺伝子欠失マウスや TG/AC マウス (変異型 ras、v-Ha-ras の遺伝子導入マウス) などの遺伝子組み換えマウス由来の初代培養系を用いて、発がんプロモーション作用の in vitro 培養系での表現系の一つである細胞間連絡(ギャップ・ジャンクション)機構の阻害作用を、ラット肝由来の WB 細胞を用いた scrape loading/dye transfer 法により、既知の肝発がんプロモーター物質で GJIC 作用ならびにその機構解析に関するギャップ結合蛋白のリン酸化、発現量、細胞内局在性に対する変化を調べた。その結果、本研究の基盤となる in vitro での GJIC 解析を指標とした実験系が、ダイオキシン類化合物の発がんプロモーター作用機構の解明において、有用であることを示唆する結果が得られた。

A. 研究目的

本研究は、発がんプロモーター作用の in vitro 培養系での表現系の一つとされているギャップ結合細胞間連絡(GJIC)阻害作用、ならびにギャップ結合蛋白のリン酸化や遺伝子発現等を指標として、ダイオキシン類化合物の作用機序を解明し、分子レベルでの標的を明らかとすることを方針としている。本研究の基盤をなす in vitro の GJIC 解析法の確立のため、ラット肝由来の WB 細胞を用い、既知の肝発がんプロモーター物質による GJIC 阻害作用及びその機構に関わるコネクシンの発現量、リン酸化、細胞内局在性に対する変化を調べた。

【背景】

80 年代後半における発がん研究のトピックとして、Ames テストでは検出されないいわゆる non-mutagenic carcinogen の発がん機序の問題が議論されていたが、我々はその機構の要因として、これまで酸化的ストレスの関与について注目してきた。そのなかで、マウス肝発がん性の pentachlorophenol (PCP) が、標的臓器において酸化的 DNA 損傷を誘導し、またこれと肝の細胞増殖作用が伴って観察された。またこれらは抗酸化物質の投与によって抑制されることから、この発がん過程に、代謝産物 tetrachloro-hydroquinone (TCHQ) の酸化過程で生じるラジ

カル種の関与を推測した。さらに PCP による発がんの特性を調べるため、2 段階発がん性試験を実施したところ、PCP には肝発がんプロモーター作用のあることが明らかとなった。このものによる発がんプロモーター作用の分子機構の解明を進めるため、我々は近年発がんプロモーター作用との関連性が広く認識されつつある GJIC 阻害作用の解析が有用であると考え、その阻害の分子機序について *in vitro* 培養系で検討することとした。

B. 研究方法

【PCP による肝培養細胞の GJIC 阻害作用】 GJIC は多細胞生物の細胞間相互の情報交換の上で、重要な生理的機能をもつものとされている。このものの阻害と発がんプロモーター作用との関連は、1979 年の Dr. Trosko らによる、発がんプロモーター物質による細胞間代謝共同阻害作用の発見を機に、これまで多くの実験において示唆されてきた。この阻害がいわゆる epigenetic な作用で起こる点で、この阻害機構の検討がプロモーター機序の解明に有用と考えられる。

そこで本実験では、PCP および代謝産物 TCHQ の GJIC 阻害作用を、肝細胞由来の WB 細胞を用いて scrape loading/dye transfer (SL/DT) 法により検討し、また GJIC 機能に関連するコネクシンの発現量、リン酸化ならびに細胞膜局在性に対する影響を調べた。

C. 研究結果及び D. 考察

1) PCP による GJIC の経時変化及び濃度依存的阻害

PCP (40 μ M) の処理により WB 細胞の GJIC は 4 時間後に約 40% 阻害され、6~8 時間後に回復が見られたが、16~24 時間後に再び約 40% 減少した。PCP 処理 4 時間後には 20 μ M から、24 時間処理では 10 μ M から濃度依存的な GJIC 阻害が認められた。また PCP 除去後の GJIC は、4 時間処理の場合は 1~2 時間までに、24 時間処理では 4~6 時間後までにコントロールレベルまで回復した。

2) PCP による CNX43 のリン酸化、発現量及び局在性への影響

CNX43 のリン酸化状態は、PCP 処理 (4~24 時間) により変化が見られなかった。CNX43 発現量は 24 時間後に減少傾向が認められたが、GJIC の経時変化と発現量との関連は明らかではなかった。PCP 処理 (4~24 時間) により、CNX43 の細胞膜局在性には変化がなかった。

3) TCHQ による GJIC への効果

TCHQ 処理では GJIC の阻害作用は認められなかった。

以上の結果から、培養肝細胞の GJIC は、代謝産物の処理では影響が見られなかったが、PCP そのものにより可逆的に阻害されることが明らかとなり、この作用がプロモーター機序に深く関与しているものと推測された。またその阻害には、CNX43 のリン酸化および細胞膜上での発現には影響のない機序によることが示唆された。

E. 結論

本年度の肝発がんプロモーター物質を用いた実験により、本研究の基盤となる

in vitro での GJIC 解析を指標とした実験系が、ダイオキシン類化合物の発がんプロモーター作用機構の解明において、有用であることを示唆する結果が得られた。

F. 研究発表

1) Sai, K., Upham, B. L., Kang, K.S., Hasegawa, R., Inoue, T., Trosko, J.E. (1998) Inhibitory effect of pentachlorophenol on gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells in vitro. Cancer Lett., 130, 9-17.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. 実用新案登録
なし

厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)
分担研究総合報告書

細胞接着分子に対する影響とプロモーター作用
TCDD によるギャップ結合細胞間連絡(GJIC)阻害と細胞増殖作用
～変異型 Ras 導入細胞に対する作用特性～

分担研究者 佐井 君江 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

研究要旨

TCDD 類の発がんプロモーター作用機構解明の一環として、TCDD による肝培養細胞株の GJIC 阻害性・細胞増殖を指標に、本年度は、GJIC 阻害における Ras 蛋白の関与、ならびに変異型 ras 導入細胞におけるそれらの増強性を検討した。野生型細胞では TCDD により一過性の GJIC 阻害が起こり、その後 Ras の誘導と関連した細胞増殖が引き続いた。変異型 ras 導入細胞は、元来 GJIC が低く、TCDD により著しい細胞増殖が起きた。このことから、TCDD による増殖シグナルは、ras の活性化と GJ 機能の低下した細胞において、特に増強されることが示唆された。

A. 研究目的

TCDD の発がんプロモーター作用機構の理解の上で、GJIC 阻害機構の解析が有効であると考えられる。TCDD による GJIC 阻害機構は不明であるが、TCDD には、GJIC 阻害要因となる Ras 蛋白の誘導能のあることが知られる。一方、v-Ha-ras 遺伝子導入マウス(Tg/AC)は、TCDD による皮膚発がん好発性であることが知られる。この TCDD に対する発がん高感受性には、①Ras 蛋白の活性化による GJIC の低下、②TCDD による GJIC 阻害の増強、③引き続く細胞増殖の亢進が、この現象の要因として関与している可能性が考えられる。

そこで、本研究では、上記の仮説をラット肝培養細胞株を用いた in vitro 培養系で検討する。すなわち、変異型 ras 導入細胞では TCDD による GJIC 阻害ならびに細胞増殖作用が、野生型細胞に比較し増強されることを明らかとする。

B. 研究方法

ラット肝由来の細胞株(WB 細胞)を野生型細胞として用いた。変異型 ras 導入細胞としては、v-Ha-ras を導入した WB 細胞株(WB-RAS2a

細胞)の培養過程で得られた、表現系の変化した(spindle 型)細胞株(以下、WB-RAS と略する)を用いた。それぞれの細胞を 5% ウシ胎児血清存在下で confluent まで培養後、TCDD(～10 μM)を添加し、72 時間後までの GJIC (scrape loading/dye transfer assay; SL/DT 法)、細胞増殖(DNA content)、pan-Ras の誘導(Western blotting)、MAPK(Erk)活性(Western blotting)について解析した。

C. 研究結果

実験1. TCDD による WB 細胞の GJIC 阻害と細胞増殖

変異型 ras 導入細胞との比較における基礎データとして、野生型細胞の GJIC 及び細胞増殖に対する TCDD の作用様式を検討した。ここでは特に Ras 蛋白誘導性との関連に着目した。

1) GJIC 阻害の時間経過

WB 細胞への TCDD 処理 24 時間までの時間経過を SL/DT 法で解析した結果、GJIC 阻

害が処理1時間後に起こり、その回復後に再度12時間後以降を中心に阻害が見られ、24時間後においては濃度依存的な阻害効果が観察された(Fig.1)。しかしそれ以降には回復傾向にあった。

2)細胞増殖作用

TCDD(1~5 μ M)処理では、48時間以降より濃度依存的な増殖性が見られ、72時間後の5 μ M処理により、DNA量はコントロールの1.4倍に増加した。

3) Ras 蛋白の誘導および MAPK(Erk)活性化

24時間以降より Ras 蛋白の有意な誘導が検出された。72時間後には濃度依存的な誘導が確認された。

実験2. TCDD による WB-RAS 細胞の GJIC 阻害及び細胞増殖作用

次に、WB-RAS 細胞に対する TCDD の GJIC 阻害、細胞増殖作用が、WB 細胞より顕著である可能性を検討した。またその要因に、TCDD による Ras の誘導能、MAPK(Erk)活性化の増強が関与するかについて解析した。

1) GJIC への作用

spindle 型の形態に変化した WB-RAS 細胞では、既に GJIC がほぼ消失していたが、TCDD(~5 μ M)処理により、48時間以降よりオリジナルの WB-RAS2A 細胞様の形態へと変化し、これに伴い、GJIC もオリジナル WB-RAS2A のレベルに近い値に回復した。WB 細胞では、72時間後には GJIC 阻害は見られず、それに対して WB-RAS 細胞では、回復があるものの WB 細胞の 50%以下の低値が持続した(Fig.2)。

2)細胞増殖作用

TCDD の 72 時間処理後で比較した場合、

WB 細胞では TCDD(5 μ M)処理で DNA 量の増加率が 1.2 倍であるのに対し、WB-RAS 細胞では約 4 倍の増加が認められた(Fig.3)。

3)Ras の誘導ならびに MAPK(Erk)の活性化
pan-Ras の誘導能については、TCDD 処理 72 時間後において、WB-RAS 細胞と WB 細胞には有意な差は認められなかった。

MAPK(Erk)の活性は、WB-RAS 細胞ならびに WB 細胞ともに、TCDD 濃度依存的な上昇が見られたが、定常レベルの活性が、WB-RAS 細胞では WB 細胞より 3 倍以上高く、TCDD 処理により相加的な上昇が見られた(Fig.4)。

D. 考察

論文報告によると、WB 細胞では、TCDD の 48 時間処理後においては GJIC 阻害が起こらないとされており、これには AhR の欠如が要因であると推測されていた。しかし、本実験に際し、我々は WB 細胞に AhR が発現していることを RT-PCR 法で確認し、また 24 時間以内に軽度ではあるが、GJIC 阻害が起こることを見出した。また、これに引き続き細胞増殖が起こることも確認し、これには Ras 蛋白の誘導、それに引き続く MAPK 活性化の関与を示唆する結果が得られた。しかしながら、Ras-MAPK 経路の活性化は、一過性の GJIC 阻害機構には関与していないものと考えられた。

TG/AC マウスでの TCDD による発がん好発性要因として、変異型 ras 発現組織においては、TCDD による GJIC 及び細胞増殖がより顕著に起きている可能性がある。WB-RAS の GJIC は、表現系の変化(spindle 型細胞)に伴いほとんど消失していた。しかし、原因は不明であるが、TCDD により形態ならびに GJIC は、オリジナルの v-ras 導入細胞株(WB-RAS2a)様に回復した。しかしながら、GJIC は野生型 WB 細胞より有意に低値を持続していた。細胞増殖性については、WB-RAS 細胞は WB 細胞より顕著であることが証明された。この現

象には、定常的な低レベルの GJIC ならびに MAPK 経路の活性化が、TCDD による増殖シグナルの促進に有利に働いたためと推測される。

E. 結論

本研究において、変異型 ras 導入細胞では TCDD による細胞増殖が、野生型細胞より顕著であることが明らかとなった。これには、定常的な低いレベルの GJIC ならびに活性化した MAPK 経路が、TCDD による増殖シグナルの促進に寄与したものと推測される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 佐井君江: 緑茶の肝発がん抑制過程における生物学的諸変化. 放射線科学, 42, 113-119 (1999)
- 2) T.Umemura, S.Kai, R.Hasegawa, K.Sai, Y.Kurokawa, G.M.Willoams. Penta chloro phenol (PCP) produces liver oxidative stress and promotes but does not initiate hepatocarcinogenesis in B6C3F1 mice. Carcinogenesis, 20, 1115-1120 (1999).

2. 学会発表

- 1) K.Sai; Green tea: Its biologically suppressing effects during the hepatocarcinogenesis induced by pentachlorophenol -A possible implication for interaction of green tea components with endocrine disruptors- The 5th International Symposium on green Team Seoul, Korea (May 7, 1999)
- 2) K.Sai, B.L.Upham, K.-S. Kang, R. Hasegawa, J.E.Trosko, T.Inoue: Penta chlorophenol inhibits gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells. 1999 International Gap junction Conference Gwatt,

Switzerland (August 28 ~ September 2, 1999)

- 3) 佐井君江, 菅野 純, 黒川 雄二, 井上 達: Pentachlorophenol の肝培養細胞におけるアポトーシス阻害作用ならびにギャップ結合細胞間連絡阻害との関連: 第 58 回日本癌学会総会、広島(平成 11 年 9 月 29 日 ~ 10 月 1 日)
- 4) K.Sai, J.E.Trosko, T.Inoue: Pentachlorophenol-induced down-regulation of gap junctional intercellular communication was ameliorated by (-)-epigallocatechin gallate in rat liver epithelial cells. Epigenetic Toxicant-Induced Signal Transduction and Altered Cell-Cell Communication, Ann Arbor, Michigan (October 17 - 20, 1999)
- 5) B.L.Upham, G.Chen, A. Voges, K. Sai, J.E. Trosko: The inhibition of gap junctional intercellular communication and the activation of MAPK by methylated anthracenes with specific structures. Epigenetic Toxicant-Induced Signal Transduction and Altered Cell-Cell Communication, Ann Arbor, Michigan (October 17 - 20, 1999)
- 6) B.L.Upham, K.Sai, P.K.Tithol, G.Chen, W.R.Wilson, J.E.Trosko: Inhibition of gap junctional intercellular communication, activation of MAPK, and the release of arachidonic acid by specific isomers of methylated anthracenes. Society of Toxicology 39th Annual Meeting, Philadelphia, Pennsylvania (March 19 - 23, 2000)

アрилハイドロカーボン(ダイオキシン)受容体の機能調節に関する研究

分担研究者 藤井 義明 東北大学大学院理学研究科教授

研究要旨

アрилハイドロカーボン受容体(AhR)のこの3年間の研究は主に3つの成果にまとめられると考えている。すなわち1) AhR の欠失マウスを用いた実験でベンツピレンによる発癌に AhR が関与していることを証明したこと、2) AhR による標的遺伝子に AhR の活性を抑制する AhRR(AhR repressor)があることを示し、AhR の働きにフィードバック阻害の調節機構が働いていることを示したこと、3) CYP1A2 の誘導的発現メカニズムの研究から AhR/Arnt ヘテロ2量体はコアクチベーターとしても働くことが出来ることを明らかにしたこと、である。

A. 研究目的

ダイオキシンなどの多環性芳香族化合物が生体で働くメカニズムは低濃度の場合には殆ど AhR を介して生物作用を示すと考えられる。従って、AhR 欠失マウスでの機能失損や AhR の機能調節のメカニズムを明らかにすることがダイオキシンなどの外来異物の生物作用発現のメカニズムの理解に直接つながると考えて研究を行った。

B. 研究方法

1) 作製した AhR 欠失マウスを用いて皮下注射あるいは皮膚に塗布して発癌性を観察する(東大・院・医、石川教授のグループと共同研究)。2) 得られている AhR に類似性の高い cDNA を発現ベクターに挿入して、培養細胞に発現させ、その機能を測定する。cDNA をプローブにして遺伝子クローンを単離する。3) AhR の欠失マウスにおいて CYP1A2 の発現は CYP1A1 の発現と違って構成的発現は保たれている。CYP1A2 のプロモーター領域を CAT あるいは luciferase 遺伝子に結合してレポーター遺伝子を作製して、培養細胞に導入し、CYP1A1 遺伝子との発現機構の違いを明らかにする。

C. 研究成果及び D. 考察

1) ベンツピレンの皮下投与あるいは塗布による発癌性の実験 AhR^{+/+}、AhR^{+/-}、AhR^{-/-}マウスにベンツピレンを投与して、癌の発生を観察した。

その結果皮下注射による投与では AhR^{+/+}、AhR^{+/-}マウスでは17週目にベンツピレンを投与したすべてのマウスに癌の発生が見られたが、AhR^{-/-}マウスでは癌の発生は全く見られなかった。発生した癌は、殆どがフィブrosarcomaであった。皮膚表面への塗布でも癌の発生はやや遅れるが、結果は皮下注射の場合と全く同様であった。皮膚における CYP1A1 と CYP1A2 の発現を PCR で測定すると CYP1A2 の構成的発現は観察されたが CYP1A1 の発現は認められなかった。この事実はベンツピレンの代謝的活性化は CYP1A1 によって触媒されることを示している。

2) AhRR は Arnt とヘテロ2量体を形成して XRE に結合して AhR の転写活性を抑制することを示した。また、この阻害の一部はトリコスタチンによって解消されることから Histone deacetylase によることが示唆された。AhRR 遺伝子をクローニングしてプロモーター付近の構造を解析した。その結果 XRE 配列が存在することが確認された。プロモーター配列を luciferase 遺伝子に結合し、レポーター遺伝子を作製して、HeLa 細胞などに導入して、そのプロモーター活性を測定したところ、メチルコラントレン存在下に AhR と Arnt によって、その発現が誘導されることが確認された。この結果は AhR による遺伝子発現にはフィードバック阻害の調節機構が働いていることを示している。マウスの生体でメチルコラントレンによる AhRR の発現を検討した結果、心臓、

肺には発現するが肝、胸腺には殆ど発現しないことが分かった。

3) CYP1A2 遺伝子の発現を検討するためにそのプロモーター領域をクローニングして、CAT 遺伝子に結合してレポーター遺伝子を作製した。レポーター遺伝子を Hep3B に導入して、プロモーター活性を測定した結果、遺伝子の上流 2Kb に誘導的発現に関わるエレメントを同定した。そのエレメントに点変異を導入して、誘導的エンハンサー配列 CATG N₆ CTTG(XRE2) を決定した。核抽出物を用いてゲル易動度シフト法によってこの配列に結合する因子を探索した結果、この DNA に結合する因子(X)は細胞核にかなり普遍的に存在し、AhR/Arnt は直接にこの配列に結合することは出来ないが、X への結合を介して、結合することが示された。DEAE セルロース、ヘパリンセファロース、XRE2 DNA をラテックスビーズに結合したアフィニティーカラムクロマトグラフィーによって精製した。精製標品は 63KD と 64KD の主成分のバンドと 68KD、58KD の副成分から成っていることがアクリルアミド電気泳動で示された。主成分のプロテアーゼ消化による限定分解と HPLC によってペプチドを分離し、部分アミノ酸配列を決定した。現在、その cDNA を単離、発現ベクターを構築して AhR/Arnt との相互作用など機能の検討を行っている。

E. 結論

ダイオキシンによる生体毒発現において AhR は奇型の誘導や発癌に関与していることを AhR 欠失マウスを用いて明らかにすることができた。他のグループによって AhR は肝毒性、胸腺縮退にも関与していることなどが示されて来ているので、AhR はダイオキシンの毒性発現の殆どすべてに関与していることが推測される。AhR/Arnt による遺伝子発現系にフィードバック阻害の調節機構が働いていることや誘導的エンハンサーXRE に直接結合して遺伝子発現を活性させる機構の他に、Ah/Arnt ヘテロ2量体はコアクチベーターとしても働く機構が存在していることを発見した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Zhang, W., Shields, J.M., Sogawa, K., Fujii-Kuriyama, Y. & Yang, V.W. The gut-enriched kr pel-like factor suppresses the activity of the CYP1A1 promoter in an Sp1-dependent fashion. *J. Biol. Chem.*, 273,17917-17925 (1998)
- 2) Takahata, S., Sogawa, K., Kobayashi, A., Ema, M., Mimura, J., Ozaki, N. & Fujii-Kuriyama, Y. Transcriptionally active Heterodimer formation of an Arnt-like PAS protein, Arnt3, with HIF-1^{*}, HLF, and clock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 248,789-794 (1998)
- 3) Sogawa, K., Numayama-Tsuruta, K., Ema, M., Abe, M., Abe, H. & Fujii-Kuriyama, Y. Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activity by nitric oxide donors in hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95, 7369-7373 (1998)
- 4) Zheng, Y-M., Fisher, M.B., Yokotani, N., Fujii-Kuriyama, Y. & Rettie, A.E. Identification of a meander region proline residue critical for heme binding to cytochrome P450: Implications for the catalytic function of human CYP4B1. *Biochemistry*, 37, 12847-12851 (1998)
- 5) Wang, F., Gao, J-x., Mimura, J., Kobayashi, A., Sogawa, K. & Fujii-Kuriyama, Y. Structure and Expression of the Mouse AhR Nuclear Translocator (mArnt) Gene. *J. Biol. Chem.*, 273, 24867-24873 (1998)
- 6) Mimura, J., Ema, M., Sogawa, k. & Fujii-Kuriyama, Y. Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev.*, 13, 20-25 (1999)
- 7) Ema, M., Hirota, K., Mimura, J., Abe, H., Yodoi, J., Sogawa, K. Poellinger, L. & Fujii-Kuriyama, Y. Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1^{*} in response to hypoxia: their stabilization and redox signal induced interaction with CBP/p300. *EMBO J.*, 18, 1905-1914 (1999)

- 8) Ema, M., Ikegami, S., Hosoya, T., Mimura, J., Ohtani, H., Nagao, K., Inokushi, K., Katsuki, M. & Fujii-Kuriyama, Y. Mild impairment of learning and memory in mice overexpressing the mSim2 gene located on chromosome 16: an animal model of a Down's syndrome. *Hum. Molec. Genet.*, 8, 1409-1415 (1999)
- 9) Denver, R.J., Quellte, L., Furling, D., Kobayashi, A., Fujii-Kuriyama, Y. & Puymirat, J. Basic transcription element binding protein (BTEB) is a thyroid hormone-regulated gene in the developing central nervous system: Evidence for a role in neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.*, 274, 23128-23134 (1999)
- 10) Shimizu, Y., Nakatsuru, Y., Ichinose, M., Takahashi, Kume, Y.H., Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y. & Ishikawa, T. Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 97, 779-782 (2000)
- 11) Takahata, S., Ozaki, T., Mimura, J., Kikuchi, Y., Sogawa, K. & Fujii-Kuriyama, Y. Transactivation mechanisms of mouse clock transcription factors, mClock and mArnt3. *Genes to Cells*, 5, 739-747 (2000)
- 12) Nakayama, M., Takahashi, K., Kitamuro, T., Yasumoto, K., Katayose, K., Shirota, K.,
13) Fujii-Kuriyama, Y. & Shibuhara, S. Repression of heme oxygenase-1 by hypoxia in vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 271, 665-671 (2000)
- 13) Hosoya, T., Oda, Y., Takahashi, S., Morita, M., Kawauchi, S., Ema, M., Yamamoto, M. & Fujii-Kuriyama, Y. Defective development of secretory neurons in the hypothalamus of Arnt2-knockout mice. *Genes to Cells*. In print (2001)
2. 学会発表
- 1) “AhR(ダイオキシン)レセプターの作用機構と催奇形性における役割” 藤井義明 1998/5/22 第12回細胞生物学シンポジウム 愛知県がんセンター国際医学交流センター(名古屋)
- 2) “Ah(ダイオキシン)レセプターの機能と調節” 藤井義明 1998/6/20 日本薬学会北陸支部並びに第98回例会(金沢市)
- 3) “HLF-新しい低酸素応答性転写因子” 藤井義明、依馬正次、十川和博 1998/7/3-4 第3回Vascular Medicine学会 神戸国際会議場(神戸)
- 4) “Function and regulation of Ah(dioxin) receptor” Fujii-Kuriyama, Y., Mimura, J., Ema, M., Kobayashi, A., Sogawa, K., Yamashita, K. Takagi, T.N. & Yasuda, M. 1998/7-20-24 12th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations (Moutpellier, France)
- 5) “Regulation of Ah receptor (Dioxin receptor) activity in the inducible expression of drug metabolizing enzymes” Fujii-Kuriyama, Y., Mimura, J., Ema, M., Kobayashi, A. & Sogawa, K. 1998/7/26-31 XIIIth International Congress of Pharmacology (Germany)
- 6) “芳香族炭化水素受容体遺伝子欠損マウスを用いたベンゾピレン投与による発癌感受性の検討” 清水靖仁¹、中鶴陽子¹、三村純正²、勝木元也³、藤井義明²、石川隆俊¹(¹東大・医・分子病理、²東北大・理・化学、³東大・医科研・人疾患セ)
- 7) “ハイポキシアで誘導される遺伝子の一酸化窒素放出試薬による転写抑制” 十川和博、藤井義明(東北大・理・化学) 1998/9/30-10/2 日本癌学会(横浜)
- 8) “bHLH-PAS型転写因子HLFによる低酸素依存的遺伝子発現機構” 依馬正次、広田喜一、淀井淳司、藤井義明
- 9) “mRNA factory: 転写・プロセッシングを担う核内分子間ネットワークオーガナイザー” 荻原正俊、藤井義明、半田宏、梅園和彦
- 10) “PASタンパク質のイーストでの発現とDNA相互作用の解析” 十川和博、安田真規子、藤井義明、仁川純一
- 11) “Analysis of the Mouse Promoter” 王鋒、三村純正、十川和博、藤井義明(東北大院・理・化学)
- 12) “新しいタンパク質間相互作用ドメイン(PAS)の

- 大腸菌による発現と精製” 菊池康夫、三村純正、依馬正次、十川和博、藤井義明(東北大院・理・化学)
- 13) “AhRR による AhR のフィードバック制御機構” 三村純正、依馬正次、十川和博、藤井義明 1998/10/14-17 第 71 回日本生化学会大会(名古屋)
- 14) “遺伝子産物(タンパク質)の形を観る” 藤井義明 1998/10/22-23 第 13 回「大学と科学」公開シンポジウム(東京)
- 15) “ダイオキシンレセプターの作用機構と催奇形性における役割” 藤井義明 1998/11/18-19 第 12 回日本動物実験代替法学会(仙台)
- 16) “Ah(ダイオキシン)レセプターの生物機能と調節機構” 藤井義明、三村純正、依馬正次、小林聡、十川和博 1998/12/4 第 112 回日本医学会シンポジウム(東京)
- 17) “Ah レセプターの機能及び調節の分子機構” 藤井義明¹、三村純正¹、依馬正次¹、小林聡²、守田匡伸¹(¹ 東北大・院理、² 同・院医)
- 18) “bHLH-PAS 型転写因子 HIF-1 α 及び HLF による Tie2 遺伝子の低酸素依存的発現調節機構” 阿部学、依馬正次、藤井義明(東北大・院理・化学)
- 19) “mSim1、mSim2 の転写抑制ドメイン、及び細胞内局在性” 大野博道、依馬正次、藤井義明(東北大・院理・化学)
- 20) “新規 PAS タンパク質、Arnt3 のクローニングと転写活性” 高畑祥¹、小林聡²、十川和博¹、藤井義明¹(¹ 東北大・院理・化学、² 同・院医・医化学)
- 21) “AhR 遺伝子の単球系分化に伴う転写調節” 渡辺潤子¹、角純子¹、生田統悟¹、林慎一¹、本間良夫¹、川西政史²、十川和博²、藤井義明²、川尻要¹(¹ 埼玉がんセ・研、² 東北大・院理・化学)
- 22) “ヒト HL60 細胞のマクロファージへの分化時における Ah レセプター遺伝子の発現に必要な上流領域の解析” 川西政史¹、藤井義明¹、渡辺潤子²、生田統悟²、川尻要²、十川和博¹(¹ 東北大・院理・化学、² 埼玉がんセ・研)
- 23) “bHLH-PAS 型転写因子による低酸素依存的遺伝子発現機構” 依馬正次¹、杉林千晶¹、広田喜一²、淀井淳司³、藤井義明¹(¹ 東北大・院理・化学、² 京大病院・麻酔科、³ 京大・ウイルス研・生体応答)
- 24) “BCbox 結合転写因子 BYEB の発現解析” 守田匡伸^{1,2}、中島修²、高橋智²、島貫智匡¹、小林聡¹、山本雅之²、藤井義明¹(¹ 東北大・院理・化学、² 筑波大・TARA センター) 1998/12/16-19 日本分子生物学会(横浜)
- 25) “Ah(ダイオキシン)受容体(AhR)の機能と調節機構” 藤井義明 1999/4/2-4 第 25 回日本医学会総会(東京)
- 26) “Ah(ダイオキシン)受容体の生物作用の分子機構” 藤井義明 1999/5/22 第 43 回東北内分泌研究会(仙台)
- 27) “アрилハイドロカーボン(ダイオキシン)受容体の生物作用と機能制御” 藤井義明 1999/5/28 平成 11 年度日本環境変異原学会公開シンポジウム(東京)
- 28) “The Ah Receptor Regulatory mechanisms of Ah (Dioxin) Receptor Function” Fujii-Kuriyama, Y. 1999/8/29-9/2 11th International Conference on Cytochrome P450 -Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology-(仙台)
- 29) “Loss of teratogenic and carcinogenic effects of environmental pollutants such as 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and benzo[a] pyrene in mice lacking the Ah (dioxin) receptor” Fujii-Kuriyama, Y. 1999/9/22-23 The First Fujihara International Seminar(東京)
- 30) “内分泌攪乱化学物質の生体毒発現における Ah レセプターの役割” 藤井義明、三村純正、十川和博、依馬正次、小林聡
- 31) “生物の環境応答と bHLH/PAS 転写因子” 藤井義明 1999/10/6-9 第 72 回日本生化学会大会(横浜)
- 32) “ダイオキシン受容体(AhR)の生物機能とフィードバック調節機構” 藤井義明 第 2 回 RIBS バイオサイエンス・シンポジウム(岡山)
- 33) “ダイオキシン作用の分子機構と今後の研究の展開” 藤井義明 1999/10/22 第 25 回環境トキシコロジー・シンポジウム・第 3 回衛生薬学フォーラム合同大会(名古屋)
- 34) “Clock を含む bHLH-PAS 転写因子の転写調節メカニズムと機能” 藤井義明 1999/11/17

- 国際生物分子時計仙台シンポジウム_(仙台)
- 35) “Molecular Mechanisms of Function and Regulation of Ah receptor” Fujii-Kuriyama, Y. International Symposium on Environmental Endocrine Disruptors '99 (NIEHS)(神戸)
- 36) “AhR 遺伝子の転写調節” 渡辺潤子¹、角淳子¹、生田統悟¹、本間義夫¹、川西政史²、十川和博²、藤井義明²、川尻要¹(¹埼玉がんセ・研、²東北大・院理・化学)
- 37) “HL60 細胞のマクロファージへの分化時における Ah レセプター-遺伝子の発現に必要な DNA エlement” 川西政史¹、藤井義明¹、渡辺潤子²、生田統悟²、川尻要²、十川和博¹(¹東北大・院理・化学、²埼玉がんセ・研)
- 38) “AhRR の転写抑制機構” 三村純正、馬場崇、十川和博、藤井義明(東北大・院理・化) 1999/12/7-10 日本分子生物学会(福岡)
- 39) “Regulation and function of Ah receptor and ARNT heterodimer” Fujii-Kuriyama, Y. (招待講演)(NIEH)
- 40) “Repression mechanisms of AhR/Arnt heterodimer by AhRR” Mimura, J., Baba, T., Sogawa, K. & Fujii-Kuriyama, Y. 2000/4/17-20 2000 PAS Proteins:Sensors of Environmental and Developmental Signals (USA)
- 41) “Regulatory Mechanisms of Ah (Dioxin) Receptor Functions” Fujii-Kuriyama, Y. 2000/4/20 2000 Special Biochemistry Seminar (Vanderbilt Univ. USA)
- 42) “アルハイドロカーボン(ダイオキシン)受容体の転写活性化機構とその調節” 藤井義明 2000/6/3 日本生化学会東北支部会(盛岡地域交流センター)
- 43) “Regulatory Mechanisms of Ah Receptor Function” Fujii-Kuriyama, Y., Mimura, J., Sogawa, K. & Baba, T. 2000/7/6-10 International Workshop P450 (From Sequence to Function:Experimental and Bioinformatic Studies of Cytochrome P450 Superfamily P450 Moscow-2000) (Moscow, Russia)
- 44) “Regulatory Mechanisms of Transcription Activity of Ah Receptor” Fujii-Kuriyama Y. 2000/7/10-14 13th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations (Congress Center Stresa, Italy)
- 45) “環境因子と転写因子” 藤井義明 2000/7/20-22 内分泌・代謝学サマーセミナー(北海道)
- 46) “Ah 受容体の機能と調節” 藤井義明 2000/8/23-25 日本比較免疫学会(東京)
- 47) “芳香族炭化水素受容体ノックアウトマウスにおける三種の発がん性芳香族炭化水素の発がん感受性” 中鶴陽子¹、清水靖仁¹、小田秀明¹、岩坂茂^{1,2}、藤井義明²、石川隆俊^{1,3}(¹東大・医・分子病理、²東北大・理・化学、³大学評価・学位授与機構)
- 48) “Ah レセプター・Arnt 二量体によって仲介されるラットP4501A2 遺伝子の新しい誘導機構” 十川和博、菊池康夫、藤井義明(東北大・理・化学)
- 49) “ヒト AhR 遺伝子の単球分化に伴う転写調節” 渡辺潤子¹、角純子¹、生田統悟¹、本間義夫¹、十川和博²、藤井義明²、川尻要¹(¹埼玉がんセ・研、²東北大・院理・化学) 2000/10/4-6 日本癌学会(横浜)
- 50) “Ah 受容体の機能とその調節” 藤井義明^{1,2}、三村純正¹、馬場崇^{1,2}、十川和博¹(¹東北大院・理・化学、²科技団・CREST)
- 51) “生殖腺の性分化と核内受容体の機能” 諸橋憲一郎^{1,2,3}、中村直仁^{1,2}、鈴木大河^{1,4}、向井徳男^{1,5}、難波智^{1,6}、水崎弘文^{1,3}、河辺顕^{1,7}、藤井義明^{2,8}(¹基生研、²科技団・CREST、³総研大院、⁴京大院・ウイルス研、⁵北大院・医、⁶東大院・医、⁷九大院・医、⁸東北大院・理)
- 52) “AhRR 遺伝子の発現制御機構の解析” 馬場崇、三村純正、十川和博、藤井義明(東北大・院・理)
- 53) “ラット P4501A2 遺伝子に見いだされた新しい XRE 配列とその性質” 十川和博¹、高橋智¹、松下夏樹¹、沼山恵子¹、三浦千沙¹、仁川純一²、菊池康夫¹、藤井義明¹(¹東北大院・理・化学、²九州工大・情報工・生物化学システム工)
- 54) “AhRR による転写抑制機構” 三村純正、馬場崇、十川和博、藤井義明(東北大院・理)
- 55) “大腸菌で発現させた PAS ドメインの性質と

- 結晶化” 菊池康夫、三村純正、依馬正次、十川和博、藤井義明(東北大・院・理) (神戸)
- 56) “新生マウスの酸素負荷網膜症発症モデルの血管新生におけるHLFの役割” 守田匡伸¹、中島修²、高橋智²、川内紫真子²、山下年晴¹、依馬正次¹、柴原茂樹³、鶴殿徹男³、富田浩史³、玉井信³、十川和博¹、山本雅之²、藤井義明¹(¹東北大・院・理、²筑波大・TARAセ、³東北大・院・医)
- 57) “ヒト血管内皮細胞における低酸素によるヘムオキシゲナーゼ1の発現抑制” 中山雅晴¹、高橋和広¹、北室知己¹、安元研一¹、片寄大²、白土邦男²、藤井義明³、柴原茂樹¹(¹東北大・医・分子生物、²東北大・医・循環器病態、³東北大・理・化) 2000/10/11-14 日本生化学会(横浜)
- 58) “生物の環境応答とbHLH-PAS転写因子” 藤井義明 2000/11/24 東京大学分子細胞生物学研究所シンポジウム(東京)
- 59) “外来異物に対する生体応答のメカニズム” 藤井義明、三村純正、馬場崇、十川和博(東北大・院・理)
- 60) “AhリセプターとArntのヘテロダイマーをコアアクターとして要求する転写因子の同定” 沼山恵子¹、十川和博¹、高橋智裕¹、和田忠士²、半田宏²、藤井義明¹(¹東北大院・理・化、²東工大・フロンティア)
- 61) “ダイオキシンによる女性ホルモン攪乱作用の分子メカニズムの解析” 大竹史明¹、武山健一^{1,3}、柳澤純^{1,3}、佐藤隆史¹、藤井義明^{2,3}、加藤茂明^{1,3}(¹東大・分生研、²東北大・院理・化学、³科技団・CREST)
- 62) “成体での血管新生におけるHLFの役割” 守田匡伸¹、高橋智²、中島修²、川内紫真子²、山下年晴¹、依馬正次¹、柴原茂樹³、十川和博¹、山本雅之²、藤井義明¹(¹東北大・院理、²筑波大・TARAセンター、³東北大・院医)
- 63) “Arnt2 regulates the development of secretory neurons in mouse hypothalamus with Sim1 as a dimmer” Hosoya, T.^{1,2}, Oda, Y.¹, Takahashi, S.², Morita, M.¹, Kawauchi, K.², Ema, M.¹, Yamamoto, M.², Fujii-Kuriyama, Y.¹ (¹Tohoku Univ., Grad. Sch. Sci., Dept. Boil., ²Tsukuba Univ., TARA Center) 2000/12/13-16 日本分子生物学会
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)
分担研究総合報告書

2.3.7.8.-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシンによる雄性副生殖器の
発生歪曲の分子機序に関する研究

分担研究者 鈴木 勝士 日本獣医畜産大学教授

研究要旨

TCDD の妊娠中期のラットへの 1 回暴露が、雄の出生児の副生殖器、精子産生に影響を及ぼすとの Wilker ら(1996)の報告について、ラットの系統をウイスター今道ラット近交系に変えて再現性が見られるか否か確認した。妊娠 15 日のラットに、0、1、2、および 4mg/kg の TCDD を単回投与し、出産させ雄の生殖行動と副生殖器の発生異常を調べた。4mg/kg 群では難産、哺育中断、他の投与群では雄性副生殖器の一部欠損が確認され、精子形成はあるものの交尾行動に異常が認められ、妊孕能はなかった。実験は2年に渡り繰り返されその成績は一部 Wilker ら(1996)の報告を再現するとともに、妊孕能の喪失に関して新知見をもたらした。今後、子宮内暴露以後の副生殖器で起こる発生遺伝的修飾について明らかにする必要がある。

A. 研究目的

妊娠ラットに極微量の TCDD を単回投与し、雄性副生殖器の発生異常とその後の機能障害を確認したので、発生初期の転写調節のかく乱について確認し、その機序を解明することを目的とし、妊娠 15 日のラットに、0、1、2、および 4mg/kg の TCDD を単回投与し、出産させ雄の生殖行動と副生殖器の発生異常を調べる。

平成 11 年度の研究により、雄胎児の精巣、副生殖器重量の低下、精子産生量低下、生殖行動異常と妊孕能低下が確認され、過去の報告が再現されるとともに、行動異常について新知見が得られた。当面の LOAEL として 1.0 μg/kg が得られたが、NOAEL は未確定であり、さらに実験を継続する必要がある、平成 12 年度はデータの信頼性を高めるべく同一条件で追加実験を実施した。また、

ラットの初期胚に対して母胎経由で TCDD 投与を実施し、妊娠末期の胎児にどのような影響が見られるか探索することにした。初期胚では内細胞塊の一部は生殖細胞に分化するので、そのような運命の細胞が変異すると遺伝性の影響が生じる可能性がある。このような影響を調べるには、感作された胎児を出産させ育成して近親交配により 3 世代維持して精査する必要があると考えられる。今回の実験は、そのような長期にわたる大規模な実験が必要か否かに関する判断材料を与えると考えられる。

B. 研究方法

ラット初期胚と雄性生殖器の発生歪曲の分子機序の研究では、精巣と雄性副生殖器での形態形成に関わる遺伝子発現の探査、遺伝的背景が均一と考えられる近交系 Wistar

Imamichi rat WI での妊娠初期単回投与と出産児の兄妹交配形式での繁殖試験を行い、妊娠末期に帝王切開して、胎児の異常の有無を検討した。妊娠 15 日投与については、1.0, 2.0, 及び 4.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群にそれぞれ 4~5 腹を追加して実験を継続した。

TCDD(RADIAN Corp: lot #15091-55)の 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (2% アセトン-コーン油溶液)を保存溶液とし、0.5, 1, 2, または 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で、妊娠 3 日(午前中)の近交系 Wistar Imamichi ラットに 1 回経口投与し、妊娠 21 日に帝王切開して胎児を得、形態学的な異常の有無を精査した。対照群には溶媒を投与した。予備試験的な性格の実験であるので、各群 6 匹の妊娠ラットを用いた。母動物については、毎日の臨床観察と妊娠 0, 3, 7, 14, 15, 21 日に体重測定を実施した。母動物は剖検に付し、肝臓、卵巣、下垂体重量を測定するとともに異常のみられた臓器についてはホルマリン固定して保存した。各群の胎児の約半数を内臓奇形の観察に宛て、残りの半数を骨格奇形の観察に宛てた。

動物への暴露は(財)動物繁殖研究所にて実施した。空調、照明時間制御のコンベンショナル動物舎環境で、陰圧ラミネフロー条件で動物を飼育、投与実験を行った。育成期間および投与前の妊娠期間についてはステンレス製金網ケージにて群飼、妊娠後期から哺育期はポリカーボネート製ケージにて個別飼育とした。臨床観察により瀕死と判定された動物は切迫屠殺して剖検に付した。

(倫理面への配慮) TCDD 汚染物質の拡散を防ぐため、無毒化できる焼却法が開発されるまで、動物を含む汚染物を凍結保存した。

C. 研究結果

11 年度より研究班に参加したが、本研究班班員による研究において、暴露が必要な

場合、平成 11 年以降動物繁殖研究所で実施できるよう体制整備等準備を平成 10 年度に行った。平成 11 年度には Wilker, C.らの実験と同一用量群で、妊娠 15 日に経口的に 1 回 TCDD を投与し、妊娠末期あるいは分娩哺育後、雄の副生殖器について精査した。また、交尾行動などへの影響を観察した。平成 12 年度には、前年の実験で 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群で F1 が得られず、実験構成も小規模だったため、再現性を確認するために動物数を増やして追加実験を行った。

D. 考察

2,3,7,8-TCDD の子宮内暴露による胎児への影響を解明する目的で、ウィスター今道近交系ラットに妊娠中期(15 日)および初期(3 日)に他段階の用量の TCDD を単回経口投与し、胎児および生後の雄の生殖機能に対する影響を調べた。

1.0, または 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の TCDD を妊娠 15 日に 1 回子宮内暴露された、雄ラットは成熟後生殖器の重量に用量相関的な減少を示し、インタクトな発情雌と同居すると対照ラットより著しく多い交尾行動を示すが、射精はまれにしか起こらず、妊孕能を喪失した。4.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TCDD の投与は重得な胎児毒性を示すとともに、出生後もその悪影響が持続し生存性が極めて悪く、成熟雄は得られなかった。今回の成績は一部 Wilker ら(1996)の報告を再現するとともに、妊孕能の喪失に関して新知見をもたらした。交尾行動の変化は妊娠 15 日の TCDD 投与が雄ラットの脳の性分化には影響を示さないこと、および成熟時の性行動を引き起こすに必要な量のテストステロン産生にも影響を示さないが、副生殖器重量を維持するには不十分である可能性があることを示唆している。今回の実験系の中では LOAEL は 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$

であったが、これを確定するためにはさらに低用量での実験が必要である。

妊娠初期に 0.5, 1.0, 2.0 および 4.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の TCDD を単回経口投与して胎児の発生に及ぼす影響を調べた結果、いずれの用量群でも体軸形成異常などの変異原の初期投与に特有な重篤な奇形は認められず、この時期、この用量範囲では TCDD に突然変異誘発性はないと考えられた。0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の群で用量相関的な腎盂の拡張および尿管の拡張の発生が認められ、特に 4.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群では胎児の約 6 割が発症した。この影響は妊娠初期に投与された TCDD がその半減期が長いために、母体内に貯留した TCDD が器官形成期になって胎児に影響した結果であると考えられた。0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群での低頻度の腎臓の異常の発生は、遺伝的に均一と考えられる近交系ラットにおいてもなお、TCDD に対する感受性に個体差があることを示唆している。今回の実験により、妊娠初期一回投与での TCDD のラット（母親、胎児）に対する NOAEL は 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であることが判明した。

E. 結論

in vitro ではウィスターハノーバーとウィスター今道ラットは AhR の感受性が鈍いとされているが、今回の *in vivo* のデータは感受性が鈍いということもなく、標的臓器における異常も他の報告と類似しており、2 回の実験で再現されていることから、これらの動物を TCDD の実験に用い得ることが判明した。また、今回の妊孕能の確認試験は、形態学では分からない機能異常を検出しており、発生生殖毒性の有用な試験法であることが確認された。特に、性的二型核への影響がない形での雄の生殖行動異常（性欲の亢進、交尾行動増加、妊孕能喪失）

については、今回初めて把握された現象であり、今後さらにその機序の解明が必要になる。このエンドポイントとして 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の 1 回投与が現時点での LOAEL であり、さらに用量を低くして影響を見る必要も生じている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki, H., M. Kokado, K. Saito, T. Kunieda and K. Suzuki (1999) A locus responsible for hypo-gonadism (hgn) is located on rat Chromosome 10. *Mammalian Genome* 10(11): 1106-1107.
2. Akimoto, T., H. Suzuki, Y. Arai, K. Nakama and K. Suzuki (2000) Locus of dominant hairless gene (Ht) causing abnormal hair and keratinization maps to rat chromosome 10. *Experimental Animal* 49(2): 137-140.
3. Suzuki H., S. Fukaya, K. Saito and K. Suzuki (2000) A locus responsible for osteochondro-dysplasia (ocd) is located on rat Chromosome 11. *Mamm. Genome*. 11(6): 464-465.
4. Uchibori, M., K. Saito, S. Yokoyama, T. Tsuji, H. Suzuki and K. Suzuki (2000) Monitoring and analysis of the EEG spikes frequency in E1 mice during sleep: A new application of wavelet transform. *Physiol. Behav.* (in submission).
5. 鈴木勝士 (1999) エストロンの初期鶏胚の発生に及ぼす影響、内分泌攪乱物質学会ニュースレター、4: 2-3.
6. 板垣昌志、阿部省吾、阿部栄、酒井淳一、鈴木勝士 (1999) 乳牛の潜在性乳房炎と乳頭口異常の関連、日本獣医師会雑誌 52(9) 561-564.
7. 鈴木勝士、他 13 名 (著) (2000) X III. 遺伝性疾患、内藤喜久、浜名克己、元井霞子編、生産獣医療における牛の生産病の実際、p207-216、文永堂、東京

8. 鈴木勝士、他 83 名(訳)(2000)第 114 章、
膵臓内分泌部の外科的疾患、高橋貢、
佐々木信雄監訳、スラッター小動物の外
科手術: (Slatter, D: Textbook of Small
Animal Surgery (2nd Ed.), WB Saunders
Co., Philadelphia 1993)、文永堂、東
京、p1667-1678.
 9. 鈴木勝士、他 44 名 (2000) 2.2.3.子宮内
暴露試験、2.2.4.一世代繁殖試験、井上
達監、今井清、長村義之、加藤正信、菅
野純編、内分泌化学物質の生物試験研
究法、シュプリンガー・フェアラーク東京、
東京、p85-106
 10. 鈴木勝士(2000)ナイトセッション
Dose-response. 森田昌敏、緊急企画 内
分泌攪乱化学物質問題に関する国際シン
ポジウム'99-各座長による包括報告-、
資源環境対策 36(2):156-157.
 11. 高須正規、高橋純子、斎藤賢一、鈴木浩
悦、鈴木勝士(2000)マウス脳硬膜上からの
聴覚脳幹誘発電位(第2報)、電子情報通
信学会技術研究報告 MBE99-152:43-47
 12. 鈴木勝士(1999)環境ホルモンと獣医
師の役割、アニマリタリアン、
vol. 9:1.
2. 学会発表
 1. 斎藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士(2000)電
磁場照射がマウスの繁殖と成長におよ
ぼす影響について 第 19 回宇宙エネルギー
シンポジウム (pp.75-79)
 2. 高須正規、高橋純子、斎藤賢一、鈴木浩
悦、鈴木勝士(2000)マウス脳硬膜上から
の聴覚脳幹誘発電位(第2報)、電子情報
通信学会、ME とバイオサイバネティクス
研究会、p.43
 3. 小川実幸、岩間良子、日比佐知子、尼崎
肇、鈴木浩悦、鈴木勝士、孫 偉勇、塩田
邦郎 (2000) マウス口蓋ヒダ形成位置とプ
ラコード形成・細胞増殖・アポトーシス・細
胞周期関連因子の発現分布の関係、第
52 回日本動物学会、関東地方部会
 4. 徳力 剛、太田千春、高須正規、鈴木浩悦、
斎藤賢一、鈴木勝士(2000)腎低形成症ラ
ットにおける慢性腎不全進行過程の基礎
的評価、第 129 回日本獣医学会
 5. 八木美央、鈴木浩悦、岡田美香、千純子、
醍醐久美、中宮英次郎、尼崎 肇、斎藤賢
一、鈴木勝士(2000)精巣形成不全症ラット
の生後初期精巣の病理発生に関する調
査:細胞の増殖と細胞死の観点から、第
129 回日本獣医学会
 6. 田村 啓、三森国敏、小野寺博志、高木
久宜、森安眞津子、鈴木勝士、広瀬雅雄
(2000)ラット甲状腺二段階発癌における下
垂体除去の影響と外来性 TSH の修飾作
用、第 129 回日本獣医学会
 7. 日比佐知子、岩間良子、小川実幸、尼崎
肇、鷹巣雅峰、鈴木浩悦、鈴木勝士、孫
偉勇、塩田邦郎(2000)マウス口蓋ヒダ形成
位置とプラコード形成・細胞増殖・アポト
ーシス・細胞周期関連因子の発現分布の関
係、第 129 回日本獣医学会
 8. 秋元敏雄、鈴木浩悦、仲間一雅、鈴木勝
士(2000) WBN/IIa-Ht rat のヘアレス遺伝
子(Ht)のラット第 10 染色体上へのマッピ
ングおよびヌードラットとの相補性試験、第
47 回日本実験動物学会
 9. 鈴木勝士(2000)動物の疾患の遺伝子、第
26 回日本比較臨床血液学会
 10. 鈴木勝士、斎藤賢一、鈴木浩悦、竹中基
郎、八木未央(2000)エストロン投与による
鶏胚での発生攪乱、第 40 回日本先天異常
学会
 11. 斎藤賢一、内堀雅隆、横山修一、辻 隆
之、鈴木浩悦、鈴木勝士(2000)先天性癲
癇モデル動物(EI Mouse)における睡眠時
脳波の解析、第 40 回日本先天異常学会
 12. 鈴木勝士、斎藤賢一、鈴木浩悦、竹中基
郎、八木未央、岡田美香(2000)エストロン
投与による鶏胚での発生攪乱について、
第 130 回日本獣医学会
 13. 秋元敏雄1)、鈴木浩悦2)、仲間一雅1)、
鈴木勝士(2000)Hairless rat(WBN/IIa-Ht)
の原因遺伝子 Ht とヌードラットとの相補性
試験。(F1 および F2 の表現型について)、

第 130 回日本獣医学会

シオン期投与の影響、毒性病理学会

14. 丸ひろみ、鈴木浩悦、高橋純子、井出雅子、大村 彰、斉藤賢一、鈴木勝士(2000)骨軟骨形成不全症ラット病因遺伝子の探索:外交配系での表型調査と病因遺伝子座周辺の連鎖地図の作成、第 130 回日本獣医学会
15. 竹中基郎、鈴木浩悦、石坂みゆき、斉藤賢一、鈴木勝士(2000) Wistar-Imamichi ラットクローズドコロニーで発見された神経症状を伴う矮小ラット、第 130 回日本獣医学会
16. 高橋純子、斉藤賢一、高須正規、鈴木浩悦、鈴木勝士(2000)E1 および ddY マウス脳硬膜上からの聴覚脳幹誘発反応(ABR)の解析、第 130 回日本獣医学会
17. 鈴木浩悦、高橋純子、丸ひろみ、斉藤賢一、鈴木勝士(2000)骨軟骨形成不全症ラット病因遺伝子の探索:RH パネルでの連鎖マーカの配列と系統内多型を用いたファインマップの作成、第 130 回日本獣医学会
18. 千葉純子、中宮英二郎、鈴木浩悦、斉藤賢一、鈴木勝士(2000)ウイスターイマミチラット由来近交系統間での ocd 遺伝子座周辺の多型性、第 130 回日本獣医学会
19. 尼崎 肇、小川美幸、日比佐知子、岩間良子、鈴木浩悦、鈴木勝士、孫 偉勇、塩田邦郎(2000)マウス口蓋ヒダ形成配列に関連する PAL31 の mRNA の発現分布、第 130 回日本獣医学会
20. 岡田美香、鈴木浩悦、千葉純子、醍醐久美、中宮英二郎、八木未央、斉藤賢一、鈴木勝士(2000)ラット精巣形成不全症(hgn / hgn)の胎生期病態発生に関する検討、第 130 回日本獣医学会
21. 鈴木勝士(2000)期鶏胚に及ぼすエストロジェンの発生障害作用を中心にして、第 130 回日本獣医学会
22. 田村 啓、三森国敏、小野寺博志、那須昌弘、高木久宜、安原加壽雄、上田誠、鈴木勝士、広瀬雅雄(2000)ラット甲状腺二段階発癌モデルにおける麩酸イニシエー

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
2. その他
なし

胎性期や新生児期のストレス負荷ラットへの成熟後のダイオキシン類暴露の影響

分担研究者 群馬大学医学部神経精神医学教室 三國 雅彦

研究要旨

慢性可変ストレスおよびダイオキシン類の連続投与が成熟ラットの脳内代謝にどのような影響を及ぼすかを検討するために Sprague-Dawley 系雄ラットを用いて 1) 7 日間の慢性可変ストレス負荷群、2) TCDD 慢性投与群、3) 慢性可変ストレス及び生食慢性投与群、4) 生食慢性投与群の 4 群で[14C]-2-deoxyglucose を用いたオートラジオグラフィによって前頭皮質の糖代謝を比較したが、各群間で有意差はみられなかった。また、成熟ラットにダイオキシン類を連続投与し、慢性変動ストレスが与える脳内代謝の変化を比較したところ、ダイオキシン類曝露によって、ラット前頭皮質の糖代謝は影響を受けず、成熟後のダイオキシン類曝露が中枢神経系に与える影響は明瞭ではなかった。さらに胎性期のストレス負荷が、胎性期に曝露されたダイオキシン類の影響を受けやすくするか否かについて明らかにするため、胎生期にダイオキシン類、生理食塩水注射によるストレスを加えたラットを作成し、行動学的観察を行った結果、ダイオキシンの持続的曝露が脳内の代謝を低下させる傾向があることが示唆された。

A. 研究目的

様々な内分泌ホルモンが神経系の発達に関与し、ストレスに対する脆弱性を引き起こすものと考えられていることから、本研究では、まず成熟ラットにダイオキシン類を連続投与し、慢性変動ストレスが与える脳内代謝の変化に対して影響を与えるか否かについて検討した。さらに胎性期のストレス負荷や視床下部 - 下垂体 - 副腎皮質 (hypothalamus-pituitary-adrenal, HPA) 系機能を亢進させる処置 (ACTHあるいは dexamethasone による処置) が、胎性期に曝露されたダイオキシン類の影響を受けやすくするか否かについて明らかにするため、胎生期に ACTH、ダイオキシン類、さらに慢性ストレスを加えたラットを作製し、行動学的観察、ストレス応答に関与する内分泌機能測定、およびマイクロアレイ法を用いた脳内遺伝子変異の網羅的検索を遂行する。

また、治療法や予防法を確立するための対応を可能にすることを目的として、胎性期や新生児期のストレス刺激が神経系の発達に直接影響し、ダイオキシン類の曝露に対する脆弱因子を形成していることを明らかにする。

B. 研究方法

(1) ダイオキシン類が中枢神経系に与える直接的作用の検討:

まず副腎皮質刺激ホルモンの反復処置がラット大脳皮質の糖代謝を低下させることを 18F-FDG を用いた PET 検査で明らかにし、副腎皮質ホルモンの持続的過剰に基づくことを明らかにした。この点を踏まえ、ダイオキシン類の曝露が脳内の糖代謝に同様の影響を与えるか、否かについて検討した。実験方法は 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD, 10

$\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.)を5日間連続投与したSD系雄ラット(7週令, 体重280-300g)に, ^{18}F -fluoro-deoxyglucose (^{18}F -FDG, 0.5 mCi)を尾静脈投与し, 30分後に断頭して凍結脳切片($20\mu\text{m}$)を作成し autoradiography 法により脳内リガンド取込値を定量することによって脳糖代謝を評価した。

(2) 慢性変動ストレス(chronic variable stress, CSV)が脳内代謝に与える効果に対するダイオキシン類の連続投与の影響:

胎性期のストレス負荷やdexamethasone処置が, 胎性期に暴露されたダイオキシン類の影響を受けやすくするか否かについて明らかにする前に, 慢性変動ストレスおよびダイオキシン類の連続投与が成熟ラットの脳内代謝にどのような影響を及ぼすかを検討するために以下の動物実験を行った。

実験動物は Sprague-Dawley系雄ラット(7週齢, 体重250-300g)で, 使用した薬物は 2,3,7,8-tetra chlorobenzo-p-dioxin (TCDD, $10\mu\text{g}/\text{kg}$, 腹腔内投与)である。ラットを4群($n=5-6$)に分け各群に以下のような処置を行った。

(1群)7日間の慢性変動ストレス

1日目:尾の痛み刺激5分間。

2日目:30分間の強制水泳(水温 $21\pm 2^{\circ}\text{C}$)。

3日目:1時間の金網による拘束。

4日目:17時間の絶食。

5日目:尾の痛み刺激5分間。

6日目:17時間の絶飲。

7日目:1時間の金網による拘束。2日目から6日目の5日間, ストレス負荷前にTCDDを投与。

(2群)CVSなし。1群と同じ期間, TCDDを投与。

(3群)CVS実施, 2nd dayから6th dayの5日間, ストレス負荷前に生食を投与。

(4群)CVSなし。1群と同じ期間, 生食を投与。

最終ストレス終了後, ^{14}C -2-deoxyglucose (2DG, $50\mu\text{Ci}/\text{rat}$, 腹腔内投与)を投与し,

45-60分後に断頭して $20\mu\text{m}$ の脳凍結切片を作成し, 脳組織の単位面積当たりの放射エネルギーをBAS2000で定量解析し, 各群の前頭皮質糖代謝を比較検討した。

(3) 胎生期ダイオキシン類曝露の神経系発達に対する影響:

i. 胎生期にACTH、ダイオキシン類処置を加えたラットの作製:

SD系雌妊娠ラットに対し, また妊娠第17~19日目にACTH($50\mu\text{g}$, 皮下)あるいはTCDD, $0.5\mu\text{g}/\text{kg}$ を投与する。出生した仔ラットを雌雄に分別して7週令に達した時点で用いる。

ii. 行動学的観察:

仔ラットに急性ストレスとして, 高架式十字迷路によって, 不安関連行動(10分間のopen armへ入る回数, およびopen armに滞在する時間の積算)を測定すると共に, 胎生期に生理食塩水を処置した対照と比較する。

(倫理面への配慮)

本研究の過程で発生したTCDD汚染物質(動物死体, 実験器具など)を安全に廃棄する方法が確立されるまで, 全て凍結保存を行った。

C. 研究結果

ステロイドやグルチコルチコイド受容体を変化させた実験動物における諸変化, 特に神経薬理効果への影響については, TCDD処置群では脳糖代謝の値はばらつきが多かった。また, 慢性可変ストレスおよびダイオキシン類の連続投与が成熟ラットの脳内代謝にどのような影響を及ぼすかを検討するために Sprague-Dawley系雄ラットを用いて1)7日間の慢性可変ストレス負荷群, 2)TCDD慢性投与群, 3)慢性可変ストレス及び生食慢性投与群, 4)生食慢性投与群の4群で ^{14}C -2-deoxyglucoseを用いたオートラジオグラフィによって前頭皮質の糖代謝を比較したが, 各群間で有意差は見られ