

平成10年度厚生科学研究費補助金
(生活安全総合研究事業)

ダイオキシン類による健康影響の機構に関する研究

(課題番号H10-生活-012)

平成11年度研究報告書

平成12年3月

主任研究者 小栗 一太

平成11年度研究報告書

ダイオキシン類による健康影響の機構に関する研究

(課題番号H10-生活-012)

研究班構成員氏名

主任研究者	九州大学薬学研究科教授	小栗 一太
分担研究者	九州大学薬学研究科教授	内海 英雄

研究報告書

ダイオキシン類による健康影響の機構に関する研究

主任研究者 小栗 一太 九州大学薬学研究科 分子衛生薬学 教授

分担研究者 内海 英雄 九州大学薬学研究科 機能分子解析学 教授

研究要旨 ダイオキシン類は、環境中に広く分布した生物蓄積性の環境汚染物質の一つであり、近年では、内分泌攪乱物質として、生体に与える影響が危惧されている。しかしながら、生殖毒性や腎毒性の生化学的メカニズムはよくわかっていないのが実情である。本研究では、ダイオキシン類のうち高レベルに環境を汚染しており、かつその影響がTEQでいうと、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinをも上回るとされ、PCB異性体中で最強毒性を示すコプラナーPCBである、3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126)を用いた。平成10年度の研究からは、精子形成に重要な役割を果たしているLeydig細胞で、分子シャペロンHSP70およびHSP90の誘導、estrogen receptorの抑制が示唆された。これら分子シャペロンの誘導は、環境汚染レベルのPCB126でも起ることが明らかになっている。本年度も引き続き PCB126 の毒性発現機構の解明を目的とし、基底膜に局在する糖タンパク質である laminin に着目して検討を行った。まず、培養細胞を用い、精巣由来の2種類の cell line (Sertoli cell, TM4 および Leydig cell, LC540) において、PCB126 処理の影響を調べたが、laminin のタンパク質レベルには PCB126 処理では顕著な変化はなかった。次に、Wistar系ラットをPCB126 10 mg/kg (i. p.)で単回処理し、5日後に、精巣および腎臓を摘出して検討したが、精巣の laminin のタンパク質レベルは顕著な影響を受けなかった。このように、精巣のlamininへの影響は顕著でなかった。しかしながら、PCB126 処理ラット腎臓においては、分子量約 70 kDa 付近にモノクローナル抗 laminin γ 1 鎖抗体と特異的に交叉する強いバンドが出現した。この約 70 kDa のバンドが、生理的機能を有するか否かは、現在までに明らかでないが、laminin γ 1 鎖の MMPs による切断に由来するとしても、MMP-2 (gelatinase A) および MMP-3 (stromelysin-1) の2種の MMPs の寄与は少ないことが示唆された。本研究の成績は、ダイオキシン類の腎毒性発現機構を解明する上で一つの重要な手がかりになると考えられる。

1. 目的

近年、ダイオキシンによる環境汚染問題は非常に深刻であり、世界中の注目を集めている。ダイオキシンとは通称であり、ジベンゾパラダイオキシン (dibenzo-p-dioxin) 骨格の塩素化物であるポリ塩化ジベンゾパラダイオキシン (polychlorinated dibenzo-p-dioxins, PCDDs) (Fig. 1) を指す。これには、数多くの構造異性体があり、このうち 2,3,7,8 の位置に塩素が置換した四塩素化物 (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-

dioxin, TCDD) は極めて強い毒性を示す

(1)。一般に「ダイオキシン」と言う場合には、これを指すことが多い。我が国においては、高濃度のダイオキシンが環境を汚染している地域があることから注目されており、主な発生源は、都市における産業廃棄物や一般廃棄物のゴミ焼却処理場の焼却過程であると考えられている (2-4)。ダイオキシンは環境中で分解されにくく、生物の食物連鎖によって濃縮さ

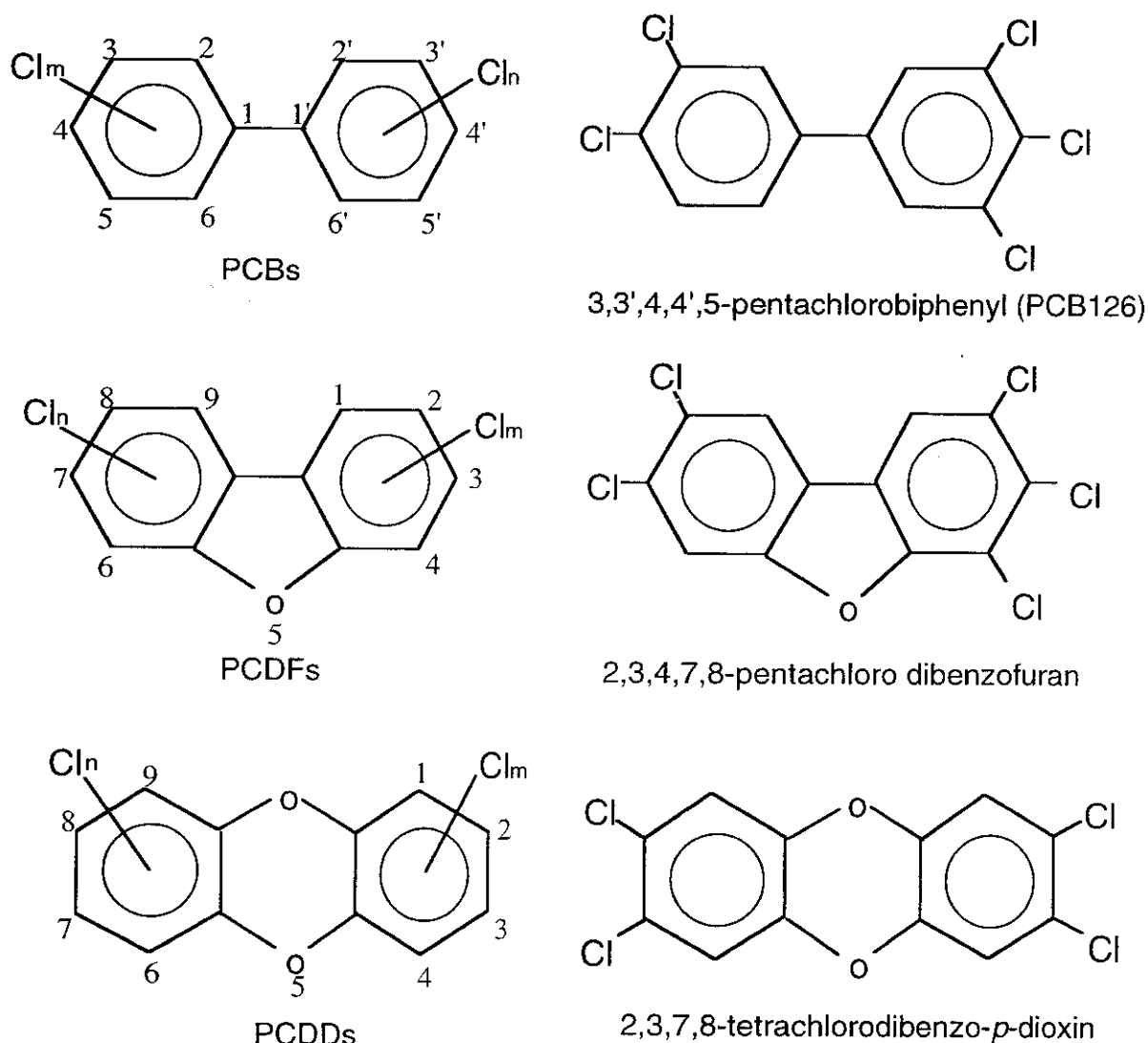


Fig. 1 Structures of PCBs, PCDFs and PCDDs.

れる。その結果人体には主に食物を通して取り込まれ体内に蓄積される(5, 6)。最近では、生体に取り込まれることにより、ホルモン様の働きをしたり、ホルモンの働きを阻害したりする物質(内分泌攪乱物質)による環境汚染が注目を集めており、ダイオキシンもその一つに数えられている。ダイオキシンの毒性は、構造特異的な急性遅延性致死毒性、生物種による感受性の大きな差および催奇形性と発がん性によって特徴づけられる(7-10)。また、PCDDs以外にもFig. 1に示す、ポリ塩化ジベンゾフラン(polychloro dibenzofurans, PCDFs)および平面構造をもつ coplanar polychlorinated biphenyls (コプラナーPCBs) からなる三種類の化合物群を総称してダイオキシン類という。これらは、相互に類似した物理化学的性質と生体影響を示し、世界的規模で環境や生体を汚染している(11, 12)。現在設定されている環境基準値や指針値は、国や行政区域によって大きく異なるが、日本においては、1997年8月に大気汚染防止法の政省令が一部改正され、ダイオキシン類が「指定物質」となった。さらにその大気環境濃度の指針値を年平均 $0.8 \text{ pg TEQ} \cdot \text{m}^{-3}$ に設定されている(12)。ダイオキシン類には多くの構

造異性体が存在するが、現在、PCDD で 7 種、PCDF で 10 種およびコプラナー PCB で 13 種の異性体が毒性評価対象となっている。また、それら異性体がヒトに及ぼす影響を TEQ で評価した場合、3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) のようなコプラナー PCB は高レベルに環境を汚染しているため、TEQ では TCDD のそれをはるかに上回るとされている(13, 14)。

PCB は 1968 年に西日本一帯で発生した「カネミ油症事件」(15-17)の原因物質の一つとされており、この事件後、日本では 1972 年に生産が中止されたが、今なお環境中に広く存在しており、ヒトへの影響が危惧されている。PCB は塩素化の数と位置によって理論上 209 種の異性体が存在するが、その毒性は異性体により大きく異なっている。ビフェニルのオルト位に置換塩素を持たない PCB は、2つのベンゼン環が同じ平面に位置するため共偏平な(coplanar)構造をとり、コプラナー PCB と呼ばれている。中でも、PCB126 は、PCB 異性体中最も強い急性毒性を示すことが知られている(18)。実験動物を用いた研究から、これらの化合物は、催奇形成、発癌のプロモーション、体重増加抑制、免疫抑制、上皮細胞異形成、薬物代謝酵

* 1 TEQ (toxicity equivalency quantity, TCDD 毒性等価量)

各異性体量に TEF 値 (toxicity equivalency factor, TCDD 毒性等価係数, TCDD の毒性を 1 としたときの相対毒性) をかけた値の合計で表す。PCB126 および 2,3,4,7,8-pentachloro dibenzofuran の TEF 値はそれぞれ 0.1 および 0.5 と見積もられている(6)。

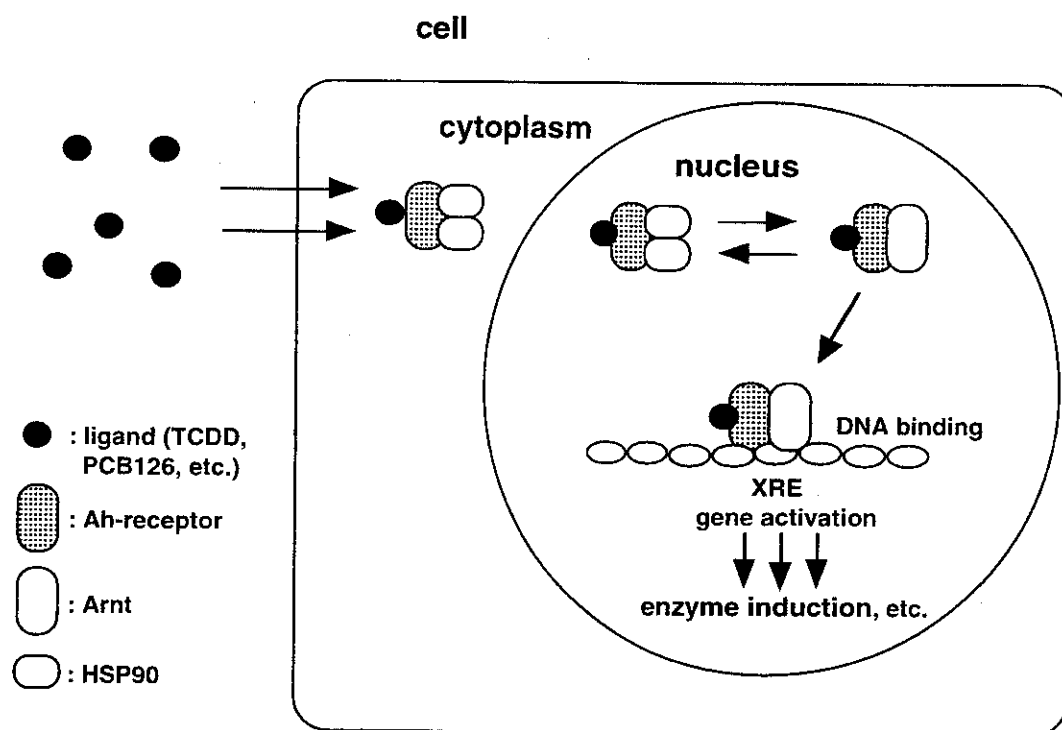


Fig. 2 Postulated mechanism of transcriptional activation of xenobiotic responsive gene by Ah-receptor system.

素の誘導など、多面的生体影響を示すことが知られている (15, 19, 20)。このような作用発現のメカニズムには、ダイオキシン類の受容体である aryl hydrocarbon receptor (Ah-receptor, AhR) が重要な働きをしていることが知られている (21, 22)。

AhR は通常、細胞質において 2 分子の 90 kDa heat shock protein (HSP90) と複合体を形成して存在している (23, 24)。TCDD や PCB126 などのリガンドが結合すると HSP90 は複合体から解離し、AhR は核内へ移行する。次いで、核内で Ah-receptor nuclear translocator (Arnt) とヘテロダイマーを形成し、cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) などの

遺伝子上に存在する xenobiotic responsive element (XRE) というコンセンサス配列に特異的に結合して転写を活性化する (20, 25, 26) (Fig.2)。その他、この XRE 配列は、ダイオキシン類によって誘導される NAD(P)H: quinone oxidoreductase、glutathione-S-transferase Ya subunit、UDP-glucuronosyltransferase 1A6 (UGT1A6) 遺伝子の発現調節領域にあることが知られており (27-29)、これは、AhR がこれらの遺伝子産物の誘導的発現調節機構に関与していることを示唆するものである。AhR ノックアウトマウスには催奇形成などのダイオキシンの毒性が認められないことから、これらの毒性には AhR が関与することが強く示

唆されている (30-32)。しかしながら、高用量での肺や肝臓のネクロシスは認められることから、AhR 非依存的毒性の存在も示唆されている (33)。また、ダイオキシン類の毒性に対する感受性には、著しい種差があり、その毒性は非常に多面的であることから、AhR が介在する機構が端緒であるとしても、その生化学的影響には、未解明な点が多く残されているのが現状である。

ダイオキシン類は、動物の胎児に対して、胎児毒性や催奇形性などの毒性を示すことが知られており、胎生期における暴露が危惧されている (9,34)。基底膜 (basement membrane, BM) は、胎生期に最も早く出現する細胞外マトリックスであることから、ダイオキシン類による影響に興味をもたれる。基底膜は上皮、内皮細胞層の直下、あるいは血管や神経細胞の周囲を囲み、それらと結合組織の間を区切っているタンパク質のシートであり、細胞は基底膜の支持作用と濾過作用によっていち早く自己の内部環境を確保する (35)。また、ダイオキシン類の毒性には皮膚障害、腎障害が知られており (34)、表皮-真皮接合部の基底膜および腎臓糸球体基底膜に何らかの影響を及ぼしている可能性もある。

そこで、本研究では、基底膜に着目し、その主要構成成分であるラミニン (Laminin) へのダイオキシン類の影響に関する研究を

行った。細胞外マトリックスは細胞「間」マトリックスとも呼ばれ、その名のとおり細胞と細胞の間を埋めている構造、物質を指し、多細胞動物において生体を構成する要素の一つである (36)。これまで細胞外マトリックスは、細胞の正常な機能発現において重要な役割を果たすとは考えられておらず、それどころか、悪くすれば細胞機能にとっての無用の長物として捉えられてきた。しかし、多くの研究によって、細胞外マトリックスが多細胞生物の生命活動に不可欠の機能を果たしていることが示されている (37-39)。また、成長因子やホルモンなどとの選択的な相互作用も有し (40,41)、細胞膜上のレセプターを介した細胞接着シグナルの伝達にも関与している (42,43)。このように細胞外マトリックスの果たす役割は多岐にわたっている。また、多くの疾患が細胞外マトリックスの異常によることが明らかにされつつあり (45)、それは、単に細胞間の構造体というだけでなく、細胞間の相互作用を調節する因子であると理解されるに至っている。

Laminin は、基底膜に特異的に発現する細胞外マトリックス成分であり (46)、基底膜構成成分を豊富に含有するマウスの Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) 腫瘍より初めて精製された (47)。Laminin は、 α 、 β 、 γ 鎖からなるヘテロ 3 量体で、分子量約 90 万

の巨大分子である (47-49)。電子顕微鏡で見ると、3つのサブユニットが3本鎖コイルドコイル部分で会合し (50)、特徴的な十字架構造をしている (51) (Fig. 3)。各鎖にはそれぞれ isoform が存在し、5種類の α 鎖 ($\alpha 1 \sim \alpha 5$)、3種類の β 鎖 ($\beta 1 \sim \beta 3$)、2種類の γ 鎖 ($\gamma 1, \gamma 2$) (53-66) が知られている。その組み合わせにより、現在までに11種の会合体 (laminin-1~11) が報告され、laminin family を形成している (67) (Table 1)。また最近、精巣の間質細胞 (Leydig cells) や腎臓の毛細管、細動脈に特異的に発現している $\gamma 3$ などの新規構成鎖の存在も確認されている (82)。Laminin の機能は非常に多彩で、細胞接着、細胞の運動、分化、増殖、器官形成、神経網再生、血管新生、創傷治癒、がんの増殖転移などにも深く関わっている (83-86)。Laminin などの細胞外マトリックス成分の発現調節には TGF- β (87, 88)、INF- γ (89)、IL-1 β (90) などの様々な増殖因子やサイトカイン、T3 や T4 などのホルモン (91, 92) などが複雑に相互作用している。また、様々な基底膜でそれを構成する laminin の組成は異なっており、各鎖は組織特異的あるいは発生の各段階で特異的に発現しており (93-95)、基底膜の生化学的および形態学的な多形性に対して、異なる役割を担っていると考えられている (67)。このような事実が細胞外マトリックス成分の研究を困難に

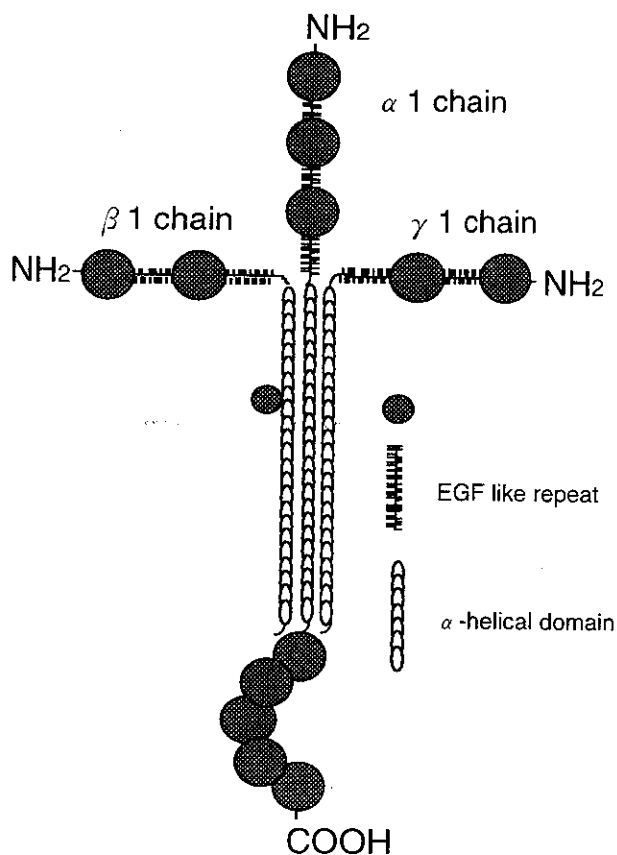


Fig. 3 Structure model of laminin-1
(Ref. 52より改変)

している理由の一つである。ダイオキシンが、細胞外マトリックス成分、laminin に及ぼす影響を調べた研究としては、laminin に対する抗体を使って蛍光組織染色したものがあり、TCDD 処理によりマウス腎臓の蛍光強度が減少すると報告されている (96)。

1992 年に Skakkebaek らにより、初めてヒトの精子数減少に関する衝撃的な報告 (97) が発表され、その原因が環境ホルモンである可能性が指摘されて以来、現在に至るまで、賛否両論様々な議論がかわされてきた。精子数減少の原因が環境ホルモンであると考えられる一つの理由は、精子の形成には、精細管外

Table 1 Laminin family

name	composition	distribution	reference
laminin-1	$\alpha 1 \beta 1 \gamma 1$	kidney, fetal brain, retina, blood vessel,	(47)
laminin-2	$\alpha 2 \beta 1 \gamma 1$	skeletal muscle, heart, placenta, fetal mesenchyme	(68-71)
laminin-3	$\alpha 1 \beta 2 \gamma 1$	synapse ganglion, glomerular BM	(72-74)
laminin-4	$\alpha 2 \beta 2 \gamma 1$	Schwann sheath, placenta	(75)
laminin-5	$\alpha 3 \beta 3 \gamma 2$	epithelium (hemidesmosome)	(76)
laminin-6	$\alpha 3 \beta 1 \gamma 1$	epithelium	(77)
laminin-7	$\alpha 3 \beta 2 \gamma 1$	epithelium	(77)
laminin-8	$\alpha 4 \beta 1 \gamma 1$	blood vessel endothelial cell, blood platelets	(52, 78)
laminin-9	$\alpha 4 \beta 2 \gamma 1$	blood vessel endothelial cell, adult extrasynapse	(52, 79)
laminin-10	$\alpha 5 \beta 1 \gamma 1$	anterior segment of eye	(80)
laminin-11	$\alpha 5 \beta 1 \gamma 2$	glomerular BM, neuromuscular synaptic cleft, placenta	(81)

$\alpha 1$ chain was named A or Ae; $\alpha 2$, M or Am; $\alpha 3$, 200kDa or (processed)165kDa. $\beta 1$ chain was named B1 or B1e; $\beta 2$, S or B1s; $\beta 3$, 140kDa. $\gamma 1$ chain was named B2 or B2e; $\gamma 2$, B2t.

部の間質細胞 (Leydig cell) から分泌されるテストステロンを含め、様々なホルモンが関与することが挙げられている (100)。これら上皮細胞の裏打ちをしている基底膜が、これらの症状に関わっている可能性は充分にある。AhR と、精子形成障害が起こるためである。欠損マウスを用いた実験では、AhR -/- マウス (98)。また動物実験で、妊娠中に胎児内のエストロゲンレベルが高まると、精細管内で精子の産出を調整する Sertoli cell の増殖が抑制され、成長後に雄が産出する精子数が減少するというデータが報告されたことも理由として挙げられる (99)。世界的規模の汚染が問題になっているダイオキシン類も、

この環境ホルモンの一つに分類されていることからダイオキシン類の精巣への影響には興味をもたれる。

ダイオキシン類の毒性として、マウスやラットなどに特徴的に見られる症状の一つに、動物の胎児などに対する催奇形性の発生などがある (9, 10)。腎臓における症状としては、水腎症が知られており (34)、その原因としては、ダイオキシン類によって尿

思われることから、AhR にレスポンスする XRE 配列を遺伝子発現調節領域に持つタンパク質をコンピューター解析^{*2}で調べ、laminin γ 1 鎖遺伝子上流域に XRE 様の配列を見い出した。

以上のような背景から、本研究では PCB126 処理が基底膜タンパク質 laminin に及ぼす影響について研究を行った。ダイオキシン類は、内分泌攪乱物質として、精子数減少、生殖異常、継世代的障害などの生体影響を及ぼすことから (104-106)、まず、培養細胞系を用いて、PCB126 が雄性生殖細胞の laminin タンパク質へ及ぼす影響を検討した。次に、PCB126 処理がラット腎臓の laminin に及ぼす影響に着目し、検討を行った。さらに、laminin などの細胞外マトリックス成分を分解するメタロプロテイナーゼに及ぼす影響についても検討した。

2. 方法・結果

PCB126処理のlamininへの影響 —培養細胞系を用いた検討—

マウス精巣Sertoli細胞 (TM4)を用いた検討

精巣に対する PCB126 の影響を検討する目的で、Sertoli 細胞 (TM4) および Leydig 細胞 (LC540)を用い、各々の細胞における laminin

の発現量の評価を特異的抗体を用いた western blotting により行った。なお、western blotting における一次抗体としては laminin-1 (α 1 β 1 γ 1)を認識するポリクローナル抗血清および γ 1 鎖を認識するモノクローナル抗体 (IgG₁)を用いて、各々検討を行った。

多くの生殖系の異常に関して、胎生期の発生および分化は、成長の著しい時期に影響を受けやすいことが動物実験で証明されている (104-106)。そこで Sertoli 細胞 (TM4) はおよそ 70% コンフルエントに達するまで増殖させた細胞に対し、PCB126 処理を行った。PCB126 濃度は 100 nM とした。この濃度は、HSP70 および HSP90 を Leydig 細胞で強く誘導する濃度である (102)。100 nM PCB126 処理は 1、5、12 および 24 時間と変えて、ハーベストした。コントロールには、DMSO を同時処理したものを用いた。ハーベスト後、phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF) 存在下でソニケーションし、western blotting のサンプルとした。また、血清による影響を最小限に抑え、PCB126 の影響をより確実に検討するため、PCB126 処理前 24 時間は培地中のウマ血清 (HS) および ウシ胎児血清 (FBS) を、通常の 7.5% から 1% に下げて培養させた。Sertoli 細胞 (TM4) に用いる血清は、活性炭処

^{*2} コンピューター解析

Molecular Bioinformatics of Gene Regulation (<http://transfac.gbf.de/>) にアクセス。Transfac-Programs to search for binding sites and more の MatInspector (103) により解析を行った。また、解析した Gene は以下の通り。カッコには GeneBank accession number を示す。

laminin γ 1 (P11047)

理をした charcoal-stripped serum を用い、5% HS と 2.5% FBS で計 7.5% とした。本実験における細胞の形態的な変化は、光学顕微鏡下においては認められなかった。

初めに、一次抗体として laminin-1 全体を認識するポリクローナル抗血清を用いた結果を Fig. 4 に示した。Laminin は α 、 β 、 γ の 3 つのサブユニットより構成されており (47)、laminin-1 ($\alpha 1 \beta 1 \gamma 1$) における各構成鎖の分子量は、 $\alpha 1$ 鎖が約 400 kDa、 $\beta 1$ および $\gamma 1$ 鎖が約 200 kDa であり、 $\beta 1$ および $\gamma 1$ 鎖の分子量は 10 kDa 異なる (107, 108)。よって、Fig. 4 に矢印で示すように、低分子量のバンドが laminin $\gamma 1$ 鎖、高分子量のバンドが $\beta 1$ 鎖であると考えられる。Fig. 4 に示すように、両鎖において、どの暴露時間においてもコントロール (DMSO 処理) と PCB126 処理の間に有意

な差はなく、顕著な変化は観察されなかった。なお、使用した Sertoli 細胞 (TM4) はマウス由来であり laminin $\gamma 1$ 鎖に対するモノクローナル抗体は、このマウスの laminin $\gamma 1$ 鎖との交叉性が無いため、western blotting は行っていない。

ラット精巣Leydig細胞 (LC540)を用いた検討

Leydig 細胞 (LC540) を用いて、PCB126 が laminin の発現量に及ぼす影響を検討した。PCB126 の濃度は 100 nM とし、Leydig 細胞 (LC540) に PCB126 を暴露させた。PCB126 処理前 24 hr は培地中のウシ胎児血清 (FBS) を、通常の 10% から 1% に下げて培養させた。PCB126 処理時間は 1、6、12 時間と変えて、ハーベストし

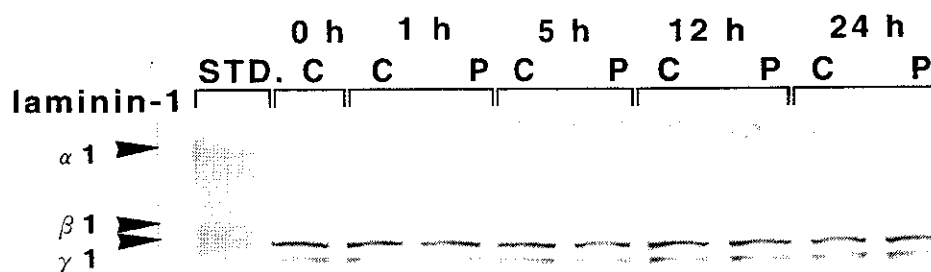


Fig. 4 Time course of laminin content following PCB126 exposure in mouse TM4 cells.

TM4 cells were exposed to 100 nM PCB126 and harvested at the indicated times thereafter (denoted as "P"). Control experiment (denoted as "C") for each time point was carried out using vehicle (DMSO). Cells were homogenized and then, sample (10 μ g protein) was subjected to SDS-PAGE (5-20% polyacrylamide gel density gradient) and immunoblotted with anti-mouse laminin-1 antiserum. Bands denoted left side arrows represent laminin $\alpha 1$, $\beta 1$ and $\gamma 1$ chains, respectively. Std., laminin-1 (50 ng) from EHS tumor.

た。コントロールには、DMSO で同時間処理したものを用いた。ハーベスト後、PMSF 存在下でソニケーションし、western blotting のサンプルとした。

Fig. 5 (A) に、一次抗体として laminin-1 に対するポリクローナル抗血清を用いて western blotting を行った結果を示す。Fig. 5 (A) には約 200 kDa の位置に 3 本、もしくはそれ以上のバンドが確認できたが、それらのバンドが laminin-1 のどの構成鎖にあたるのかは同定できなかった。スタンダードの laminin-1 のバンドの位置から判断すると、最も強いバンド強度を示すものが laminin γ 1 鎖と推定できた。また、分子量 200 kDa 以上に laminin α 1 鎖と思われるバンドが確認

された。しかしながら、Leydig 細胞 (LC540) を用いた場合も Sertoli 細胞 (TM4) の場合と同様、PCB126 処理によって laminin-1 各構成鎖の発現に顕著な変化は見られなかった。 γ 1 鎖に対するモノクローナル抗体を用いた

Fig. 5 (B) においては、弱いながら laminin γ 1 鎖のバンドが見られるが、PCB126 処理によって laminin γ 1 鎖の発現量には影響は認められなかった。

PCB126処理のlamininへの影響 —ラットを用いたin vivoでの検討—

一般的毒性指標

腎臓は脊髄の両側、腹膜の後ろに位置し、ソラマメの形をした左右一対からなる実質性の臓器である。大きく分けて皮質と髓質から

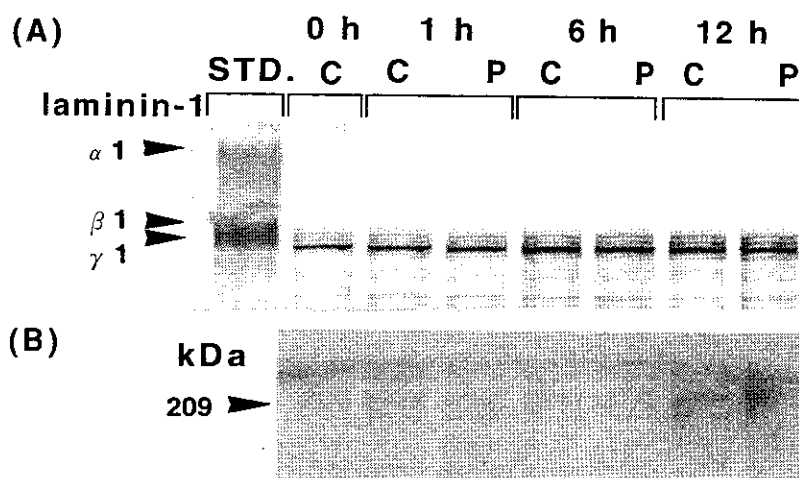


Fig. 5 Time course of laminin content following PCB126 exposure in rat LC540 cells.

LC540 cells were exposed to 100 nM PCB126 and harvested at the indicated times thereafter (denoted as "P"). Control experiment (denoted as "C") for each time point was carried out using vehicle (DMSO).

Cells were homogenized and then, sample (10 μ g protein) was subjected to SDS-PAGE (5-20% polyacrylamide gel density gradient) and immunoblotted with anti-laminin-1 antiserum (A) or anti-laminin γ 1 chain antibody (B). Bands denoted left side arrows represent laminin α 1, β 1 and γ 1 chains, respectively. Std, laminin-1 (60 ng) from EHS tumor.

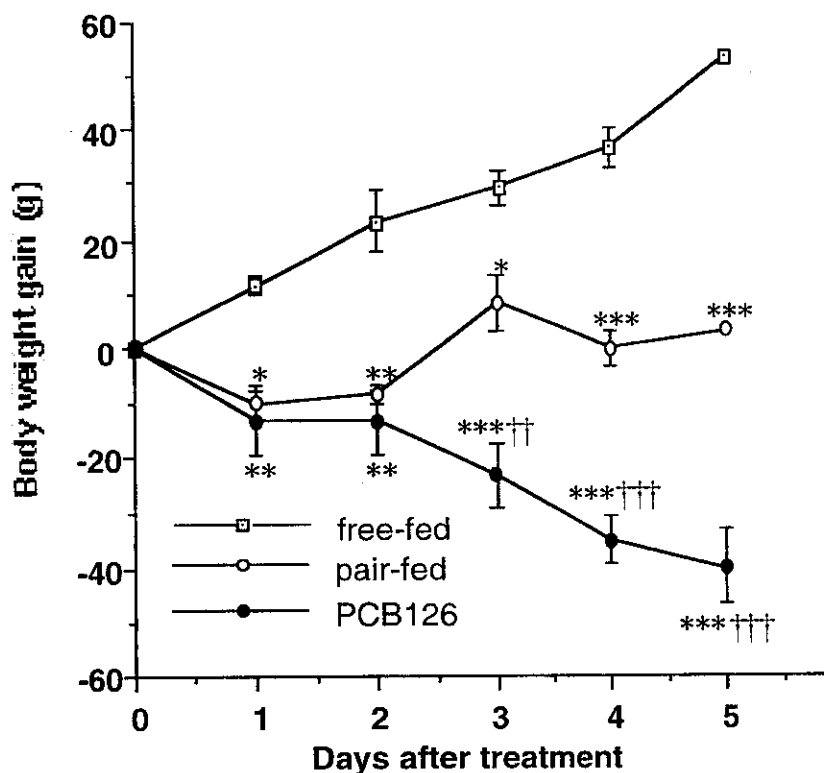


Fig. 6 Effect of PCB126 treatment on the body weight gain of rats.

Significantly different from free-fed controls: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

Significantly different from pair-fed controls: †, $p < 0.01$; ††, $p < 0.001$

The values represent the means $\pm$ S.E.

なり、生体にとっての不要物、有害な代謝物などは主に腎臓において血液から尿中に排泄される。腎臓は多数のネフロンという腎単位からなり、一つのネフロンは、糸球体 - ボーマン嚢 - 近位曲尿細管 - ヘンレのループ (わな) - 遠位曲尿細管から構成される。腎臓における尿生成の第一段階は糸球体による血液のろ過である。糸球体によるこの機能は、糸球体血管壁にある糸球体基底膜と呼ばれる細胞外マトリックスが中心的役割を担っていると考えられている (109)。

そこで、PCB126 の in vivo での影響を知る目的で、PCB126 処理ラット腎臓および

精巢の基底膜成分 laminin について調べた。

PCB126 処理によって、摂餌量が減少することから、PCB126 処理群の摂餌量に対する pair-feeding を行ったコントロール群 (pair-fed コントロール群) と、自由に飼料摂餌させたコントロール群 (free-fed コントロール群) の2つのコントロール群を設けて、western blotting による検討を行った。

初めに、ラットに認められた PCB126 の毒性について述べる。動物には、4 週令 Wistar 系雄性ラットを用い、PCB126 投与後の体重変化を free-fed および pair-fed の両コントロール群と比較した。PCB126 の投与量は 10 mg/kg とし、これを腹腔内単回投与した。

ダイオキシン類の特徴的な毒性の一つとして、体重が徐々に減少していく *wasting syndrome* が知られている (18, 21)。Fig. 6 に PCB126 投与後の経日的体重変化を示す。体重変化は投与日を 0 日とし、その後屠殺するまでの 5 日間を調べた。PCB126 処理群、および pair-fed コントロール群には摂餌量の減少とともに、free-fed コントロール群との有意な体重増加抑制が認められ、摂餌量の減少が体重に及ぼす効果は大きいと考えられる。しかし、腎臓および精巣の湿重量の変化は大きくなかった (データ未掲載)。

また、PCB126 の主要蓄積臓器である肝臓においては、その代表的な症状である脂肪肝が観察され、これらの結果から、PCB126 による急性毒性が現れた状態であることを確認した。

ラット腎臓および精巣の laminin への影響

PCB126 によりラット腎臓および精巣の laminin が、タンパク質レベルで変動するかどうかを解明する目的で、western blotting による検討を行った。一次抗体はポリクローナル抗 laminin-1 抗血清および、ポリクローナル抗 laminin γ 1 抗血清を用いて行った。

まず、ポリクローナル抗 laminin-1 抗血清を用いて western blotting を行った結果を Fig. 7 に示す。Fig. 7 (A) にはサンプルとしてラット腎のホモジネート、(B) には精巣の臓器ホモジネートを用いた結果を示した。Laminin の各構成鎖には組織特異的な発現が認められているが (93-95)、laminin-1 の構成鎖である β 1 および γ 1 は腎臓に発現していることが知られている (100, 110)。よって、Fig. 7

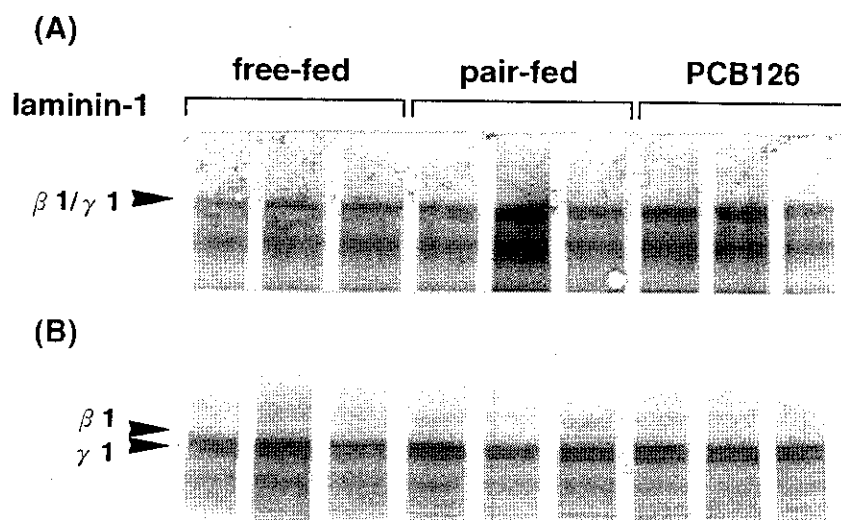


Fig. 7 Western blot analysis of laminin-1 in kidney and testis of rats treated with PCB126.

Kidney (A) and testis (B) homogenate (40 μ g protein) from free-fed controls, pair-fed controls, and PCB126-treated rats was subjected to SDS-PAGE (5-20% polyacrylamide gel density gradient) and immunoblotted with anti-laminin-1 antiserum.

(A)におけるバンドは $\beta 1$ および $\gamma 1$ 鎖のどちらに由来するものかは識別することができなかった。ラット腎臓および精巢において、このように laminin-1 に対するポリクローナル抗血清での western blotting の結果からは、PCB126 処理群と free-fed および pair-fed 両コントロール群の間で、laminin の発現には顕著な差は認められなかった。次に、モノクローナル抗 laminin $\gamma 1$ 鎖抗体を用い、ラット腎ホモジネートをサンプルとした結果を Fig. 8 (A) に示す。分子量約 200 kDa に見られる $\gamma 1$ 鎖の発現には、あまり変化がなかったものの、約 70 kDa 付近のバンドが PCB126 処理によって著しくその強度を

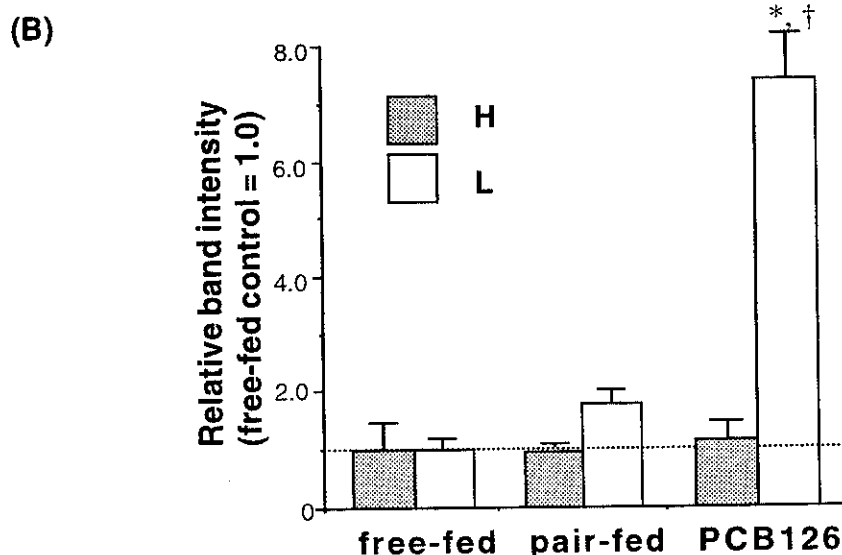
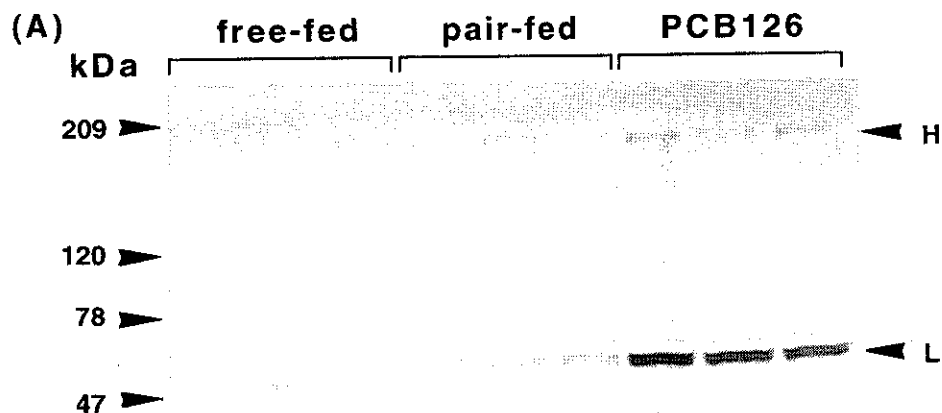


Fig. 8 Western blot analysis of laminin $\gamma 1$ chain in kidney of rat treated with PCB126.
 (A) Kidney homogenate ($40 \mu\text{g}$ protein) from free-fed controls, pair-fed controls, and PCB126-treated rats was subjected to SDS-PAGE (5-20% polyacrylamide gel density gradient) and immunoblotted with anti-laminin $\gamma 1$ chain antibody. (B) The laminin $\gamma 1$ level was estimated by the density of the anti- $\gamma 1$ chain immunoreactive band. The values represent the means $\pm$ S.E. relative to the free-fed controls (1.0).
 Significantly different from free-fed controls: *, $p < 0.001$
 Significantly different from pair-fed controls: †, $p < 0.001$

増していることがわかった。Fig. 8 (B) に これら MMPs のうちの MMP-2 によって、
は、free-fed コントロール群の高分子量 (H) Laminin-5 ($\alpha 3 \beta 3 \gamma 2$) の $\gamma 2$ 鎖が分解され、 γ
および低分子量 (L) の 2 つのバンド強度をそ 2x と呼ばれるフラグメントになるということ
れぞれ 1 としたときの、3 群におけるバンド が報告された (113)。

強度を定量化して示した。グラフで示すよ そこで、laminin $\gamma 1$ 鎖に対する抗体に交叉
うに、PCB126 処理群のバンド強度は低分子 性を示す分子量約 70 kDa のバンドの、
量のバンドにおいては free-fed コントロール PCB126 処理による増加における MMPs の関
群の 7 倍以上、pair-fed コントロール群と比 与を調べるため、gelatin zymography による検
較しても約 4 倍のバンド強度の増加が認め 討を行った。Fig. 10 に、その結果を示す。分
られた。これに対し、精巣における laminin 子量約 60 から 70 kDa の間に 2 つ、90 kDa 付
 $\gamma 1$ 鎖の発現には顕著な変化はなかった 近に 2 つ、および 107 kDa 以上の高分子量に
(Fig. 9)。

ラット腎臓の matrix metalloproteinases (MMPs) への影響

Laminin などの細胞外マトリックスを分解す 幅広くゼラチンが消化されたと思われる、
る酵素として、活性中心に Zn^{2+} を有するマ バックグラウンドに対して比較的強度の強い
トリックスメタロプロテイナーゼ群 (matrix ネガティブバンドが見られた。PCB126 処理
metalloproteinases, MMPs) が知られてお 群においては、高分子量のバンドが free-fed お
り、細胞外で活性化され約 10 kDa 低分子量の よび pair-fed コントロール群に比較して、より
(111)。MMPs は潜在型酵素として分泌さ 幅広くなっているのが見てとれた。MMPs に
れ、細胞外で活性化を受ける (112)。最近、 は不活性型前駆体 (proMMPs) が知られてお
チン分解能をもち、gelatin zymography によっ

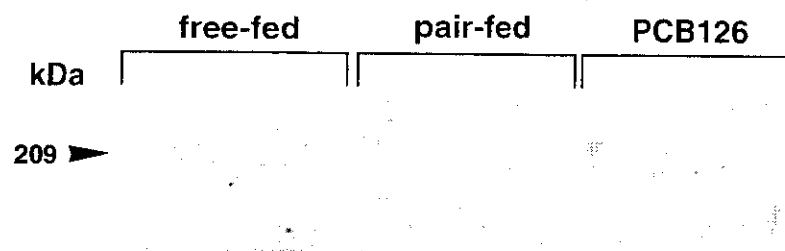


Fig. 9 Western blot analysis of laminin $\gamma 1$ chain in testis of rat treated with PCB126.

Testis homogenate (40 μ g protein) from free-fed controls, pair-fed controls, and PCB126-treated rats was subjected to SDS-PAGE (5-20% polyacrylamide gel density gradient) and immunoblotted with anti-laminin $\gamma 1$ chain antibody.

て検出される。Fig. 10 において見られるバンドは、MMP-9 (gelatinase B, 92/67 kDa)、MMP-14 (membrane type 1 MMP, MT1-MMP, 66/60 kDa)、MMP-16 (MT3-MMP, 64/55 kDa)、である可能性があるが、それを特定するまでには至らなかった。

また、MMPs のうちの MMP-2 (gelatinase A)、MMP-3 (stromelysin-1) については、ポリクローナル抗 MMP-2 および MMP-3 抗体 (IgG) を用いて western blotting による検討を行ったが、PCB126 処理によって有意に増加、もしくは減少するバンドは確認できなかった (データ未掲載)。

3. 考察

PCB126処理のlamininへの影響 —培養細胞系を用いた検討—

マウス精巣 Sertoli 細胞 (TM4) およびラット精巣 Leydig 細胞 (LC540) の laminin の発現量は、PCB126 によって影響を受けなかった。

精巣は精子形成を行う雄性生殖にとって重要な器官である (114)。精巣は多数の迷路のような直径 150-300 μm の精細管がうねっており、その壁で精子形成が行われる。精細管の壁は原始生殖細胞と Sertoli 細胞で形成され、精細管と精細管の間には毛細血管と Leydig 細胞があり、

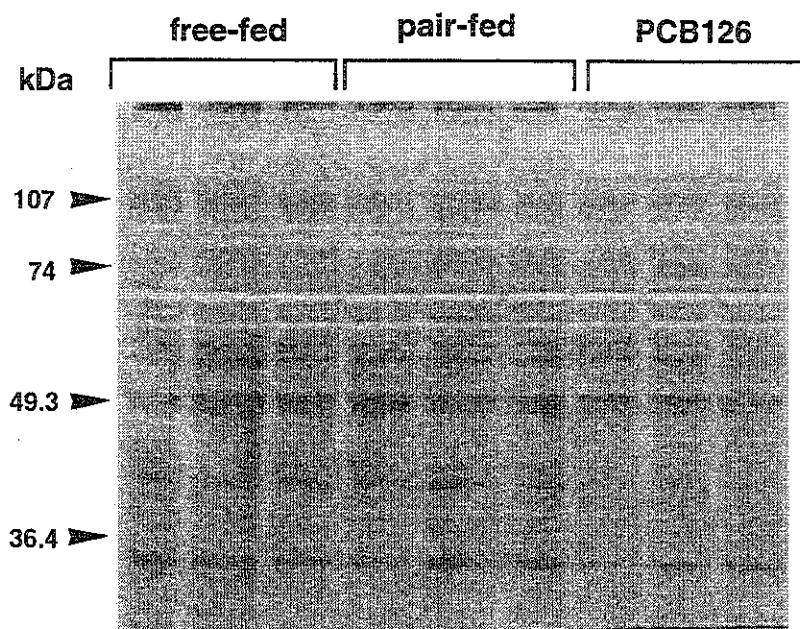


Fig. 10 Gelatin zymography analysis of MMPs in kidney of rats treated with PCB126.

Kidney homogenate (40 μg) from free-fed controls, pair-fed controls and PCB126-treated rats was subjected to nonreducing SDS-PAGE (10% polyacrylamide gel). Gelatinolytic activity present in the kidney homogenate was determined by zymography after 24 h incubation in the reaction buffer.

Leydig 細胞は血中へテストステロンを分泌する。精巣には Sertoli 細胞や Leydig 細胞をはじめ、マクロファージ、筋様細胞など、タイプの異なる細胞群が存在するが、精子形成にはこの Sertoli 細胞と Leydig 細胞が重要な働きをしていると考えられている (115)。Sertoli 細胞は、精細管上皮のなかに一定の間隔をおいて存在する柱状の細胞で、生殖細胞 (精細胞) が分裂、移動する際のよりどころとなると同時に、これらの細胞を養育する役割を担うため、支持細胞とも呼ばれる (116)。また、密着結合でつながることにより、血管精巣関門をつくり、管内腔側への物質交換を制限している (117)。また、精巣間組織の一つである Leydig 細胞は、全精巣のわずか 3.1% を占めるにすぎないが (118)、雄性分化の重要因子であるテストステロンの大部分を、コレステロールを原料としてステロイド合成系の 4 つの酵素によって産生している (119)。

胎生期における生殖器発生過程において、内性器は Wolff 管、Müller 管より形成されるが、Wolff 管は Leydig 細胞より分泌されるテストステロンにより、精巣上体、輸精管、精嚢に分化する。一方、Müller 管は、精巣の Sertoli 細胞により分泌される Müller 管抑制物質 (Müllerian inhibiting substance, MIS) の作用により退縮する。さらに、雄の外性器はテストステロンから変換されたジ

ヒドロテストステロンの作用により分化が起こる。これらの細胞より産生される、雄性生殖に重要な二つの因子、テストステロンおよび MIS の発現は steroidogenic factor-1 (SF-1) により制御されている (120)。

精子形成過程においても、この 2 つの細胞は相互に作用し合い、重要な役割を担っている。視床下部で生産される性腺刺激ホルモン放出ホルモン (LH-RH もしくは GnRH) は律動分泌を一つの調節信号として (121) 下垂体での性腺刺激ホルモン (LH および FSH) 生成と分泌を促進する。LH は精巣 Leydig 細胞の細胞膜レセプターを介してテストステロンの生成を促進する。テストステロンは FSH とともに精細管に作用し造精機能を導入、維持する。Sertoli 細胞は Leydig 細胞の LH に対する感受性を増強し、またテストステロンが精細管周囲の筋様細胞を刺激すると Sertoli 細胞の分化と機能発現を促進する Sertoli 細胞調節因子 (P - Mod-S) を分泌するという一種の positive feedback を行う (115)。

Laminin は各組織において基底膜特異的に発現している糖タンパク質であり、組織の分化、形態形成に伴って発現量が変化する (122)。そのため、Sertoli 細胞および Leydig 細胞と laminin に関する研究は、免疫染色法による組織分布を調べた報告が多い (108, 123, 124)。また、Sertoli 細胞および Leydig 細胞は laminin の細胞膜レセプターである

integrin の $\alpha 1$ および $\alpha 6$ サブユニットを発現しており (125, 126) これらのレセプターを介して細胞の機能、形態を調節しているものと思われる。事実、laminin によりコートされたプレート上で Sertoli 細胞を培養させると、細胞が精巣内における cord 様の形態をとり、それは抗 laminin 抗血清により阻害される (127)。一方、Ulisse らはダイオキシン類の代表的な標的組織の一つである甲状腺より分泌されるホルモン、T3 をラット思春期前の Sertoli 細胞に処理しても、分泌される laminin のタンパク質および mRNA レベルにおいて変化はなかったと報告している (91)。Sertoli 細胞 および Leydig 細胞においては、ダイオキシン類の毒性へのレスポンスとして laminin への影響の寄与は少ないのかもしれない。

精子形成にとって重要な Sertoli 細胞 (TM4) と Leydig 細胞 (LC540) への PCB126 の影響を laminin に着目して調べたが、そのタンパク質レベルにおける変化は見られなかった。用いた PCB126 の濃度 100nM は、Leydig 細胞で HSP70 および HSP90 を強く誘導する用量である。いずれの細胞でも laminin の発現は、12 時間後においても、対照と比べて変化がなかった。HSP70 誘導のレスポンスが惹起されるまでの時間は、30 分であったことを考えると、PCB126 のようなダイオキシン類によって、少なくとも

in vitro では、精巣の laminin の発現は影響を受けないものと推察される。

PCB126 処理の laminin への影響 — ラットを用いた in vivo での検討 —

PCB126 処理によりラット腎においてモノクローナル抗 laminin $\gamma 1$ 鎖抗体と特異的に交叉する分子量約 70 kDa のバンドが増加することを見出した。また、このタンパク質は、MMP-2 あるいは MMP-3 による laminin $\gamma 1$ 鎖の分解産物である可能性は低いことがわかった。

モノクローナル抗マウス laminin $\gamma 1$ 鎖抗体と特異的に交叉する、分子量約 70 kDa のバンドが、腎臓において、ダイオキシン類の一種である PCB126 により増加してきた理由としては、いくつかの理由が考えられる。まずは、PCB126 によって laminin (フラグメント) が誘導されてきたという可能性がある。コンピューターを用いた解析により laminin $\gamma 1$ 鎖のプロモーター領域にいくつかの XRE とアサインされる領域が見つかったことは非常に興味深く、この可能性を示唆するものである。

Laminin $\gamma 1$ 鎖の転写レベルでの発現調節においては、いくつかの転写因子の関与が示唆されているが (128)、中でもよく調べられているのは NF- κ B による転写制御である。IL-1 β によって、培養ラット糸球体上皮細胞の