

厚生労働科学研究費補助金

食品・化学物質安全総合研究事業

コプラナーPCBの非ダイオキシン毒性の識別による
ダイオキシン耐容摂取量の設定の在り方に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 遠山 千春
((独)国立環境研究所 環境健康研究領域)

平成15(2003)年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
コプラナーPCBの非ダイオキシン毒性の識別によるダイオキシン耐容摂取量の 設定の在り方に関する研究	1
遠山 千春 ((独)国立環境研究所 環境健康研究領域長)	
II. 分担研究報告	
1. ヒト型ダイオキシン受容体ノックインマウスの薬剤感受性に関する研究	12
山本 雅之 (筑波大学・基礎医学系・教授)	
2. ポリ塩素化ビフェニルの甲状腺ホルモンへの影響とそのメカニズム	17
遠山 千春 ((独)国立環境研究所 環境健康研究領域長)	
3. コプラナーPCB (PCB126、PCB77) および非コプラナーPCB (PCB153) の レチノイド代謝に及ぼす影響	33
遠山 千春 ((独)国立環境研究所 環境健康研究領域長)	
4. PCB169の免疫毒性の評価	52
遠山 千春 ((独)国立環境研究所 環境健康研究領域長)	
5. PCBとTCDDの脳の発達への影響の比較解析	66
前田 秀一郎 (山梨大学医学部生化学 (1) 教授)	
6. ダイオキシン/PCBの毒性に関わる遺伝子の網羅的解析法の確立と応用	72
宮本 薫 (福井医科大学生化学 (2) 教授)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	76

コプラナーPCBの非ダイオキシン毒性の識別によるダイオキシン耐容摂取量の
設定の在り方に関する研究

主任研究者 遠山千春
独立行政法人国立環境研究所環境健康研究領域 領域長

研究要旨

本研究は、コプラナーPCBが有するTCDD 毒性と非 TCDD 毒性をアリール炭化水素受容体(AhR)依存性の毒性に着目し、動物実験により識別することにより、ダイオキシン類とPCBの毒性の基本的知見の充実のみならず、ダイオキシン類の耐容摂取量の設定のための情報の獲得を目的としている。そのため、AhR欠損マウスやヒト型AhRノックインマウスなどに、TCDD、コプラナーPCB（PCB77、PCB126、PCB169）及び非コプラナーPCB（PCB153）を曝露することによって、生殖機能、甲状腺ホルモン、レチノイド代謝、免疫系に対する影響を指標として、毒性の現れ方を検討し、TCDD毒性と非TCDD毒性とを識別することを試みた。さらに、脳への影響について、TCDDに依存する遺伝子発現の組織局在性を指標とした作用の一端を明らかにした。インハウスのDNAマイクロアレイの確立し、特定指標を規定する遺伝子レベルの発現を調べるための方法を確立した。

分担研究者

宮本 薫 福井医科大学 生化学 教授
前田秀一郎 山梨大学医学部 生化学 教授
山本雅之 筑波大学 TARA センター 教授

A はじめに

ダイオキシン特別措置法が制定され、燃焼に伴う環境への放出量は激減しているが、食品に蓄積するダイオキシン類の削減は容易ではなく、食事を介して取り込まれるダイオキシン量は、当面、横ばいと予想される。コプラナーPCBを含むダイオキシン類への曝露にともない、小児の出生体重、学習機能、甲状腺機能、免疫機能に影響が出ているとのコホート研究は、WHO 等によるダイオキシン耐容一日摂取量の設定の際にも考慮された。他方、このダイオキシン類による影響は 2,3,7,8-TCDD (以下、TCDDと略す)

特異的な毒性ではなく、コプラナーPCBの非TCDD毒性による可能性も指摘されている。そこで、本研究においては、コプラナーPCBのもつTCDD毒性とPCB特有の非TCDD毒性の現れ方を、TCDD特異的毒性に対して感受性の異なる遺伝的背景をもったアリール炭化水素受容体(AhR)ノックアウトマウスをはじめ、感受性が異なる様々なマウスを活用して、個体、細胞、遺伝子のレベルで識別することを目的としている。

今年度は、ヒト型AhRをノックインしたマウスを作成して、AhRの亜型による感受性の違いを検討した。次に、各種PCB化合物を投与した動物を用

いて非2,3,7,8-四塩素化ジベンゾ-*p*-ジ
オキシン(TCDD)毒性のうち、甲状腺と
レチノイド代謝、ならびに免疫機能へ
の影響を明らかにするための研究を
行った。さらに、PCB異性体を用いた
検討をする前段階として、TCDD毒性
の典型例として、脳における特定の遺
伝子発現とその局在性、ならびに自家
製マイクロアレイをの確立を行った。

B. 研究目的

B-1. ヒト型AhRノックインマウ スの作成とこれを用いたTCDD毒 性の解析 (分担研究者: 山本雅之)

ダイオキシン受容体(AhR)は細胞
質に存在しており、ダイオキシン類は
芳香族炭化水素をリガンドとして結
合すると核へ移行し、CYP1A1や
CYP1A2などの標的遺伝子の転写を活
性化する。AhRのダイオキシンに対す
る親和性は、動物種や系統により異な
っていることが知られており、ヒト型
AhRはマウスDBA/2のAhRと同様にリ
ガンドに対する親和性が低い。このこ
とから、ヒトにおけるダイオキシン類
の毒性発現の閾値は高いことが予想
されているが、実際にヒトに対して曝
露実験を行うことは不可能なので適
切な動物モデルの確立が望まれている。
本課題においては、AhRの親和性
が個体の反応性をどのように規定す
るか、また、ヒトAhRの反応特異性が
低親和性型のマウスDBA/2型AhRのそ
れとどのように異なるのかを明らか
にし、ヒトの反応性を検討するための
適切な動物モデルを確立するために、
ヒト型AhRをマウスAhR遺伝子座にノ
ックインしたマウスを作製し化学物
質に対するその反応性を検討した。

B-2. ダイオキシン類/ポリ塩素化 ビフェニル類の甲状腺ホルモンへの 作用メカニズム (主任研究者 遠山 千春)

PCBには、甲状腺ホルモンを低下さ
せる作用が知られており、そのメカニ
ズムの一つとして、PCB水酸化代謝物
のT4輸送タンパク、トランスサイレ
チン(TTR)への競争的結合が考えられ
ている。一方、TCDDは、Ahレセプ
ター(AhR)を介し、肝の
UGT1(UDP-glucuronosyltransferase)を
誘導し、サイロキシン(T4)のグルクロ
ン酸抱合を促進し、それによる胆汁へ
の排泄を促進することによって、T4
を低下させると考えられている。コプ
ラナーPCBには、ダイオキシン様作用
と非ダイオキシン様作用があること
から、甲状腺ホルモン抑制作用のメカ
ニズムを明らかにすることは、コプラ
ナーPCBを含めたダイオキシン類の
毒性等価量概念の精緻化のために必
要である。ここでは、TCDDの甲状腺
ホルモン抑制作用のメカニズムを確
認するためにAhレセプターノックア
ウトマウスを、ダイオキシン類の甲状
腺ホルモン抑制作用におけるラン
スサイレチン(TTR)の関与をTTRノ
ックアウトマウスを用いて検討した。

B-3. ダイオキシン類/ポリ塩素化 ビフェニル類のレチノイド代謝への 作用メカニズム (主任研究者 遠山 千春)

PCB中毒の皮膚症状がレチノイド
の欠乏症のそれと類似しており、PCB
が肝臓中のレチノイド濃度を低下さ
せることが報告されている。レチノ
イド濃度の低下に、血清中レチノール
の輸送蛋白質である Transthyretin (TTR)
に対して、PCBおよびその代謝産物が
競合的に結合することが推定されて
いる。また、TCDDはレチノイド代謝
を攪乱する作用があり、また AhR 欠
損マウスでは肝臓内にレチノイドが
貯留する事が報告されている。本実験
では TCDD のレチノイドに対する作
用機構を解明するために AhR および
TTR 欠損マウスを用いて TCDD 投与

実験を行った。さらに、PCB77、PCB126、PCB153を投与したTTR欠損マウスにおけるレチノイド代謝に及ぼす影響と、TCDD投与による毒性作用とそのメカニズムについて比較検討した。

B-4. コプラナーPCBの免疫系への作用 (主任研究者 遠山千春)

これまでの研究では、PCB類の免疫系への作用はそのAhR活性化能と正の相関を示し、すなわちTCDDの毒性を1とした場合のTEFが高いほど免疫系に対する作用が強いことが報告されている。コプラナーPCBのPCB126 (TEF0.1)とPCB169 (TEF0.01)はPCB類の中で高いTEFをもち、免疫系への作用が強いことが報告されているが、このうち特にPCB169については、T細胞非依存性抗原であるTNP抗原に対する抗体産生能を指標とした場合には、そのTEFが数十倍大きくなることが報告されている。

最近我々は、T細胞依存性抗原であるタンパク(卵白アルブミン、OVA)に対する抗体反応において、TCDDが抗体産生において重要な働きをするT細胞由来のサイトカイン産生を顕著に抑制するなど明らかにした。しかしながら、PCB169をはじめとするコプラナーPCBのT細胞依存性抗原に対するIgG抗体産生反応などについては、詳細な検討が行われていない。そこで本研究では、PCB169のT細胞依存性抗原に対する抗体産生反応への影響についてTCDDの影響と比較し、そのTEFの検討、およびPCB169がTCDDとは異なる作用を示すかどうか、すなわち非ダイオキシン様の作用について検討した。

B-5. PCBとTCDDの脳の発達への影響の比較解析 (分担研究者: 前田秀一郎)

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)は、疫学的にヒトの脳の発

達や高次機能に影響することが示唆されており、げっ歯類においては、脳神経系に種々の生化学的変化を惹起することが確かめられている。さらに、妊娠ラットへの投与が胎仔脳の形態や成長後の行動に影響することが報告されている。しかし、このような脳神経毒性が惹起される分子機構は未だ明らかでない。そこで、本研究では、TCDDの脳への毒性機構を明らかにし、それがPCBの脳への影響と、どのような異同を示すかを明らかにするために遂行する。

B-6. ダイオキシン/PCBの毒性に関わる遺伝子の網羅的解析法の確立と応用 (分担研究者: 宮本 薫)

コプラナーPCBの非ダイオキシン毒性の識別によるダイオキシン耐容摂取量の設定を行うためには、まずフォワードトキシコロジーの観点から、個体レベルの実験をもとにダイオキシン毒性の詳細を明らかにし、次にこの毒性メカニズムの分子基盤を解明する手段として、リバーストキシコロジーの観点から、遺伝子の網羅的解析を試みる。そのため、今年度は、インハウスのマイクロアレイを確立し、TCDD投与のラット胎盤における遺伝子発現の変化を明らかにすることを目的としている。

C 研究方法

C-1. ヒト型AhRノックインマウスの作成とこれを用いたTCDD毒性の解析 (分担研究者: 山本雅之)

マウスAhR遺伝子座に、hAhR cDNAを挿入することにより、マウスAhR遺伝子を破壊すると同時に、マウスAhR遺伝子のプロモーターの制御下でhAhR cDNAが転写されるように、ターゲティングベクターをデザインした。得られたマウスは、野生型C57BL6マウスへ戻し交配し、コンジェニック化を図った。

C57BL6 に純系化された hAhR ノックインマウス (hAhR マウス)、野生型 C57BL6 マウス (AhR^{b1} マウス)、C57BL6 の遺伝的背景に AhR^d を有するコンジェニックマウス (AhR^d マウス) の 3 系統を用いた。

3-メチルコラントレン (3-MC) と 2,3,7,8-TCDD 投与に対する肝臓での CYP1A1, CYP1A2 の発現誘導を RNA プロット解析により調べた。次に胎齢 12.5 日の時点で母体に TCDD を投与し、胎齢 18.5 日で胎児を解析し、口蓋裂の発生頻度と水腎症の発生頻度と重症度を形態学的に調べた。

C-2. ダイオキシン類/ポリ塩素化ビフェニル類の甲状腺ホルモンへの作用メカニズム (主任研究者 遠山千春)

TTR 欠損マウスを用いて TCDD および PCB 同族体の曝露にともなう T4 低下への TTR の関与について検討した。13 週齢の雌の野生型マウス、および TTR 欠損マウスに、PCB77 (50, 75 mg/kg BW)、PCB126 (1 mg/kg BW)、PCB153 (200 mg/kg) および TCDD (10, 20 µg/kg BW) を単回経口投与して、7 日後に血清および肝臓・胸腺を採取し、甲状腺ホルモン、関連遺伝子の発現解析、免疫組織学的検索を行った。

C-3. ダイオキシン類/ポリ塩素化ビフェニル類のレチノイド代謝への影響 (主任研究者：遠山千春)

今年度は、13 週齢の雌の野生型マウス、および TTR 欠損マウスに、PCB77 (50, 75 mg/kg BW)、PCB126 (1 mg/kg BW)、PCB153 (200 mg/kg) および TCDD (10, 20 µg/kg BW) を単回経口投与して、7 日後に血清および肝臓・胸腺を採取し、TCDD および PCB 同族体の retinoid 代謝への影響に対する TTR の関与について検討した。さらに、同マウスを用いてレチノイド代謝への影響を調べた。体内の vitamin

A の 80% 以上が肝臓に存在し、主として脂肪酸エステル (retinyl esters) の形で貯蔵されていて、retinyl esters はパルミチン酸エステル (retinyl palmitate) が最も多いことが分かった。本研究では retinol、retinyl palmitate とその他の retinyl esters のうち主要な 7 種を測定し、これらの合計を total retinoid とした。

C-4. コプラナーPCB の免疫系への作用 (主任研究者 遠山千春)

3,3',4,4',5,5'-六塩素化ビフェニル (PCB169)、または TCDD を、6 週齢の C57BL/6J 雌性マウスに単回経口投与し、直後に OVA/alum (100 µg/マウス) を腹腔内注射した。投与後、4 日および 10 日後にエーテル麻酔下でマウスを解剖し、脾臓と胸腺を摘出した。調製した細胞浮遊液を用いてフローサイトメーターによりリンパ球サブポピュレーションを解析を行った。血漿中の抗 OVA 特異的抗体価を ELISA 法により測定した。肝臓及び脾臓から RNA を精製し、DNA を合成した。CYP1A1 及び GAPDH の発現レベルは、リアルタイム PCR により定量した。

C-5. PCBとTCDDの脳の発達への影響の比較解析 (分担研究者：前田秀一郎)

TCDD (5 µg/kg 体重) を妊娠 12.5 日目の C57BL/6J マウスに投与し、18.5 日後の胎仔脳の mRNA の量や種類を、対照の胎生 18.5 日目の胎仔脳の mRNA の量や種類とディファレンシャルディスプレイ (DD) 法で比較解析した。胎仔と新生仔の脳の切片を作成し、Sfrp2 の mRNA の組織局在性を in situ hybridization により検討した。

C-6. ダイオキシン/PCB の毒性に関わる遺伝子の網羅的解析法の確立と応用 (分担研究者：宮本 薫)

妊娠 15 日目に TCDD 1600 ng/kg を

投与したホルツマン系雌ラットとコントロールラットの胎盤を妊娠 20 日目に採取し、mRNA を抽出後、cDNA に変換した。TCDD 投与とコントロールの cDNA 同士の差し引きを行い、サブトラクション cDNA ライブラリーを作製した。このライブラリーから誘導性および抑制性遺伝子クローンをそれぞれ単離し、塩基配列を解析することで同定を行った。また、サブトラクションクローニングにより作製した cDNA を蛍光色素 Cy3、Cy5 で標識したものをプローブとして用い、市販の cDNA マイクロアレイとハイブリザイズさせることで、高感度のマイクロアレイスクリーニングシステムを開発した。このシステムを用いて、誘導性および抑制性遺伝子クローンの網羅的解析を行った。

D. 研究結果

D-1. ヒト型 AhR ノックインマウスの作成とこれを用いた TCDD 毒性の解析 (分担研究者: 山本雅之)

ヒト型ノックインマウスのホモ接合体は、3-メチルコラントレンに対して、著しい反応の減弱を示した。肝臓で AhR の標的遺伝子である CYP1A1 や CYP1A2 の誘導を調べたところ、ヒト型 AhR ノックインマウスでは、低親和性 AhR を有するマウス DBA/2 と同程度の弱い誘導しか観察されなかった。また、TCDD による催奇形性について検討するために、妊娠マウスにダイオキシン投与を行った。ヒト型 AhR ノックインマウスでは、高感受性のマウス C57BL6 に比べて、奇形の発生が著明に抑制されていた。口蓋裂は、C57BL6 では全例に観察されたのに対して、ヒト型 AhR ノックインマウスでは、全く観察されなかった。水腎症については、重症度も発生頻度もヒト型 AhR ノックインマウスの方が低下していた。

D-2. ダイオキシン類/ポリ塩素化ビフェニル類の甲状腺ホルモンへの作用メカニズム (主任研究者 遠山千春)

TCDD や PCB126 投与群では TTR 野生型マウス、TTR 欠損マウスともに肝臓の CYP1A1、CYP1A2、UGT1A6 mRNA の誘導が見られたが、PCB77 と PCB153 投与群ではこれら AhR 応答遺伝子の誘導が見られなかった。CYP1A1 免疫染色の結果は RT-PCR の結果と一致した。すなわち、AhR が TTR 欠損マウスにおいて野生型と同様に働いていることを確認した。

Vehicle 対照群では TTR 欠損マウスの血清 total T4 (TT4) レベルは、野生型マウスの約 50%であった。血清 TT4 濃度は野生型マウスでは TCDD、およびいずれの PCB 投与群においても、対照群に比べて有意に低下し、特に PCB77 投与群の低下は他の投与群に比べて大きかった。TTR 欠損マウスの血清 TT4 濃度が TCDD 投与群で対照群の約 10%まで低下していたのに対し、PCB77 と PCB153 投与群は約 70%までしか低下しなかった。

D-3. ダイオキシン類/ポリ塩素化ビフェニル類のレチノイド代謝への作用メカニズム (主任研究者: 遠山千春)

TCDD のレチノイド代謝攪乱作用が、AhR を介するか否かを調べるために、周産期に TCDD に曝露した AhR 遺伝子欠損マウス (AhR^{-/-})、AhR ヘテロ型マウス (AhR^{+/-}) およびその野生型マウス (AhR^{+/+}) を用いて検討した結果、TCDD は AhR を介して肝臓レチノイド量を低下させることが明らかになった。

TCDD のレチノイド代謝攪乱作用に対して、血中におけるレチノールキャリアー蛋白質である transthyretin (TTR) の関与があるか否かを調べるために、TTR 欠損マウス (TTR^{-/-}) とその野生型 (TTR^{+/+}) マウスに対して

TCDD 投与実験を行った結果、TCDD のレチノイド代謝攪乱作用に対する TTR の関与は認められなかった。

PCB77、PCB126 および PCB153 は肝臓レチノイド代謝に対して影響を及ぼすか、また、影響がある場合はその攪乱作用に TTR の関与があるか否かを調べるために、TTR 欠損マウス (TTR^{-/-}) とその野生型 (TTR^{+/+}) マウスに対して、PCB77、PCB126 および PCB153 の投与実験を行った。その結果、PCB77 は血清中 Retinol 量を低下させ、その作用について TTR の関与が認められた。PCB126 は肝臓中レチノイド量を著しく低下したが、その作用に TTR の関与は見られなかった。

D-4. コプラナーPCBの免疫系への作用 (主任研究者 遠山千春)

TCDD 20 µg/kg の一回経口投与で IgG1 産生の抑制や、T 細胞からの IL-5 産生の抑制が見られるのに対して、2 mg/kg または 5 mg/kg の PCB169 一回経口投与ではどちらも抑制されなかった。AhR 依存的に誘導される CYP1A1 mRNA の発現量を調べると、TCDD (20 µg/kg) と PCB169 (5 mg/kg) の投与で、肝臓では同程度の CYP1A1 の誘導が見られるものの、脾臓では PCB169 による誘導は TCDD に比べてかなり弱いことが明らかとなった。

D-5. PCBとTCDDの脳の発達への影響の比較解析 (分担研究者：前田秀一郎)

TCDD (5 µg/kg 体重) を妊娠 12.5 日目の C57BL/6J マウスに投与し、18.5 日後の胎仔脳の mRNA の量や種類を、対照の胎生 18.5 日目の胎仔脳の mRNA の量や種類とディファレンシャルディスプレイ (DD) 法で比較解析したところ、Wnt シグナル伝達系の調節に関与する secreted frizzled-related protein 2 (SFRP2) mRNA 量が、TCDD 投与により脳で約 2 倍に増加することを

見出した。そこで胎仔脳を、*in situ* ハイブリダイゼーション法により解析した。その結果、第三脳室周辺の SFRP2 mRNA が、投与群では非投与群と異なり、非対称的に局在することを見出した。さらに、SFRP1 と SFRP3 mRNA 量が約 3 倍に増加していた。そこで、Wnt シグナル伝達系の標的遺伝子の発現変化を調べたところ、c-MYC mRNA 量が非投与群に比べ投与群において増加していた。

D-6. ダイオキシン/PCBの毒性に関わる遺伝子の網羅的解析法の確立と応用 (分担研究者：宮本 薫)

TCDD 誘導性候補遺伝子として約 50 種類、抑制性候補遺伝子として約 10 種類の遺伝子を同定した。これらの中には、グルコーストランスポーターやアポリポプロテイン、トランスフェリンなどが含まれ、グルコース代謝や脂質、鉄分の輸送など幅広い範囲でダイオキシンの影響が生じていることが確認された。

E 考察

E-1. ヒト型 AhR ノックインマウスの作成とこれを用いた TCDD 毒性の解析 (分担研究者：山本雅之)

ヒト型 AhR ノックインマウスは、C57BL/6 に比べて反応性が低いということが示され、AhR の親和性が個体の反応性を規定していることが明らかになった。反応特異性については、今後、様々な化学物質の曝露実験を行うことにより、ヒト型 AhR とマウス低親和性 DBA/2 との比較を中心に、検討していく予定である。これにより、ヒト型 AhR ノックインマウスのモニター動物としての有用性の評価も可能になるものと期待される。

E-2. ダイオキシン類/ポリ塩素化ビフェニル類の甲状腺ホルモンへの作用メカニズム (主任研究者 遠山千

春)

TCDD、PCB126 投与による血清 TT4 の低下は AhR を介した影響であると考えられた。PCB77 投与による T4 の低下は、TTR 野生型マウスで血清 TT4 が他の投与群に比べてより低下したのに対し、TTR (-/-)マウスでは低下する割合が小さく、AhR 応答遺伝子の誘導も見られなかったことから、TTR の一部関与が考えられた。PCB153 投与による T4 の低下は PCB77 に比べて小さく、PCB77 とは異なるメカニズムが示唆された。

ダイオキシン類およびポリ塩素化ビフェニル類の毒性は、AhR との親和性や AhR を介した酵素の誘導能などに主に基づく TEF を指標として評価がなされてきた。本実験結果によりコプラナー PCB の中でも、甲状腺への影響に対する毒性機構が AhR を介する場合と、AhR には関係なく TTR が関与する場合があることが明らかになった。ダイオキシン類およびポリ塩素化ビフェニル類の甲状腺機能に関する毒性評価に今後は TEF 以外の新たな指標が必要と考えられた。

E-3. ダイオキシン類/ポリ塩素化ビフェニル類のレチノイド代謝への作用メカニズム (主任研究者: 遠山千春)

TTR 欠損マウスの血清中 retinol 量は、野生型マウスに比べて有意に低かった。これは TTR に結合していない retinol と RBP (retinol binding protein) の結合体の分子量が小さい (およそ 2 万ドルトン) ために腎臓で糸球体から濾過されることによるものと考えられた。TCDD および PCB126 投与群では TTR の有無に関わらず、肝臓 retinoid 量は対照群に比べて有意に低下したが、これは主として AhR を介した影響であると考えられた。PCB77 および PCB153 投与群の肝臓 retinoid 量においては TTR の有無に関わらず減少の傾向が見られ、野生型よりも

TTR 欠損マウスの方が、減少量が大きかったことから、肝臓 retinoid 量の減少に関しては TTR と AhR 以外の要因が示唆された。また PCB77 投与群の野生型マウスで血清中 retinol の有意な低下が認められたのに対し、TTR 欠損マウスでは有意差が認められなかったことから、PCB77 による血清中 retinol の低下には TTR が関与していることが分かった。

これまでダイオキシン類および PCB 類の毒性は、AhR との親和性や AhR を介した酵素の誘導能などに主に基づく TEF を指標として評価がなされてきた。本実験結果によりコプラナー PCB の中でも、甲状腺への影響に対する毒性機構が AhR を介する場合と、AhR には関係なく TTR を介する場合があることが明らかになった。ダイオキシン類および PCB 類の甲状腺機能に関する毒性評価に今後は TEF 以外の新たな指標が必要と考えられる。

E-4. コプラナー PCB の免疫系への作用 (主任研究者: 遠山千春)

胸腺は T 細胞が分化、成熟する重要な器官であり、20 µg/kg TCDD の投与で C57BL/6J 雌性マウスに胸腺重量と細胞数の減少が認められた。胸腺内の未熟な CD4+CD8+細胞の減少と成熟した CD8+ T 細胞の増加が認められた。それに対して PCB169 曝露群は、対照群と有意な変化を認めず、PCB169 の胸腺に対する毒性は TEF0.01 より低いと考えられた。

脾臓では曝露 10 日目に対照群と比べて、TCDD 曝露マウスで脾臓重量と細胞数の減少、脾臓中の T 細胞と B 細胞の減少を認めた。一方、PCB169 2.0 mg/kg、5.0 mg/kg いずれの曝露群においても、脾臓重量の減少を認めたが、細胞数の減少や T 細胞、B 細胞の有意な変化は認められなかったため、PCB169 は TCDD より脾臓細胞に対す

る影響が弱いと考えられた。

TCDD による AhR 活性化の指標として用いられる CYP1A1 の誘導に関して、肝臓では、PCB169 曝露群でも TCDD と同様のメッセンジャーRNA の発現が認められたのに対して、脾臓での CYP1A1 発現の誘導は TCDD よりかなり弱いことが明らかとなった。このことは、上記の PCB169 群の脾臓細胞や抗体産生能への影響が TEF0.01 より弱いことの原因が、脾臓での AhR 依存的な遺伝子発現能が弱いことによるものであることを示唆した。これらの差は、TCDD と PCB169 の代謝や組織分布の違いに起因する可能性が考えられ、今後検討が必要である。また今回の研究では、PCB169 曝露によって、胸腺細胞や脾臓細胞のポピュレーションの変化等にも PCB169 曝露により特有の変化は認められず、非ダイオキシン様の作用については明らかにならなかった。

E-5. PCBとTCDDの脳の発達への影響の比較解析 (分担研究者: 前田秀一郎)

妊娠12.5日目のC57BL/6JマウスにTCDDを投与すると、胎生18.5日目の胎仔脳の第三脳室周辺において、Wntシグナル伝達系の調節に関与するSFRP2 mRNAの局在が、非曝露群と異なり、非対称的に局在することを見出した。既に、妊娠ラットへのTCDD投与が胎仔脳の形態や成長後の行動に影響することが報告されている。しかし、TCDD投与により、特定遺伝子のmRNAの量と局在が変化することは、これまでに見出されていない。本知見は、TCDDによる脳神経毒性惹起機構を分子レベルで理解するための重要な手がかりとなることが期待される。

E-6. ダイオキシン/PCBの毒性に関わる遺伝子の網羅的解析法の確立と応用 (分担研究者: 宮本 薫)

今回報告したサブトラクションクローニングによる遺伝子の網羅的解析法により、ラット胎盤でTCDDによって誘導もしくは抑制される遺伝子群を多数同定した。この方法の特色は、比較的発現量の少ない遺伝子群でも同定することが可能である点と、未知の遺伝子群をピックアップできる点である。本研究でも数種類の未知遺伝子があることが判明した。これまでの解析により、グルコーストランスポーター2を同定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Nishimura N, Yonemoto J, Miyabara Y, Sato M, Tohyama C. (2003) Rat thyroid hyperplasia induced by gestational and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Endocrinology*. (in press)

Fukuzawa H. N., Ohsako S., Nagano R., Sakaue M., Baba T., Aoki Y. and Tohyama C. Effects of 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl, a Coplanar Polychlorinated Biphenyl Congener, on Cultured Neonatal Mouse Testis. *Toxicology in vitro*, 2002. (in press)

2. 学会発表

Miyamoto, K.: Comprehensive analysis of genes in reproductive organs affected by low concentrations of endocrine disruptors. 5th Scientific Congress of the Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies "Endocrine disruptors symposium". 2002,9, Malaysia

宮本 薫: 低濃度ダイオキシン(TCDD)の生殖系への影響解析—遺伝子発現を中心として—。第75回日本生化学会大会。シンポジウム 内分泌攪乱作用研究の進展。2002,10,京都

水谷哲也、矢澤隆志、中川幸、吉田和

世、吉野美紀、関口俊男、梶谷宇、川田広子、井上佳子、山田一哉、宮本薫：ラット卵巣顆粒膜細胞の遺伝子発現に及ぼす低濃度ダイオキシンの影響。第7回日本生殖内分泌学会。2002,12,大阪

Moriguchi, T., Motohashi, H., Aoki, Y., Ohsako, S., Nakajima, O., Fujii-Kuriyama, Y., Tohyama, C., and Yamamoto, M. Decreased sensitivity to xenobiotics in a humanized mouse model. 14th International Symposium on Microsomes and Drug oxidations (MDO2002), Sapporo, July 22-26, 2002.

森口尚, 本橋ほづみ, 細谷朋方, 中島修, 高橋智, 大迫誠一郎, 青木康展, 遠山千春, 藤井義明, 山本雅之. ヒト型ダイオキシン受容体ノックインマウスの表現型解析. 第25回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜. 2002. 12. 11-14. (講演要旨集 p.777)

西村典子, 米元純三, 横井千沙子, 竹内陽子, 遠山千春. 母乳からのダイオキシン曝露による甲状腺機能への影響とそのメカニズム: クロスフォスタリング実験. 第73回衛生学会, 大分 (2003)

遠山千春, 米元純三, 竹内陽子, 横井千沙子, 宮原裕一, 西村典子. ダイオキシンおよびポリ塩素化ビフェニルのレチノイド代謝への作用メカニズム. 第73回衛生学会, 大分 (2003)

米元純三, 西村典子, 横井千沙子, 竹内陽子, 遠山千春. ダイオキシン及びポリ塩素化ビフェニルの甲状腺ホルモンへの影響とそのメカニズム. 第73回衛生学会, 大分 (2003)

Nishimura N., Yonemoto J., Yokoi C., Takeuchi Y., Ikushiro S. and Tohyama

C. Lactational not *in utero* exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin disrupts thyroid hormone homeostasis in Holtzman rats. Society of Toxicology 42nd Annual Meeting, Salt Lake City. (2003)

野原恵子, 遠山千春. ダイオキシンによる免疫毒性の標的細胞. 第2回分子予防環境医学研究会, 東京 (2002)

遠山千春, 米元純三, 西村典子. 齧歯類の甲状腺組織と機能に及ぼすダイオキシンの攪乱作用. 第25回日本分子生物学会年会, 横浜 (2002)

野原恵子, 九十九伸一, 伊藤智彦, 山本雅之, 本橋ほづみ, 日田安寿美, 藤井義明, 井上薫, 長井治子, 遠山千春. T細胞特異的 constitutive active arylhydrocarbon receptor トランスジェニックマウスの免疫系の解析. 第25回日本分子生物学会年会, 横浜 (2002)

座波ひろ子, 曾根秀子, 米元純三, 久野節二, 前田秀一郎, 遠山千春. マウス胎児脳における2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin の sfrp-2 発現と局在に及ぼす影響. 環境ホルモン学会第5回研究発表会, 広島 (2002)

竹内陽子, 遠山千春, 宮原裕一, 横井千紗子, 米元純三, 前田秀一郎, 西村典子. トランスサイレチン欠損マウスを用いたダイオキシン/ポリ塩素化ビフェニルの作用メカニズム 1. 血清および肝臓レチノイド量への影響. 環境ホルモン学会第5回研究発表会, 広島 (2002)

中田明子, 竹内陽子, 横井千紗子, グェン・ヴァン・チュエン, 遠山

千春, 西村典子. ダイオキシン類の酸化ストレスに対するビタミンEの抑制効果. 環境ホルモン学会第5回研究発表会, 広島 (2002)

西村典子, 米元純三, 横井千紗子, 竹内陽子, 遠山千春. ダイオキシン類およびポリ塩素化ビフェニールの甲状腺機能への影響とそのメカニズム. 環境ホルモン学会第5回研究発表会, 広島 (2002)

横井千紗子, 遠山千春, 竹内陽子, 米元純三, 前田秀一郎, 西村典子. トランスサイレチン欠損マウスを用いたダイオキシン/ポリ塩素化ビフェニールの作用メカニズム 2. 甲状腺ホルモンへの影響. 環境ホルモン学会第5回研究発表会, 広島 (2002)

Tohyama C. Low-dose exposure to dioxin and characterization of the toxicity profile. 第75回日本生化学会大会, 京都 (2002)

Ohsako S., Yonemoto J. and Tohyama C. Low-dose exposure to dioxin, its male reproductive toxicity and health risk assessment. 5th FAOPS CONGRESS KUALA LUMPUR, Kuala Lumpur. (2002)

Nishimura N., Yonemoto J. and Tohyama C. Perinatal exposure to low dose dioxin disrupts thyroid hormone homeostasis and causes thyroid hyperplasia in the rat. 5th FAOPS CONGRESS KUALA LUMPUR, Kuala Lumpur. (2002)

野原恵子, 遠山千春. ダイオキシン曝露による免疫毒性. 第9回日本免疫毒性学会, 静岡 (2002)

井上薫, 伊藤智彦, 藤巻秀和, 遠山

千春, 野原恵子. 体液性免疫における長寿命抗体産生細胞に対する2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin(TCDD)の影響. 第9回日本免疫毒性学会, 静岡 (2002)

伊藤智彦, 井上薫, 藤巻秀和, 遠山千春, 野原恵子. T細胞活性化および分化に対するダイオキシンの抑制効果. 第9回日本免疫毒性学会, 静岡 (2002)

Ikeda M., Tamura M., Suzuki C., Yamashita J., Setani K., Tohyama C. and Tomita T. Effects of repeated in utero and lactational TCDD exposure on sexual behavior and sex ratio of offspring. 22nd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants & POPs (Dioxin 2002), Barcelona. (2002)

Wu Q., Ohsako S., Ishimura R. and Tohyama C. Exposure of preimplantation embryos to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) affected fetal development. 22nd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants & POPs (Dioxin 2002), Barcelona. (2002)

Ohsako S., Fukuzawa H N., Ishimura R., Sone H., Fujii-Kuriyama Y. and Tohyama C. Alterations in the reproductive system of male mice by perinatal TCDD exposure are dependent on AhR gene. 14th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, Sapporo. (2002)

Fukuzawa H. N., Sakaue M., Baba T., Fujii-Kuriyama Y., Tohyama C. and Ohsako S. AhR-dependent down-regulation of cytochrome P450 side chain cleavage (P450_{sc}) enzyme

expression in adult mouse testis by TCDD. 14th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, Sapporo. (2002)

Nishimura N., Yonemoto J., Miyabara Y., Yokoi C., Takeuchi Y., Fujii-Kuriyama Y., Maeda S., Tohyama C. Alteration in metabolism of thyroxine and vitamin a in AhR-Null mice and TTR-Null mice following

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin exposure. 14th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, Sapporo. (2002)

西村典子, 米元純三, 遠山千春. ダイオキシン類の甲状腺機能への影響とそのメカニズムの検討. 第 29 回日本トキシコロジー学会, 名古屋 (2002)

田村昌士, 池田雅彦, 瀬谷薫, 鈴木千夏, 山下純子, 遠山千春, 富田多嘉子. ダイオキシン

(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin:TCDD) の経胎盤, 経母乳曝露による仔の性分化, 生殖腺に対する影響. 日本薬学会第 122 回年会, 幕張(2002)

G. 健康危険情報

特に無し

H 知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

特になし

2.実用新案登録

特になし

3.その他

特になし

ヒト型ダイオキシン受容体ノックインマウスの薬剤感受性に関する研究

分担研究者 山本雅之 筑波大学・基礎医学系・教授

研究要旨：ダイオキシン類に対する感受性とその生体に対する影響は、動物種により著しく異なることが知られている。ヒトにおける感受性と影響のモニタリングを可能にする動物モデルを作製する目的で、マウスダイオキシン受容体の代わりに、ヒトダイオキシン受容体を有する、ヒトダイオキシン受容体 (hAHR) ノックインマウスを作製し、その薬剤に対する反応性を調べた。3-メチルコラントレンに対する反応は、hAHR ノックインマウスもコントロールマウスも同程度であったが、TCDD に対する反応は前者の方が弱いという結果であった。この結果は、ダイオキシン受容体のリガンドによる反応の特異性が、種により異なること、そして、hAHR ノックインマウスがヒトの反応の特異性を再現できる有用なモニター動物として利用可能であることを示唆するものである。

A. 研究目的

ダイオキシン類を始めとする芳香族炭化水素は、体内に摂取されると、生体に対して様々な悪影響をもたらす。こうした症状は、動物種により多様であり、また、感受性も種により大きく異なっている。これら化学物質の環境基準・食品基準を設定する上で、ヒトの反応性をなるべく正確に推測することは非常に重要である。しかしながら、ヒトに対する影響を系統的に調べることは、倫理上不可能である。そこで、ヒトに対するこれら化学物質の毒性を適切に評価することのできるモデル動物は非常に有用であると考えられる。

これまで報告された AhR 遺伝子破壊マウスを用いた実験から、芳香族炭化水素により引き起こされる多くの生体反応は、ダイオキシン受容体 (AhR) を介していることが明らかにされている。我々は、AhR 分子の特性が、それぞれの動物種ごとの特徴的な反

応を規定すると考え、ヒトに対する影響とその感受性をモニターリングするための動物モデルを作製する目的で、マウス AhR 分子の代わりに、ヒト AhR 分子を有するヒト AhR (hAhR) ノックインマウスを作製した。

B. 研究方法

- 1) hAhR ノックインマウスの作製
マウス AhR 遺伝子座に、hAhR cDNA を挿入することにより、マウス AhR 遺伝子を破壊すると同時に、マウス AhR 遺伝子のプロモーターの制御下で hAhR cDNA が転写されるように、ターゲティングベクターをデザインした。得られたマウスは、野生型 C57BL6 マウスへ戻し交配し、コンジェニック化を図った。hAhR を持つ C57BL6 マウスを樹立した。
- 2) AhR リガンドに対する薬剤代謝酵素群の誘導反応 *in vitro* で計測された TCDD との親和性は、C57BL6 の AhR (AhR^{b-1}) で高く、DBA/2 の AhR (AhR^d) で低く、後者の親和性は hAHR

のそれと同程度である。hAhR, AhR^{b-1}, AhR^dそれぞれの AhR 分子が指令する生体反応を、同一の遺伝的背景において比較するために、C57BL6 に純系化された hAhR ノックインマウス (hAhR マウス)、野生型 C57BL6 マウス (AhR^{b-1} マウス)、C57BL6 の遺伝的背景に AhR^d を有するコンジェニックマウス (AhR^d マウス) の 3 系統を比較した。まず、AhR リガンドに対する薬剤代謝酵素群の誘導反応を調べた。3-メチルコラントレン (3-MC) と 2,3,7,8-TCDD 投与に対する、肝臓での CYP1A1, CYP1A2 の発現誘導を RNA プロット解析により調べた。

3) TCDD に対する催奇形性の検討次に TCDD に対する催奇形性を調べるために、胎齢 12.5 日の時点で母体に TCDD を投与し、胎齢 18.5 日で胎児を解析した。口蓋裂の発生頻度と水腎症の発生頻度と重症度を形態学的に調べた。

C. 研究結果

hAhR マウスは、生存可能で、生殖能も正常であった。3-MC 投与による肝臓での CYP1A1 あるいは CYP1A2 の誘導の強度は、AhR^{b-1} マウス >> AhR^d マウス = hAhR マウス という順番であり、hAhR マウスと AhR^d マウスの反応性はほぼ等しかった。一方、TCDD 投与による誘導の強度は、AhR^{b-1} マウス > AhR^d マウス > hAhR マウスであり、hAhR マウスは、3-MC に比べて TCDD に反応しにくいということが明らかになった。TCDD に対する催奇形性も、この結果と一致する傾向が得られた。口蓋裂は、AhR^{b-1} マウスで 100%、AhR^d マウスで 30%、hAhR マウスで 0% という発生率であった (Table 1)。水腎症の発生率は、いずれの系統においても 8 割前後であったが、重症度は AhR^{b-1} マウス > AhR^d マウス > hAhR マウス という傾向が認められた。

D. 考察

in vitro で測定された TCDD に対する親和性は、AhR^d も hAhR もほぼ等しいにもかかわらず、AhR^d マウスと hAhR マウスの TCDD に対する反応性が異なっていたという点が、面白い点である。3-MC に対する反応が同程度であることを鑑みれば、AhR^d と hAhR とでは、相対的な基質特異性が異なっているといえる。つまり、hAhR マウスの反応性は、ヒトの反応性の特徴を模倣していることが示唆される。hAhR マウスに対して、様々な芳香族炭化水素類を曝露して、個体に及ぼす影響とその感受性を明らかにしていくことは、これら化学物質の毒性の適切な評価を行う上で、非常に有用な情報を提供するものと期待される。

このメカニズムとしては、hAhR と AhR^d とのアミノ酸配列の違いによる分子の構造的な差異 (特に、カルボキシル末端側の保存性が低い) に基づく共役因子との相互作用の違いが有力であると推測している。

E. 結論

ヒトの特徴的な反応性を推測するためのモデル動物として、hAhR ノックインマウスを作製し、3-MC と TCDD に対する反応性を調べたところ、後者に対する反応が弱いことが明らかになった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 参考論文

Abnet, C.C., Tanguay, R.L., Heideman, W. & Peterson, R.E. Transactivation activity of human, zebrafish, and rainbow trout aryl hydrocarbon receptors expressed in COS-7 cells: greater insight into species differences in toxic potency of polychlorinated dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, and biphenyl congeners. (1999) *Toxicol Appl Pharmacol.* 159,

41-51.

Birnbaum, L. S., Harris, M. W., Barnhart, E. R. & Morrissey, R. E. (1987) Teratogenicity of 3 polychlorinated dibenzofurans in c57bl/6n mice. *Toxicol. Applied Pharmacol.* 90, 206-216.

Ema, M., Ohe, N., Suzuki, M., Mimura, J., Sogawa, K., Ikawa, S. & Fujii-Kuriyama, Y. Dioxin binding activities of polymorphic forms of mouse and human arylhydrocarbon receptors. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 27337-27343.

Ema, M., Sogawa, K., Watanabe, N., Chujoh, Y., Matsushita, N., Gotoh, O., Funae, Y. & Fujii-Kuriyama, Y. cDNA cloning and structure of mouse putative Ah receptor. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Com.* 184, 246-253.

Fernandez-Salguero, P., Pineau, T., Hilbert, D. M., McPhail, T., Lee, S. S. T., Kimura, S., Nebert, D. W., Rudikoff, S., Ward, J. M. & Gonzalez, F. J. Aldehyde dehydrogenase. Maintaining critical active site geometry at motif 8 in the class 3 enzyme. (1995) *Science* 268, 722-726.

Hooper, M., Hardy, K., Handyside, A., Hunter, S. & Monk, M. (1987) Hprt-deficient (lesch-nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells *Nature*. 326, 292-295.

Kohkalainen, M., Tuomisto, J. & Pohjanvirta, R. The AH receptor of the most dioxin-sensitive species, guinea pig, is highly homologous to the human AH receptor. (2001) *Biochem Biophys Res Commun.* 285, 1121-1129.

Micka, J., Milatovich, A., Menon, A., Grabowski, G. A., Puga, A. & Nebert, D. W. The AH receptor and a novel gene determine acute toxic responses to TCDD: segregation of the resistant alleles

to different rat lines. (1997) *Pharmacogenetics* 7, 95-101.

Mimura, J., Yamashita, K., Nakamura, K., Morita, M., Takagi, T. N., Nakao, K., Ema, M., Sogawa, K., Yasuda, M., Katsuki, M. & Fujii-Kuriyama, Y. (1997) Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells. Genes Cell.* 2, 645-654.

Moriguchi, T., Sakurai, T., Takahashi, S., Goto, K. & Yamamoto, M. The human prepro-orexin gene regulatory region that activates gene expression in the lateral region and represses it in the medial regions of the hypothalamus. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 16985-16992.

Okey, A. B., Riddick, D. & Harper, P. A. The Ah receptor: mediator of the toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds. (1994) *Toxicol. Lett.* 70, 1-22.

Okey, A. B., Vella, L. M. & Harper, P. A. Detection and characterization of a low affinity form of cytosolic Ah receptor in livers of mice nonresponsive to induction of cytochrome P1-450 by 3-methylcholanthrene. (1989) *Mol. Pharmacol.* 35, 823-830.

Poland, A. & Glover, E. Characterization and strain distribution pattern of the murine Ah receptor specified by the Ahd and Ahb-3 alleles. (1990) *Mol. Pharmacol.* 38, 306-312.

Poland, A., Palen, D. & Glover, E. Analysis of the four alleles of the murine aryl hydrocarbon receptor. (1994) *Mol. Pharmacol.* 46, 915-921.

Rowlands, J. & Gustafsson, J. A. (1997) Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 27, 109-134.

Swanson, H. J. & Bradfield, C. A. The AH-receptor: genetics, structure and function.

(1993) *Pharmacogenetics* 3, 213-230.

Tuomisto, J. T., Viluksela, M., Pohjanvirta, R. & Tuomisto, J. The AH receptor and a novel gene determine acute toxic responses to TCDD: segregation of the resistant alleles to different rat lines. (1999) *Toxicol Appl Pharmacol* 155, 71-81.

Yasuda, M., Igarashi, E., Datu, A.R. &

Igawa, H. (1986) Teratogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-para-dioxin (tcdd) in JCL-ICR mice. *Teratology* 34, 454-455.

H.知的財産権の出願・登録状況

- 1.特許取得
特になし
- 2.実用新案登録
特になし
- 3.その他
特になし

表1 *AhR*^{h/h}, *AhR*^{b-1/b-1}, and *AhR*^{d/d} を有するマウスTCDDにおいてTCDDによって引き起こされる異常発生率

胎仔の <i>AhR</i> の遺伝子型 ^a	TCDD 用量 ^b (μg/kg)	調べた母親の数(n)	調べた胎仔の数(n)	胎仔数				
				口蓋裂		水腎症		
				(n)	(%) ^c	(n)	(%) ^d	(重篤度:0-3.0) ^e
<i>AhR</i> ^{b-1/b-1}	0	2	13	0	0	2	12.5	0.19±0.49
<i>AhR</i> ^{b-1/b-1}	40	5	29	29	100	26	89.7	2.54±1.07 ^f
<i>AhR</i> ^{h/h}	0	2	16	0	0	1	6.3	0.02±0.15
<i>AhR</i> ^{h/h}	40	5	37	0	0	30	81.1	1.19±0.82 ^g
<i>AhR</i> ^{d/d}	0							
<i>AhR</i> ^{d/d}	40	5	30	9	30	25	81.7	1.98±1.12

a. *AhR*^{b-1/b-1}, *AhR*^{h/h}, and *AhR*^{d/d} を有する胎仔は、ヘテロの親同士の交配から得た。

b. TCDD は、妊娠マウスの腹腔内に、妊娠 12.5 日目に 40 μg / kg の用量で1回投与し、妊娠 18.5 日目に胎仔を観察した。

c. 調べた胎仔の百分率。

d. 調べた腎臓の百分率。

e. 重篤度は、0 to 3+; 0, 腎臓の所見の判断規準におうじて、設定。

f. 対照の *AhR*^{b-1/b-1} 胎仔に比して、統計的に有意 ($P<0.01$).

g. 対照の *AhR*^{h/h} 胎仔に比して統計的に有意 foetuses ($P<0.01$).

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
分担研究報告書

ポリ塩素化ビフェニルの甲状腺ホルモンへの影響とそのメカニズム

主任研究者 遠山千春 国立環境研究所環境健康研究領域 領域長

研究要旨

ダイオキシン類、コプラナーPCB、ノンコプラナーPCBの甲状腺ホルモン抑制作用とそのメカニズムを探る目的で、Ahレセプター(AhR)ノックアウトマウス、トランスサレチン(TTR)ノックアウトマウスを用いて検討を行った。その結果、TCDD、PCB126の甲状腺ホルモン(TT4)抑制には、AhRを介した肝のT4-グルクロン酸抱合の促進による排泄促進がその主要なメカニズムと考えられた。PCB77についてはT4抑制にある程度、TTRが関与していることが示唆された。PCB153については、AhR、TTR以外の因子の関与が示唆された。また、甲状腺ホルモン抑制作用の相対的効力は、TCDDを1として、PCB126:0.02、PCB77:0.0004、PCB153:0.0001となった。PCB126ではTEF(0.1)と大きく異なり、ダイオキシン類およびポリ塩素化ビフェニル類の甲状腺機能に関する毒性評価にTEF以外の新たな指標が必要と考えられた。

研究協力者： 米元純三、西村典子

国立環境研究所環境ホルモン/ダイオキシン研究プロジェクト

A. 研究目的

ダイオキシン、ジベンゾフランおよびダイオキシン様活性を持つとされる12種類のコプラナーPCBを合わせてダイオキシン類と称している。ダイオキシン類には多くの同族体、異性体が含まれていることから、その毒性評価、曝露量評価に毒性等価量(TEQ)概念が用いられている(van den Berg et al., 1998)。すなわち、2,3,7,8-TCDDの毒性を1として、相対的な毒性値が付与されている。

PCBには、甲状腺ホルモンを低下させる作用が知られており(Bastomsky et al., 1976; Brouwer et al., 1998)、そのメカニズムの一つとして、PCB水酸化代謝物のT4輸送タンパク、トランスサ

イレチン(TTR)への競争的結合が考えられている(Brouwer et al., 1998; Chauhan et al., 1999)。一方、TCDDは、Ahレセプター(AhR)を介し、肝のUGT1(UDP-glucuronosyltransferase)を誘導し、サイロキシン(T4)のグルクロン酸抱合を促進し、それによる胆汁への排泄を促進することによって、T4を低下させると考えられている(Bock, 1991; Schuur et al., 1997; Nishimura et al., 2002; Nishimura et al., 2003)。コプラナーPCBには、ダイオキシン様作用と非ダイオキシン様作用があることから、甲状腺ホルモン抑制作用のメカニズムを明らかにすることは、コプラナーPCBを含めたダイオキシン類の毒性等価量概念の精緻化のために必要である。

ここでは、TCDDの甲状腺ホルモン抑制作用のメカニズムを確認するために Ah レセプターノックアウトマウスを、ダイオキシン類の甲状腺ホルモン抑制作用におけるトランスサイレチン(TTR)の関与を TTR ノックアウトマウスを用いて検討した。

B. 研究方法

1. 試薬

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD: 50 $\mu\text{g/ml}$ nonane 溶液)は、Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA) から購入し、TCDDの含量が 4 $\mu\text{g/ml}$ となるようにコーン油に溶解させた。PCB77 (3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl)、PCB126 (3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl)、PCB153 (2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl)は、AccuStandard Inc. (New Haven, CT) から購入し、コーン油に溶解して、それぞれ 5 mg/ml、100 $\mu\text{g/ml}$ 、10 mg/ml の調整液を作成した。

2. 実験動物および飼育条件

Ah-R(+/-)マウスは、藤井義明博士(東北大学、現筑波大学)から、TTR(+/-)マウスは前田秀一郎博士(山梨大学)から供与を受け、国立環境研究所で自家繁殖したものをを用いた。飼育条件は温度 24 \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 50 \pm 10%、人工照明 1日 12 時間に設定し、マウスはホワイトフレーク(日本チャールス・リバー株式会社)を床敷としたポリカーポネート製ケージに収容した。飼料はコバルト 60 照射滅菌済みの固型飼料(CE-2、日本クレア株式会社)を自由に与え、飲水は滅菌水を給水瓶で自由に摂取させた。

3. 動物実験

AhR(+/-)マウス同士を交配し、妊娠 12.5 日の雌マウスに TCDD 10 $\mu\text{g/kg}$ 体重を一回経口投与した。対照

には 4% nonane 含有コーン油を投与した。生後 21 日目に雌雄仔マウス(AhR+/- と AhR-/-)を解剖し、血清および肝臓を採取した。

13 週齢の野生型(TTR(+/+))および TTR 欠損(TTR(-/-))雌マウスに、PCB77 (50 mg/kg 体重)、PCB126 (1 mg/kg 体重)、PCB153 (200 mg/kg 体重) および TCDD (20 $\mu\text{g/kg}$ 体重)を一回経口投与した。対照にはコーン油を投与した。7 日後に血清および肝臓を採取した。TTR(-/-)マウスにおいて血清中 TTR 蛋白が存在しないことを SDS-PAGE ウェスタンブロッティング免疫反応で確認した。

全ての動物実験は、独立行政法人国立環境研究所動物実験指針に従って行った。

4. 甲状腺ホルモンの測定

血清中 Total T4 (TT4)、Total T3 (TT3)を RIA 法(Amerlex RIA Kit, Amersham International, Buckinghamshire, UK)により定量した。血清 TSH は EIA 法(rat TSH enzyme immunoassay kit, Amersham International)により定量した。

5. RNA の抽出および RT-PCR

肝のトータル RNA は Qiagen RNeasy mini kit (Qiagen, Tokyo)により抽出した。cytochrome P4501A1、1A2 (CYP1A1、CYP1A2)、UDP-glucuronosyltransferase 1A6 (UGT1A6) 及び AhR の mRNA 発現を RT-PCR により解析した。PCR 産物をアガロースゲル上で単一バンドとして検出し、バンドの強度を EDAS120 システム(Eastman Kodak Co., Rochester, NY)により定量化した。結果は、 β -actin を内部標準遺伝子として、 β -actin に対する比であらわした。

6. CYP1A の免疫組織染色

肝臓の一部をザンボニー液で 24 時