

図3 油症検診受診者血中 PCB について、ECD-GC 分析でのピーク高比と HRGC/HRMS 分析での PCB ピーク面積比の関係
 上段: PCB ピーク No.1 vs PCB ピーク No.2 (ECD-GC) と PCB#118 vs PCB#153 (HRGC/HRMS) の関係
 下段: PCB ピーク No.5 vs PCB ピーク No.2 (ECD-GC) と PCB#156 vs PCB#153 (HRGC/HRMS) の関係

油症患者における三十数年後のPCB残留状態

分担研究者 増田義人 第一薬科大学 名誉教授

研究要旨 最近採血された油症患者および一般福岡住民の血液中 PCB を分析した。PCB 等は異性体により体内残留状態が異なる。油症患者の血液中には PCB #118, #138 は一般人と同程度の濃度であったが、PCB #153, #156, #180, #170 および DDE は一般人の 4~17 倍高濃度で残留していた。

A. 研究目的

1968 年に油症が発生して、今年で 34 年になる。いまだに PCB, PCDF は体内に残留して、種々の慢性症状を継続させている。毒性が異なる多くの同族体のうちのどの構造の PCB が毒性影響が大きいかを調べるために、PCB 異性体を分析して、一般人の PCB と比較検討した。

B. 研究方法

油症患者血液 血液 3g に内標準物質として 13C 標識 PCB 5 ng 加え、アルカリ分解、ヘキサン抽出、シリカゲルカラム分離、ヘキサン濃縮、ガスクロマトグラフ/質量分析装置注入により 90 種の PCB および HCB, DDE の分析をした。

一般人血液 血液約 3g に内標準物質として 13C 標識 PCB を加え、ヘキサン/アセトン抽出で脂肪分を取り出し秤量した。これをゲルクロマトで脂質を分離して、ガスクロマトグラフ/高分解能質量分析計で PCB 異性体および塩素系農薬を定量分析した。

C. 結果と考察

油症患者 28 名および一般人 151 名の血液中 PCB の分析結果を表 1 に示す。全 PCB 濃度では油症患者の方が一般人よりも 5 倍程度高い。PCB 異性体では油症患

者の方に数倍高いのは PCB#153, #180, #170 であり、PCB#156 は特に 17 倍高い濃度である。また、PCB#118, #138 は一般人と同程度である。PCB#118 の濃度が低く、PCB#156 の濃度が高いのは油症患者に特異的にみられる PCB パターンであり、30 数年経過した時点にもはっきり残っている。このうち PCB#118 の濃度は発症当時は高かったが、同時に摂取した毒性が強い PCDF などの酵素誘導作用によりかなり速く減少したものと考えられる。PCB#118 の 3-, 4-位 2 塩素置換構造は代謝されて PCB 水酸化体に変化して血液中に残留しているものと考えられる。この PCB 水酸化体はホルモン様作用があることが知られているので、注意深く調査する必要がある。DDE は油症とは関係ない食品経由で摂取したものであるが、油症患者に高濃度で残留していた。

D. 研究発表

1. 発表論文

Y. Masuda et al. Concentrations of dioxins and related compounds and their effects to biochemicals in Fukuoka residents. Organohalogen Compounds 55, 267-270. 2002.

表 1 油症患者および一般人の血液中 PCBs, HCB, DDE 濃度 (ppb / 全血) 及びその平均値の割合

	油症患者, n = 28					一般人, n = 151					割合 油症/一般
	平均	標準偏差	中央値	最低	最高	平均	標準偏差	中央値	最低	最高	
2,3,4,4',5-pentaCB (#118)	0.063	0.031	0.051	0.023	0.128	0.038	0.035	0.028	0.006	0.235	1.64
2,2',4,4',5,5'-hexaCB (#153)	0.687	0.380	0.551	0.169	1.978	0.167	0.156	0.123	0.013	0.919	4.11
2,2',3,4,4',5'-hexaCB (#138)	0.095	0.054	0.077	0.041	0.284	0.081	0.069	0.060	0.014	0.427	1.17
2,2',3,4,4',5,6'-heptaCB (#182)	0.116	0.063	0.097	0.050	0.279	0.041	0.035	0.029	0.008	0.218	2.79
2,3,3',4,4',5-hexaCB (#156)	0.301	0.238	0.246	0.086	1.220	0.018	0.014	0.013	0.001	0.081	16.97
2,2',3,4,4',5,5'-heptaCB (#180)	0.487	0.269	0.381	0.226	1.330	0.126	0.100	0.087	0.018	0.564	3.87
2,2',3,3',4,4',5-hexaCB (#170)	0.321	0.220	0.260	0.108	1.104	0.039	0.030	0.028	0.007	0.183	8.33
Total PCBs	4.063	3.346	2.904	1.372	17.538	0.759	0.616	0.547	0.127	3.444	5.36
Hexachlorobenzene (HCB)	0.108	0.050	0.097	0.061	0.309	0.045	0.033	0.043	0.002	0.174	2.40
DDE	2.870	1.730	2.537	0.176	6.967	0.691	0.504	0.558	0.084	3.643	4.15

分担研究報告書

熱媒体の人体影響とその治療法に関する研究（油症研究）

分担研究者 岸 玲子

（北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野 教授）

研究協力者 倉橋典絵

（北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野）

研究要旨 内分泌攪乱物質と停留精巣に関する疫学研究の現状について、文献的考察を行った。米国立医学図書館の医学文献データベース PubMed を利用して選択した文献は10件で、介入研究1件、症例対照研究9件であった。日本人を対象にした研究は1件もなかった。その中でも、有機塩素系化合物などの内分泌攪乱物質についての報告が1件あり、Heptachlore-epoxide(HCE)、Hexachlorobenzene(HCB)との関連を認めた。その他、農薬、ホルモン製剤との関連も報告されている。有機塩素系化合物などの内分泌攪乱物質と停留精巣との関連に関する研究はきわめて乏しく、研究の必要がある

A. 研究目的

男児の泌尿器先天異常の主たるものである停留精巣のリスク要因として、疫学研究では胎児期の内外のエストロゲン曝露が指摘されている。有機塩素化合物などの内分泌攪乱物質にはエストロゲン作用がある物質もあり、その関連を探ることを目的として、疫学研究に関する文献レビューを行った。

B. 研究方法

米国立医学図書館の医学文献データベース PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>)を用いて、(cryptorchidism) and(PCB) or(Dioxin)or(DES)or(Bisphenol)or(Chlorinated Hydrocarbons)or(Phthalate)or(Styrene)or(Insecticides)or(Pesticides)and(Human)で文献を検索した。その中から、人集団

を対象とする疫学研究の原著論文と選択した。さらに必要に応じて、これらの原著論文や、他の総説論文を参考にして、論文を選択した。

C. 研究結果

疫学的研究における停留精巣と内分泌攪乱物質との関連

i 有機塩素化合物

Hosie(2000)らは、ドイツにおいて、脂肪中における有機塩素化合物 26 種類の蓄積量を、停留精巣患者18人（平均年齢 4.2 歳）とコントロール30人（平均年齢 3.5 歳）で計測し、比較した。その結果、停留精巣患者において Heptachlore-epoxide(HCE) (P=0.009)、Hexachlorobenzene(HCB) (P=0.012) が高濃度に蓄積されていた。その他の物質に関しては、有意な関連が認められなか

った。

ii 農薬

農業に従事する母親から出生した男児に停留精巣のリスクが増加する、という報告がある。Weidner(1998)らは、デンマークの人口登録、患者登録、不妊症データベースを用いて、両親の農業、造園業への従事と、停留精巣・尿道下裂の発生との関連を検討した(停留精巣男児 6177 人、対照 23,273 人)。その結果、母親の造園業従事では有意なリスクの上昇が認められた(RR=1.67 95%CI=1.14-2.47)。農業従事では有意ではないがリスクの上昇が認められた(RR=1.28 95%CI=0.94-1.73)。父親の農業・造園業従事では、関連がみられなかった。(農業: RR=1.08 95%CI=0.93-1.24 造園業: RR=1.28 95%CI=0.80-2.04) 一方、Kristensen(1997)らの、ノルウェーの出生登録、人工登録、農業登録により、家庭の農業・造園業・畜産業と、先天奇形の発生との関連を調べた報告によると、停留精巣に関しては、有意なリスクの上昇がみられなかった(OR=0.77 95%CI=0.58-1.03)。しかし、殺虫剤の曝露によりリスクの上昇がみられる、としている(殺虫剤の購入: OR=1.70 95%CI=1.16-2.50 殺虫剤の購入と野菜の栽培: OR=2.32 95%CI=1.34-4.01)。

iii ホルモン製剤

DES による子宮内曝露を受けた男児における症例対照研究においては、尿路生殖器系に悪影響を及ぼすことが指摘されている。W.B.Gill (1979) らは、妊娠中の DES の影響を調べるために、妊婦に対して DES とプラセボによる二重盲検無作為抽出法を行った。その結果、DES

投与群の妊婦から出生した男児で、停留精巣、精巣上体嚢胞、精巣低形成、尿管狭窄等がプラセボ投与群より多くみられたことを指摘している。E.D.Whitehead (1981) らは、DES 曝露歴のある 48 人の男性について、尿路生殖器の異常を調べたところ、主に停留精巣、精策静脈瘤、精巣上体嚢胞、精巣低形成、尿管狭窄などを指摘している。M.D.Cosgrove (1977) らは、DES 曝露歴のある男性の健康状況(先天奇形、手術歴、泌尿生殖器系の問題、癌)を質問したところ、尿路生殖器系では、主に停留精巣、尿管狭窄、精策静脈瘤を指摘している。また、停留精巣のリスク要因に関する症例対照研究において、妊娠中の母親の DES 以外のホルモン製剤服用も尿路生殖器系に影響を与えることが、報告されている。R.H.Depue(1984)らの、米国での registrar-based study では、停留精巣の白人男児 300 人とコントロール 599 人に対して症例対照研究を行った結果、妊娠中のエストロゲン剤服用による悪影響(RR=2.8 95%CI=0.9-8.8)が報告されている。一方、C.M.Beard (1984) らの、米国ミネソタ州での、停留精巣男児 113 人と、診療録より選ばれた対照 226 人(コントロール I)、出生記録より選ばれた対照 226 人(コントロール II)による研究では、エストロゲン剤服用(コントロール I: RR=1.3 95%CI=0.5-3.1 コントロール II: RR=1.1 95%CI=0.5-2.6)、プロゲステロン剤服用(コントロール I: RR=1.0 95%CI=0.3-2.9 コントロール II: RR=0.8 95%CI=0.3-2.1)で有意な差が認められていない報告もある。

D. 考察

精巣下降は機械的因子とホルモン因子の相互作用によって生まれる結果と考えられ、詳細な下降メカニズムは不明であるが、第1相の腹腔内下降 **transabdominal phase** と第2相の鼠径陰嚢部下降 **inguinoscrotal phase** の2段階に分かれていると考えられている。機械的因子としては、精巣導体の収縮による牽引説、発達した精巣上体による圧迫説、胎児の発育に伴う相対的下降説、腹圧による押し出し説、などがある。ホルモン因子としては、**Sertoli** 細胞から分泌されるミューラー管発育阻止物質 (**MIS**)、**Leidig** 細胞から分泌されるテストステロンが重要な因子と考えられている。精巣下降の第1相は、アンドロゲンの関与は少なく非アンドロゲンのホルモンや、胎児の精巣から分泌されるミューラー管発育阻止物質 (**MIS**) が腹腔内精巣下降をコントロールしていると考えられている。第2相は、胎児の **Leidig** 細胞から分泌されるアンドロゲン依存性だと考えられている。過去の疫学研究においては、母親の妊娠中の内外からのエストロゲン曝露（母親の肥満、妊娠中の強い吐き気、など）がリスク要因として多く指摘されている。エストロゲン曝露により、精巣下降第1相において関係するといわれる **MIS** の作用を阻害し、また、胎児の **Leidig** 細胞の前駆細胞を抑制することで、第2相に関係するといわれるテストステロンの分泌を阻害し、停留精巣の発生に関連すると考えられている。内分泌攪乱物質である有機塩素化合物のいくつかは、エストロゲンレセプターアゴニストとして作動し、外因性エストロゲンとしてホルモンを変

動させることが知られており、**DES** 等のホルモン製剤も、妊娠中の母親のホルモン動態に影響を与え、停留精巣の発生に関与すると考えられる。しかし、現時点では、停留精巣患児の内分泌攪乱物質への曝露を、定量的に評価した報告がないので、両者の関連は、想像の域を超えない。今後、生体資料を用いた内分泌攪乱物質との定量的な評価が望まれる。

E. 結論

停留精巣と有機塩素化合物について疫学研究をレビューしたところ、現時点では、停留精巣患者に **Heptachlorepoxyde(HCE)**、**Hexachlorobenzene(HCB)** が高濃度に蓄積されていた、という知見1件のみであった。農薬との関連、ホルモン製剤との関連を報告する論文と、有意な関連はないとする論文もある。停留精巣と有機塩素化合物との関連に関する研究はきわめて乏しく、両者の因果関係を適切に評価することは困難であった。今後、信頼性の高い研究デザインを用いた研究の必要性が示唆された。

F. 健康危機情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 笠井 世津子, 岸 玲子: 尿道下裂発生率とリスク要因、『日本衛生学雑誌』、投稿中
- 2) 倉橋典絵, 岸玲子: 停留精巣の発症要因に関する疫学研究—特に内分泌攪乱物質について、『日本衛生学雑誌』、57(4): 636-644 (2003)

2. 学会発表

- 1) 笠井世津子、貢英彦、片倉洋子、築島恵理、藤原恭子、佐藤徹郎、佐田文宏、岸玲子：「FRP ポート工場のスチレン曝露労働者の自覚症状」、第 76 回日本産業衛生学会、山口 (2003.4.23-26)
- 2) 笠井世津子、倉橋典絵、佐田文宏、岸玲子、山田絢子、村雲雅志、柿崎秀宏、野々村克也、小柳知彦：「尿道下裂患者の CYP17 遺伝子多型」、第 73 回日本衛生学会、大分 (2003. 3. 26-29)
- 3) 笠井世津子、倉橋典絵、佐田文宏、岸玲子、村雲雅志、柿崎秀宏、野々村克也、小柳知彦：「尿道下裂のリスク要因に関する症例対象研究」、第 13 回日本疫学会、福岡、(2003.1.24-25)
- 4) 笠井世津子、倉橋典絵、佐田文宏、岸玲子、村雲雅志、柿崎英宏、野々村克也、小柳知彦：「尿道下裂の症例対照研究」、第 11 回日本臨床環境医学会、札幌 (2002.7)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

分担研究報告書

コプラナー PCB による細胞接着因子への影響

— laminin と $\beta 1$ -integrin の量的変化とその臓器特異性 —

分担研究者 山田 英之 九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学専攻分野 教授
研究協力者 石田 卓巳 九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学専攻分野 助手

研究要旨 当研究室では、coplanar PCB (3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl ; PCB126) により、細胞間の接着に関わるタンパク質（細胞接着因子）が大きく変動することを既に明らかにしている。細胞接着因子は細胞間のコミュニケーションを担う物質であり、これが影響を受けた場合、重大な障害が発生する可能性が考えられる。本年度は、同じ細胞接着因子で laminin の細胞表面上の受容体の一つである integrin について、PCB126 による影響を検討した。また、細胞接着に対する影響を検討するため、ヒト肝臓癌細胞 HepG2 cell を用いても併せて検討した。雄性ラットに、PCB126 を腹腔内に単回投与した結果、肝 laminin-1 が数カ所の部位で切断を受けることが示唆された。また、肝臓、胸腺および肺において、臓器特異的な $\beta 1$ -integrin の発現量の減少が観察された。さらに、HepG2 細胞を用いて検討した結果、PCB126 処理により $\beta 1$ -integrin の発現量が変動することが示唆された。今回得られた結果から、PCB126 は、細胞の接着能や、integrin の細胞内へのシグナル伝達に影響を与える可能性が示唆された。

A. 研究目的

油症の原因物質と考えられている polychlorodibenzofuran 類 (PCDFs) や coplanar polychlorinated biphenyl 類 (coplanar PCBs) は、生体に対して多岐にわたる障害を引き起こすことが知られているが、その毒性発現の根源的な機構は未だ不明であり、その危険度も正確には把握されていない。当研究室では、coplanar PCBs の毒性発現機構の解明を目的とし、最も急性毒性が強いことが知られている、3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) を用いて機能性タンパク質の発現量の変化に注目し検討を行ってきた。その一連の

研究の中で、細胞間の接着に関わるタンパク質（細胞接着因子）が大きく変動することを明らかにした。細胞接着因子は細胞間のコミュニケーションを担う物質であり、これが coplanar PCBs によって影響を受けた場合、細胞間の相互作用が障害され、臓器の萎縮や催奇形性および発癌プロモーションなどの重大な障害に帰結する可能性は十分考えられる。そこで、変動する細胞接着因子の中で laminin に着目して検討を行った結果、PCB126 を処理したラットの肝臓と腎臓において、laminin $\gamma 1$ 抗体と特異的に交叉する数十 kDa の複数のバンドが検出された。生理

的な環境における laminin は3量体として存在し、その分子量は約 900 kDa であり、独特の十字架構造を持っている。サブユニットとしては、約 400 kDa の α 鎖と 130~200 kDa の β 鎖および γ 鎖からなる糖タンパク質ファミリーである

(1)。上述の以前の実験結果は、PCB126 が少なくとも laminin $\gamma 1$ サブユニットのフラグメント化を誘発する可能性を示唆する。

以上の結果を基に、本年度は、同じ細胞接着因子で laminin の細胞表面上の受容体の一つである integrin についても、PCB126 処理により影響が現れる可能性があるのではないかと考え、PCB126 処理したラットの各臓器における $\beta 1$ -integrin の発現量を比較検討した。また、細胞接着に対する影響を検討する目的として、ヒト肝臓癌細胞 HepG2 cell に PCB126 を曝露し、それによる細胞接着因子の量的変動についても検討した。

B. 方法・結果

PCB126 処理によるラット各臓器における $\beta 1$ -integrin への影響

Integrin は分子量約 140 kDa の α 鎖と約 90~110 kDa の β 鎖からなる糖タンパク質であり、laminin、collagen および fibronectin などの細胞外マトリックスをリガンドとする細胞膜上のレセプターである。16 種類の α 鎖と 8 種類の β 鎖が報告されており、それらの組み合わせから、22 種類の integrin が知られている。これらは、細胞外マトリックスと結合して細胞と細胞外マトリックスの接着を担い、また結合により細胞外からのシグナルを細胞内に導入する役目を果たしている。その生理的機能は、器官形成、癌の

浸潤・転移、細胞の移動・増殖や免疫機能の調節など多岐にわたっている (2)。

中でも、 $\beta 1$ -subunit は、laminin を始めとする細胞外マトリックスのレセプターとして構成される integrin において、最も構成比率が高いことが知られている。そこで、 $\beta 1$ -integrin の発現量について、PCB126 処理による影響とその臓器特異性の検討を行った。4 週令 Wistar 系雄性ラットに、コーンオイルに溶解した PCB126 を 10 mg/kg body weight/2 ml corn oil となるように腹腔内に単回投与した。また、コントロールとして、食餌を自由に摂取させ、コーンオイルのみを投与した free-fed 群、さらに、PCB126 を処理することによって摂餌量が減少することが知られているが、これを評価するためのコントロールとして、体重当たりの食餌量が PCB126 処理群と同量になるように食餌制限を行った pair-fed 群も準備した。各群とも投与 5 日後に屠殺し、肝臓、腎臓、肺、脾臓、精巣、胸腺および脂肪組織を摘出した。摘出した各臓器から、ホモジネートサンプルを調製し、SDS-PAGE でタンパク質を分離したのち、免疫染色にて発現量を検討した。

1) 肝臓における検討

ラット肝臓における検討結果を Fig. 1 に示す。Fig. 1 (a) は、 $\beta 1$ -integrin 抗体を用いて免疫染色を行った結果であり、Fig. 1 (b) には、各バンド強度を free-fed コントロール群の平均を 100 として定量したグラフを示している。この結果から、PCB126 処理ラット肝臓において、 $\beta 1$ -integrin の発現量が減少する傾向にあることが示唆された。本来、分子量が 110 kDa の $\beta 1$ -integrin のバンドが 46 kDa の位置

に見えることについての理由は不明であるが、発色時に最も早く視認できたバンドであったので、 $\beta 1$ -integrin 由来のものであると考えられた。

2) 胸腺における検討

ラット胸腺では、免疫染色の結果、44 kDa と 40 kDa に 2 本のバンドが観察された (Fig. 2 (a))。Fig. 2 (b) では、44 kDa のバンドを upper band、40 kDa のバンドを lower band とした際の、free-fed 群のバンド強度を 100 とした各群のバンド強度を比較している。図から明らかなように、胸腺においては $\beta 1$ -integrin の発現量が変動しないことが明らかとなった。PCB126 処理群のサンプル 3 つのうち 2 つからは 44 kDa と 40 kDa のどちらのバンドも検出されず、胸腺においても PCB126 処理により、 $\beta 1$ -integrin の発現量が減少する傾向にあると考えられた。本組織において、44/40 kDa の 2 バンドパターンが観察される理由については不明である。

3) 肺における検討

肺でも胸腺での結果と同じく 44 kDa と 40 kDa に特異的なバンドが検出された (Fig. 3 (a))。また、Fig. 3 (b) にはバンド強度の定量を行ったグラフを示しているが、PCB126 処理によって、肺においても $\beta 1$ -integrin の発現量が減少する傾向があった。

4) その他の臓器における検討

その他の臓器 (脾臓、腎臓、精巣、脂肪組織) において同様の検討を行ったが、free-fed 群、pair-fed 群および PCB126 処理群のいずれの群間においてもバンド強度に差は見られなかった (データ未掲載)。

HepG2 cell への PCB126 処理による細胞接着因子に対する影響の検討

次に、ヒト肝臓癌細胞 HepG2 cell に PCB126 を曝露し、それによる細胞接着因子の量的変動について検討した。細胞培養用ディッシュ (100 mm) に 10^6 個の細胞をまき、10% fetal bovine serum (FBS) 含有の minimum essential medium (MEM) 中で培養を行った。細胞が 70% コンフルエントに達したとき、培地を 1% FBS の MEM に交換し、24 時間培養を行った。1 群 5 ディッシュとして 4 群準備し、一群には DMSO のみを添加、あとの 3 群には DMSO に溶解した PCB126 をそれぞれ 0.1、1.0 および 10.0 μ M の濃度になるように添加し、更に 24 時間培養した。培養後、細胞を phosphate buffered saline (PBS) で洗浄し、sucrose buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5) - 0.25 mM sucrose - 0.1 mM EDTA) 1 ml を加えてラバーポリスマンではぎ取り、エッペンドルフチューブに移したのち、遠心して上清を除いた。得られた細胞に 1 mM PMSF 含有 sucrose buffer を 500 μ l 加え、ソニケーションしてサンプルとし、 $\beta 1$ -integrin 抗体を用いて免疫染色法により解析した。その結果を Fig. 4 に示す。PCB126 の曝露量の増加に伴いバンド強度が増加するが、10.0 μ M の曝露では却って減少することが明らかとなった。この結果より、 $\beta 1$ -integrin も PCB126 により発現変動することが示唆された。

PCB126 処理による $\beta 1$ -integrin の発現量増加という結果は in vivo での実験結果と矛盾していた。これは、 $\beta 1$ -integrin はその遺伝子上流に XRE 配列が存在しないため、PCB126 によって直接発現量が

変動せず、PCB126により変動したタンパク質によって2次的に変動するものであるためと考えられる。すなわち、HepG2 cellにおいては β 1-integrin制御に関わるタンパク質の変動がin vivoとは異なるためと考えられた。

C. 考察

本研究より、PCB126を処理したラット肝臓において、laminin-1が、数カ所の部位で切断を受けることが示唆された。また、肝臓、胸腺および肺において、PCB126処理により特異的に β 1-integrinの発現量が減少することが観察された。さらに、ヒト肝臓癌細胞であるHepG2細胞を用いて検討した結果、PCB126処理により β 1-integrinの発現量が変動することが示唆された。今回得られた結果から、PCB126処理した細胞の接着能の測定や、integrinの細胞内へのシグナル伝達によりリン酸化される物質の活性の測定などの解析を行うことが、PCB126処理によって変動した β 1-integrinによる生体への毒性とその発現機構の解明につながるのではないかと考えられる。

D. 参考文献

1. Beck, K., Hunter, I. and Engel, J., Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB J.*, 4, 148-160 (1990).
2. 林 正男, 宮本 泰則, インテグリン研究の生い立ちと現状. *蛋白質核酸酵素*, 44, 130 - 135 (1999).

E. 研究発表

- 1) フォーラム 2002 : 衛生薬学・環境トキシコロジー (広島, 2002年10月)

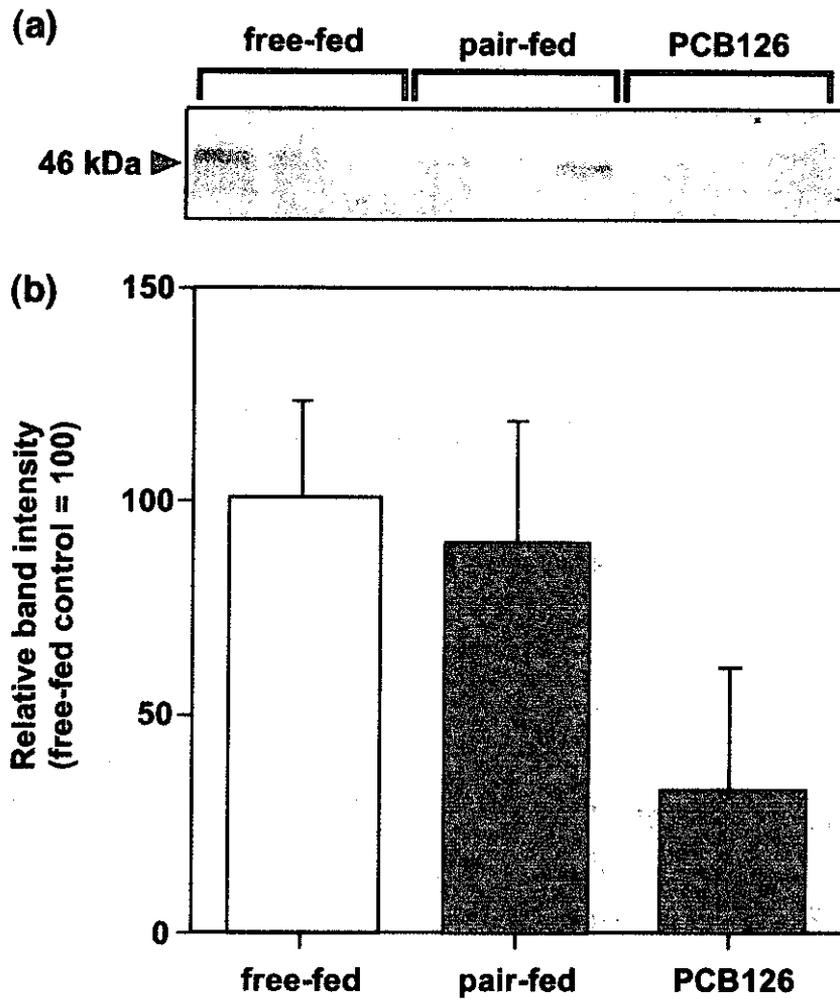


Fig. 1. Western blot analysis of β 1-integrin in livers of rats treated with PCB126. Liver homogenates (100 μ g protein) from free-fed, pair-fed and PCB126-treated rats were subjected to SDS-PAGE (10% polyacrylamide gel) and blotted with anti- β 1-integrin antibody.

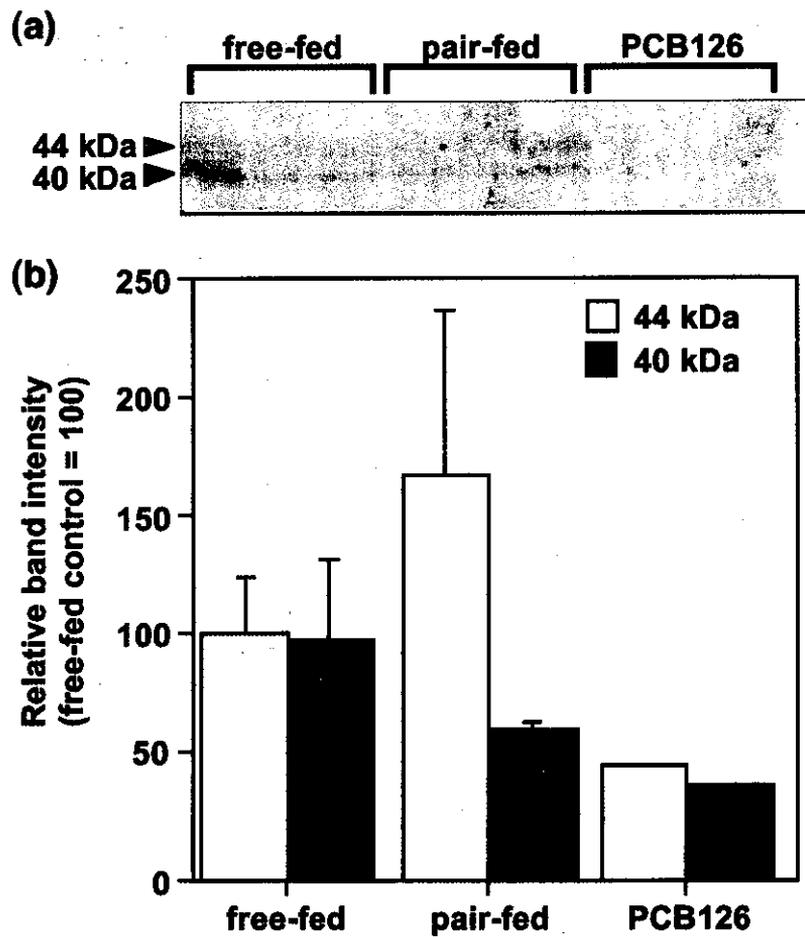


Fig. 2. Western blot analysis of β 1- integrin in thymus of rats treated with PCB126. Thymus homogenates (100 μ g protein) from free-fed, pair-fed and PCB126-treated rats were subjected to SDS-PAGE (10% polyacrylamide gel) and blotted with anti- β 1-integrin antibody.

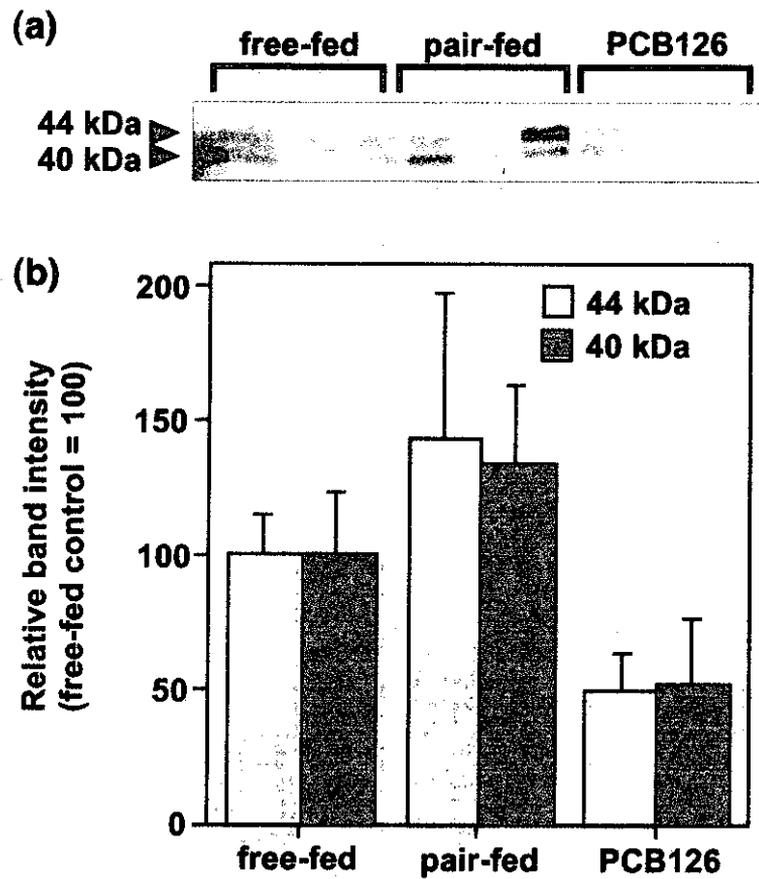


Fig. 3. Western blot analysis of β 1- integrin in lungs of rats treated with PCB126. Lung homogenates (100 μ g protein) from free-fed, pair-fed and PCB126-treated rats were subjected to SDS-PAGE (10% polyacrylamide gel) and blotted with anti- β 1-integrin

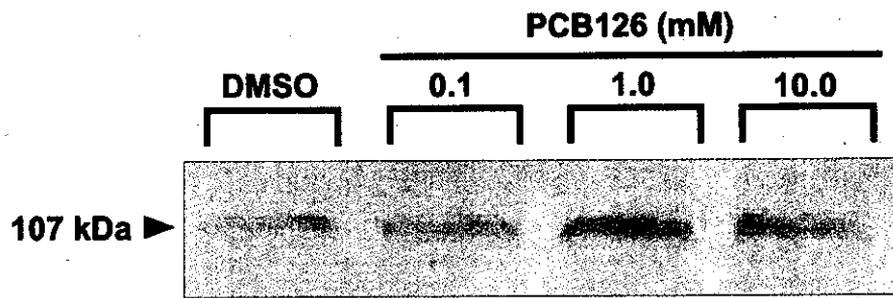


Fig. 4. Western blot analysis of $\beta 1$ -integrin HepG2 cell treated with PCB126. HepG2 cell lysates (100 μ g protein) were subjected to SDS-PAGE (10% polyacrylamide gel) and blotted with anti- $\beta 1$ -integrin antibody.

分担研究報告書

Aromatase 欠損マウスでの生殖毒性を指標とした TCDD の抗エストロゲン作用の解析

分担研究者 山田 英之 九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学専攻分野 教授
研究協力者 石田 卓巳 九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学専攻分野 助手

研究要旨 ダイオキシン類の生殖毒性の機構を解明するための一環として、アロマトラーゼノックアウト (ArKO) マウスを用いて、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) による抗エストロゲン作用について検討した。その結果、ArKO 雄マウスにおける性行動不全については、エストラジオール (E₂) 依存的な一定の回復が起り、これは TCDD によって阻害されなかった。一方、ArKO 雌マウスにおける子宮萎縮は、E₂ 処置により回復したが、TCDD の前処理により回復が阻害されることが明らかとなった。さらに、TCDD を処置した野生型マウスの子宮重量は、萎縮傾向にあることが認められた。以上の結果から、性別による程度の差は認められるものの、TCDD が、E₂ の作用に拮抗することが示唆された。

A. 研究目的

コプラナー PCB を含むダイオキシン類は、非常に毒性の強い環境汚染物質の一つであり、ヒトを含めた生態系への影響が危惧されている。中でも 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) や 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) は、催奇形性、発癌プロモーション作用、体重増加抑制、胸腺や脾臓の萎縮および肝障害など多岐に亘る毒性を引き起こすことが知られている。ダイオキシン類による毒性の中でも、近年、生殖系への悪影響が注目されている。妊娠 15 日目に TCDD を 0.064 µg/kg 経口投与したラット母獣から生まれた仔は、生殖器および性行動に影響を受けることが報告されている¹⁾。また、成熟雌マウスに TCDD 曝露するとエストラジオール (Estradiol; E₂) 刺激に対する子宮の反

応性が低下することも明らかになっている²⁾³⁾。このようなダイオキシン類の毒性は、一般に抗エストロゲン作用によるものといわれているが、その具体的な作用機構については不明な点が多い。

一般に、成熟した個体に外因性ホルモンもしくはホルモン様作用物質を多少与えても、恒常性維持機能 (視床下部 - 下垂体 - 性腺フィードバック系) が働くため顕著な変化は観察されない。しかし、適切なフィードバック機構を無くした状態では、標的臓器 (副生殖腺) に影響が現れることが知られている。

一例として、雄性マウスにおける性行動不全が挙げられる。脳には性的二型核という雌雄で構造の異なる部分が存在する。哺乳類の脳の基本は雌型であるが、この雌型の脳は、誕生直後を臨界期として、アンドロゲン曝露により雄型の脳に分化する。この機構には、

間脳で誘導されるアロマトラーゼが重要な役割を担っており、精巣から放出されるアンドロゲンによって誘導されるアロマトラーゼが、アンドロゲンをエストロゲンへ変換する。ここで産生されたエストロゲンが近傍の神経細胞の増殖を促す結果、脳が雄型に分化することが明らかとなっている。

一方、雌性マウスにおいては、子宮が標的臓器となる。卵巣は、下垂体前葉から分泌される卵胞刺激ホルモン (FSH) によりエストロゲンを産生し、子宮内膜を肥厚・増殖させる。この時、エストロゲンの分泌が亢進しピークに達すると、下垂体からの FSH の分泌が抑制され、一時的に大量の黄体形成ホルモン (LH) の放出 (LH-surge) が起こり排卵する。排卵後の卵巣は、黄体と呼ばれる組織に変化するが、黄体からはプロゲステロンが分泌され、子宮内膜を受精卵がより着床しやすい状態に変化させる。ここで妊娠が成立しなかった場合、エストロゲン及びプロゲステロンの分泌が低下して月経となり、再び新しい性周期を迎える。

外因性の性ホルモンもしくは性ホルモン様物質の影響を検討するため、アンドロゲンをエストロゲンへ変換する酵素であるアロマトラーゼをノックアウトしたマウス (ArKO マウス) が用いられている。ArKO マウスは、内因性のエストロゲンを欠損するため、雄では脳の未分化による性行動不全 (繁殖力の低下)、雌では卵巣からの E_2 の分泌不全による子宮の萎縮 (子宮の重量の減少) が観察される。この異常は、エストロゲン補充により解消するが^{4) 5)}、仮にダイオキシン類が抗エストロゲン作用を持つならば、ArKO マウスにエストロゲンと同時に処置した場合、異常状態から

のエストロゲンによる回復が阻害されることが予測される。そこで、本研究では、ArKO マウスを用い TCDD による抗エストロゲン作用について検討した。

B. 方法・結果

マウス遺伝子型の判別

本研究で用いた ArKO [Ar (-/-)] マウスは、Hondaらにより作製されたものであり、エクソン1、エクソン2およびプロモーター領域を含む部分を Neomycin 耐性遺伝子に置換することにより、アロマトラーゼ遺伝子を欠損するようデザインされている⁶⁾。このマウスは、欠損遺伝子のホモ型マウスの雌雄を交配させて得ることができないため、ヘテロ型のマウスの交配によって生産される。この場合、出生した仔の遺伝型には、野生型 (Wild type; WT)、ノックアウト型 (Knockout type; KO) およびヘテロ型の3つのタイプが存在するため、実験に使用するマウスはあらかじめ遺伝子型を判別する必要がある。そこで、本検討を行う前段階として、ノックアウト型のマウスを判別するため、遺伝子型を PCR 法により調べた。生まれたマウスの尾から genomic DNA を抽出し、これを鋳型として、3種類のプライマー (AR-OV1, AR-OV2 および Neo-6R) を用いて PCR を行い、増幅産物のサイズに注目し遺伝子型を判別した。この結果、野生型 [Ar (+/+)] の場合、AR-OV1/AR-OV2 による 500 bp の増幅のみが観察され、ArKO 型 [Ar (-/-)] の場合、Neo-6R/AR-OV2 による 190 bp の増幅のみが観察され、ヘテロ型 [Ar (-/+)] の場合、2種類の増幅が観察された (Fig. 1)。これらのパターンの違いにより、Ar (+/+) および Ar (-/-) マウスを判別し、以下の実験に

用いた。

TCDDおよび E₂ 処置

TCDD による抗エストロゲン作用について検討するため、Fig. 2 に示す投与計画にて検討を行った。本検討では、TCDD のマウスにおける母獣から仔への移行率⁷⁾ およびラットにおいて性行動不全が認められる TCDD 曝露量¹⁾ を考慮し、出生日に TCDD 2.4 µg/20 µl を皮下に投与した。また、E₂ の投与量については、雄の場合は、ArKO マウスの繁殖能が回復する投与量・投与方法⁴⁾ を、また、雌の場合は、子宮重量が回復する投与量・投与方法⁵⁾ を参考に設定した。

雄マウスの性行動に与える影響

雄の性行動については、出生後 70 日目以降に、1 - 3 週間の間隔をおいて観察を行った。試験は動物舎消灯後 1 時間以降に、1 匹につき 1 回 30 分間、性行動をビデオテープで撮影し、mount、mount latency、intromission および intromission latency の 4 つの項目を計測した。今回、野生型とノックアウト型のそれぞれに Control、E₂、TCDD および TCDD + E₂ 処理を行い検討した。その結果を Fig. 3 に示す。ArKO-Control 群の mount および intromission の回数は、WT-Control 群に比べ著しく低く、さらに、これら 2 つの行動での latency は有意に延長していた。これに対し、性行動不全の回復が期待された ArKO-E₂ 群は、mount と sniffing の回数に回復の傾向が見られたものの、WT-E₂ の水準までの回復は見られなかった。一方、野生型雄マウスの TCDD 処理により、intromission latency を除く全て

の指標が有意に低下しており、出生時の TCDD 単回投与が、成熟後の性行動不全を惹起する事ことが確認された。TCDD と E₂ の併用処理の結果、野生型においては、TCDD 依存的な性行動障害が改善される傾向が認められた。これに対し、ArKO 型では、E₂ による性行動回復効果が、TCDD によって全く抑制されず、TCDD の性行動に及ぼす効果は、少なくとも一部は一定のエストロゲンレベルを保持することにより防止できる可能性が示唆された。

雌マウスの子宮重量に与える影響

雌マウスは、出生日に TCDD もしくは溶媒のみを皮下に投与した。その後、離乳するまで薬物処置を行わず、28 日目以降 4 日おきに 52 日目まで皮下に E₂ または溶媒のみを投与した。さらに、56 日目に子宮を取り出し、その重量を測定した。その結果 (Fig. 4)、WT-Control 群に比べ WT-TCDD 群の子宮重量が減少することが明らかとなった。これは、内因性の E₂ の作用に TCDD が拮抗しているためだと考えられた。また、ArKO-Control 群の子宮重量も、WT-Control 群に比べ著しく減少していたが、ArKO-E₂ 群では、ArKO-Control 群より子宮重量が増加し、WT-Control 群と同程度にまで回復していた。さらに、この E₂ による回復は TCDD により阻害されることも明らかとなった。

C. 考察

本研究は、ダイオキシン類の抗エストロゲン作用について、ArKO マウスを用いて検討を行った。以下に、得られた知見を要約する。

1. ArKO マウスの性行動異常は、 E_2 の投与を新生仔期から開始しても十分な回復効果を得ることができなかった。しかし、 E_2 依存的な一定の性行動回復が起こり、これは TCDD によって阻害されなかった。従って、TCDD の性行動障害作用の少なくとも一部は、一定のエストロゲンレベルが保持された環境では発現しないことが示唆された。

2. 雌の ArKO マウスの子宮萎縮症状は、 E_2 を出生後 28 日目から投与した結果、野生型のマウスと同レベルまで回復した。また、TCDD を野生型の新生仔に投与した結果、子宮重量抑制効果が出生後 56 日目まで持続することが認められた。ArKO マウスにおける E_2 と TCDD 処理の検討から、TCDD の子宮障害性は、一部エストロゲンレベルの低下に起因している可能性が示唆されたが、そのみよっての説明は不可能と考えられた。

本検討において、ArKO 雄マウスに見られる性行動不全は、 E_2 処理により部分的にしか回復が見られなかった。この原因として、生殖機能回復の評価法が異なる事が考えられる。すなわち、この ArKO 雄マウスにおける性行動不全に関して、Toda らは、雄 1 匹に雌 2 匹を 2 ヶ月交配させ、仔が生まれるかどうかで繁殖能の測定を行っている⁴⁾⁵⁾。これに対し、本検討における生殖機能回復の評価は、雄マウスの発情雌マウスに対する行動指標を 30 分間観察し計測するものであった。このような評価法の違い

が、結果の相違に反映された可能性が考えられる。

今回の研究は、ArKO 雄マウスにおける外来性 E_2 依存的な性行動獲得と維持に対する TCDD 作用の評価を目的として行ったものである。しかし、その基盤となる E_2 依存的な性行動樹立が不十分である以上、TCDD の抗エストロゲン作用を十分に評価することはできなかった。ただ、ArKO 雄マウスの性行動不全が、ある程度まで外来性 E_2 依存的に回復することができ、この回復が TCDD によって全く阻害されなかったことから、循環 E_2 の濃度が一定の水準以上維持されれば、TCDD による障害性が防御されることが示唆された。また、野生型の雄マウスにおいても、TCDD 依存的な性行動障害が、 E_2 の併用によって改善されるかもしくはその傾向のあることが認められた。これらの結果を合わせて考えると、野生型雄マウスにおける TCDD の性行動に与える影響の一部は、エストロゲンレベルの低下に起因している可能性が考えられた。

雌の子宮重量を測定した結果、ArKO マウスの子宮は萎縮していることが確認されたが (Fig. 4)、この萎縮は E_2 処置により回復した。これに対し、あらかじめ TCDD を処置しておく、 E_2 による子宮重量の回復が阻害されており、さらに、TCDD を処置した野生型マウスの子宮重量は萎縮傾向が認められた。以上の結果から、ArKO 雌マウスにおいては、TCDD が、 E_2 の作用に拮抗することが示唆された。

D. 参考文献

1. Mably, T. A., Moor, R. W., Goy, R. W. and Peterson, R. E., In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 2. Effects on sexual behavior and the regulation of luteinizing hormone secretion in adulthood. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **114**, 108-117 (1992).
2. Umbreit, T. H., Hesse, E. J., Macdonald, G. J. and Gallo, M. A., Effects of TCDD-estradiol interactions in three strains of mice. *Toxicol. Lett.*, **40**, 1-9 (1988).
3. DeVito, M. J., Thomas, T., Martin, E., Umbreit, T. H. and Gallo, M. A., Antiestrogenic action of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: Tissue-specific regulation of estrogen receptor in CD1 mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **113**, 284-292 (1992).
4. Toda, K., Takeda, K., Okada, T., Akira, S., Saibara, T., Shiraishi, M., Onishi, S. and Shizuta, Y., Oestrogen at the neonatal stage is critical for the reproductive ability of male mice as revealed by supplementation with 17 β -oestradiol to aromatase gene (Cyp19) knockout mice. *J. Endocrinol.*, **168**, 455-463 (2001).
5. Toda, K., Okada, T., Takeda, K., Akira, S., Saibara, T., Kaname, T., Yamamura, K., Onishi, S. and Shizuta, Y., Targeted disruption of the aromatase P450 gene (Cyp19) in mice and their ovarian and uterine responses to 17 β -oestradiol. *J. Endocrinol.*, **170**, 99-111 (2001).
6. Honda, S., Harada, N., Ito, S., Takagi, Y. and Maeda, S., Disruption of sexual behavior in male aromatase-deficient mice lacking exons 1 and 2 of the cyp19 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **252**, 445-449 (1998).
7. Heinz, N. and Rolf, B., Transfer of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) to the mouse embryo and fetus. *Toxicology*, **20**, 299-308 (1982).