

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

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 15 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 16 (2004) 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-----	1
遠山 千春 ((独) 国立環境研究所環境健康研究領域 領域長)	
II. 分担研究報告	
1. 3,3',4,4',5-ペンタクロロビフェニル (PCB126) による新生仔マウスの生殖細胞およびステロイド合成系に対する影響-----	13
遠山 千春 ((独) 国立環境研究所環境健康研究領域 領域長)	
2. 胎仔期ダイオキシン類曝露による前立腺発育遅延に関する原因遺伝子のマイクロアレイ解析-----	32
遠山 千春 ((独) 国立環境研究所環境健康研究領域 領域長)	
3. コプラナーPCB (PCB118、PCB114) の AhR 非依存性の甲状腺ホルモンおよびレチノイド代謝に及ぼす影響とメカニズムの検討-----	38
遠山 千春 ((独) 国立環境研究所環境健康研究領域 領域長)	
4. コプラナーPCB と TCDD の毒性発現機構の比較解析-----	49
前田 秀一郎 (山梨大学大学院医学工学総合研究部 教授)	
5. コプラナーPCB と TCDD の学習行動への影響の比較解析-----	60
遠山 千春 ((独) 国立環境研究所環境健康研究領域 領域長)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	69
IV. 研究成果の刊行物・別刷-----	71

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、本年度は、TCDDに対する感受性が異なる系統のマウスやラットに、TCDD、コプラナーPCB異性体(PCB114,118,126)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、学習機能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、DNAマイクロアレイを用いて、雄性生殖器遅延、甲状腺ホルモン・レチノイド代謝、学習機能の変化が生じる条件下で、遺伝子の網羅的解析を行い、標的遺伝子の候補の検出をした。

分担研究者

前田秀一郎 山梨大学大学院医学工学総合研究部 教授

研究協力者

掛山正心、大迫誠一郎、福澤徳穂 国立環境研究所・環境健康研究領域

西村典子、米元純三、横井千紗子、竹内陽子 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. はじめに

ダイオキシン類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類の量は、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、ダイオキシン類による影響は2,3,7,8-四塩素化ジベンゾ-p-ジオキシン(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、TCDD、ならびにコプラナーPCBのうち、PCB126、PCB114及び118をを投与した動物、あるいは細胞を用いて非2,3,7,8-四塩素化ジベンゾ-p-ジオキシン(TCDD)毒性のうち、雄性生殖器における精

子形成、甲状腺ホルモンとレチノイド代謝、ならびに学習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、妊娠期曝露の胎仔における遺伝子の網羅的解析や脳機能、さらには、PCB118と114の甲状腺ホルモン・レチノイド代謝への作用の解明のため、遺伝子の網羅的解析を行った。

B. 研究目的

B-1. 3,3',4,4',5-ペンタクロロピフェニル (PCB126) による新生仔マウスの生殖細胞およびステロイド合成系に対する影響 (主任研究者 遠山 千春)

子宮内及び授乳期のラットへの TCDD 曝露により引き起こされる生まれた雄ラットの生殖系への影響として、一日精子産生数の減少や生殖器重量の減少が報告されている。他方、同様の実験条件で、前立腺腹葉の重量の減少は認められるが、一日精子産生数や精巣重量の減少が観察されないと我々の報告もある。すなわち、ダイオキシン類の精子形成に及ぼす影響には、系統差に加えて、実験条件の違いにより、得られる結果に用量との対応が一定していないという問題がある。他方、PCB の異性体の中で最も TCDD 様毒性を有する PCB126 を $10 \mu\text{g}/\text{kg bw}$ の用量で GD 15 の Wistar 系ラットの母親に経口単回投与した実験においては、雄産仔の精巣重量や DSP には変化が無いが、テストステロン濃度は統計学的に有意に減少をしたとの報告がある。この結果が TCDD 類似の作用か、あるいは PCB 特有の作用であるのかを示すことは、コプラナー PCB の非 TCDD 毒性評価のために重要である。

そこで、我々はコプラナー PCB (PCB126) のもつ TCDD 毒性と PCB 特有の非 TCDD 毒性の現れ方の違いを検討するために、PCB126 を用いてほ乳類の精子発生、ステロイド合成に及ぼす影響を検討した。

B-2. 胎仔期ダイオキシン類曝露による前立腺発育遅延に関する原因遺伝子のマイクロアレイ解析 (主任研究者 遠山千春)

ダイオキシン類の母体曝露による生まれた子の雄性生殖器官発育への影響は極めて低用量で起こる。ラット及びマウスにおける実験から、TCDD による前立腺発育遅延現象には、AhR に依存性であり、臨界時期が存在することが、我々や他の研究グループにより報告されている。ダイオキシン曝露の代表的バイオマーカーである薬物代謝酵素 CYP1A1 や CYP1B1 の誘導は、妊娠後期および出生後の TCDD 曝露でも標的器官である泌尿生殖器複合体内部で観察されることから、このような変動遺伝子以外の臨界時期においてのみ感受性をもつ何らかの AhR 応答性遺伝子が原因遺伝子である推測される。

本研究においては、この現象を起こす TCDD と AhR に依存性の遺伝子を探索するため、野生型マウスに同一用量 TCDD ($10 \mu\text{g}/\text{kg}$) を GD13 または GD17 に投与し、24 時間後に雄胎仔の全 RNA を回収し、マイクロアレイ解析を行うことで、その原因遺伝子の探索を試みた。

B-3. コプラナー PCB (PCB118、PCB114) の AhR 非依存性の甲状腺ホルモンおよびレチノイド代謝に及ぼす影響とメカニズムの検討 (主任研究者 遠山千春)

ダイオキシン類は、甲状腺ホルモンを低下させたり、レチノイド代謝を攪乱する作用がある。そのメカニズムとして、Ah レセプター(AhR)を介し、肝の UGT1 (UDP-1-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。他方、PCB の水酸化代謝物による甲状腺ホルモン及びレチノイド代謝への作用メカニズムとして、T4 輸送タンパクである

トランスサイレチン(TTR)への PCB 水酸化代謝物の競争的結合が考えられている。本実験では、PCB118 または PCB114 を投与した TTR 欠損マウスにおける甲状腺ホルモンおよびレチノイド代謝に及ぼす影響を調べ、併せて遺伝子の発現レベルの網羅的解析を行うことにより PCB の毒性指標をの可能性を探索した。

B-4. コプラナーPCBとTCDDの脳の発達過程における毒性発現機構の比較解析

(分担研究者：前田秀一郎)

本研究では、コプラナーPCB の毒性メカニズムを TCDD 類似メカニズムと非 TCDD メカニズムに分類することを目的に、先ず TCDD の毒性発現機構の解明を目指し、以下の実験を行った。(1) 胎仔期における TCDD 曝露が成熟後の記憶・学習行動へ及ぼす影響を調べるため、仔の成熟後に contextual fear conditioning test を用いて、脳の高次機能への影響について検討し、脳の高次機能における cyclic AMP response element binding protein (CREB)と呼ばれる転写因子の活性化を検討した。(2) 胎仔脳の mRNA の量や種類を、対照非投与妊娠マウスの胎仔のそれらと DNA マイクロアレイ法で比較し、差異のある cDNA クローンを網羅的に検索、同定した。(3) c-Src を介した TCDD/AhR の毒性発現機構を明らかにするため、先ず Hepa-1c1c7 細胞と c-Src の誘導発現系を導入した NIH3T3 細胞(RN 細胞に TCDD を曝露、c-Src の活性化を検討した。

B-5. コプラナーPCB と TCDD の学習行動への影響の比較解析 (主任研究者 遠山千春)

妊娠期への TCDD 曝露が出生後のラットの学習機能へ影響することが報告され、ヒトの高次脳機能に影響することも示唆されている。環境から同時に曝露をしているコプラナーPCBを含むPCB類に関しても、疫学調査で母親の血中PCB濃度と子供のIQに高い相関関係があることが報告されているが

根拠となるデータが少なく、PCBの直接影響なのか断定できない状況にある。また、TCDDとPCBの毒性の異同も未だ解明されていない。そこで本研究では、妊娠期の TCDDあるいはコプラナーPCBである3, 3', 4, 4', 5-五塩素化ビフェニル (PCB126)の母体曝露が発達中の胎子脳に及ぼす影響について、生まれた仔の記憶・学習行動に焦点を当て検討した。

C. 研究方法

C-1. 3,3',4,4',5-ペンタクロロビフェニル (PCB126) による新生仔マウスの生殖細胞およびステロイド合成系に対する影響 (主任研究者 遠山 千春)

ICR 系統の雄マウスが出生直後 (PND 0) に、精巣を摘出して器官培養を行った。培養液には PCB126 (最終濃度 0, 10, 100, または 1000 nM) を添加した。培養 96 時間後に、BrdU を添加後、さらに 1 時間培養した。また対照群として PCB126-free の培養液を用いて培養した精巣を用いた。培養精巣は Carnoy's 液を用いて固定後、パラフィン包埋した。その後、所定の方法に基づき、抗-BrdU マウスモノクローナル抗体を用いて免疫組織化学的に BrdU-陽性の生殖細胞とセルトリ細胞数を計測した。標本あたりの生殖細胞とセルトリ細胞の全個数で割ることによって相対値化した。培養精巣でアポトーシスを検出するため In-Situ 細胞死検出キットを使用し、TUNEL 試薬で検出した。

培養精巣 (n=4) 由来の全 RNA は QIA prep RNA 精製キットを用いて調製した。RT-PCR により、hsp86, calnexin-t, protamine-2, androgen binding protein (ABP), cytochrome P450 1A1 (CYP1A1), cytochrome P450 side chain cleavage (P450scc), cytochrome P450 17 β -hydroxylase /17,20-lyase (P450c17), 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase-type I (3 β -HSD), 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type III (17 β -HSD), cyclophilin, G3PDH の半定量

解析を行った。

C-2. ダイオキシン胎仔期ダイオキシン類曝露による前立腺発育遅延に関する原因遺伝子のマイクロアレイ解析 (主任研究者 遠山千春)

妊娠 C57B/6J マウスの GD13 と GD17 に TCDD を 10 µg/kg 体重 (5 ml/kg) にて経口投与した。投与 24 時間目に胎仔を摘出した。この胎仔サンプルを TRIZOL で処理し、トータル RNA とゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA を用いた SRY 遺伝子の PCR 解析により性判定を行い、雄胎仔を選別した。各群 5 個体分の RNA サンプル 100 µg を混合し、GD13-TCDD 投与群、GD17-TCDD 投与群、GD13-Vehicle 投与群、GD17-Vehicle 投与群とし、マイクロアレイ解析に用いた。RNA サンプルは DNase I 処理し、逆転写により Cy3 ラベルした cDNA プローブを作成した。この蛍光ラベルをマイクロアレイ

(Atlas Glass Array Mouse 3.8 I, CLONTECH) にハイブリダイズし、マイクロアレイスキャナー (GenePix) にてスキャンニングし、スポットインテンシティをソフトウエア (ArrayGauge software) で解析した。

C-3. コプラナーPCB (PCB118, PCB114) の AhR 非依存性の甲状腺ホルモンおよびレチノイド代謝に及ぼす影響とメカニズムの検討 (主任研究者 遠山千春)

12 週齢雄の TTR-遺伝子欠損マウス (TTR^{-/-}) と野生型マウス (TTR^{+/+}) マウスを用いた。マウスに PCB118 または PCB114 を 50 mg/kg bw の用量で単回経口投与し、その 7 日後に血液と肝臓を採取し、分析材料とした。血清中 Total T4 (TT4) は、RIA 法により定量した。血清及び肝臓中のレチノイドの定量は、血清及び肝臓を前処理後に、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて、レチノール (Retinol)、パルミチン酸エステル (Retinyl palmitate) に加え、Retinyl esters のうちの 7 種類について測定し、これらの総和を Total retinoid と

して定量した。肝臓中の CYP1A1 は、抗 CYP1A1 抗体を用いて、アビジン・ビオチン複合体法により検出した。

各群の雌マウス 3 匹分の肝臓モジネート液を 1 試料として、DNA チップ解析を行った。

C-4. コプラナーPCB と TCDD の脳の発達過程における毒性発現機構の比較解析 (分担研究者: 前田秀一郎)

妊娠 15 日目の Wistar/ST ラットに 1 µg/kg の TCDD を強制経口投与し、生まれた仔ラットを 11 週齢で雌雄ともに生殖腺を摘出し、12 週齢で海馬依存性学習行動への影響を contextual fear conditioning test で検討した。contextual fear conditioning test 終了後、直ちにラットの脳を採取し、海馬 CA1 領域における CREB とこの Ser133 がリン酸化された CREB(p-CREB) の量を、免疫組織化学的方法により調べた。

TCDD を 5 µg/kg の用量で GD12.5 の C57BL/6N マウスに経口投与し、6 日後、雌雄の胎仔、計 12 匹の脳全体から採取した RNA サンプル中の種々の mRNA の量を、DNA マイクロアレイ法で比較解析した。

Hepa-1c1c7 細胞と c-Src の誘導発現系を導入した NIH3T3 細胞 (RN 細胞) の培地中に、TCDD を最終濃度 10 nM となるように加え、c-Src の活性化が起こるかどうかを ウェスタンブロットティングによる活性化 Src の検出、細胞可溶化物中の c-Src キナーゼの比活性の比較、細胞の TritonX 不溶画分中の c-Src レベルの解析により検討した。

C-5. コプラナーPCB と TCDD の脳の発達への影響の比較解析 -学習行動 (主任研究者 遠山千春)

妊娠 Long-Evans ラットに、GD15 の時点で、TCDD を 50, 200, 800 ng/kg (それぞれ T50, T200, T800 群) または PCB126 を 500, 2000, 8000 ng/kg (P500, P2000, P8000 群)、コントロール群としてコーン油を単回経口

投与した。仔動物に対し、生後 80 日目から実験終了まで給餌制限を行い、体重を雄 290-330g、雌 200-255g に維持した。

各腹の雌雄 1-2 匹の仔動物を用い、オペラント行動試験を行った 12 週齢以降、二種類のレバー押し課題を訓練した。一つは定率強化(Fixed Ratio, FR)課題で、一定の回数のレバー押し反応に対してエサ粒を一つ与える課題である。もう一つの課題は、低率反応分化強化(differential reinforcement of low rates, DRL)で、直前のレバー押し反応から一定の時間経過後のレバー押し反応に対してエサを提示した。訓練期間の後に、上記の 2 種類を組み合わせ、FR20DRL20 多元強化(Multiple reinforcement schedule, Mult) スケジュールを連続 30 日間 (1 日 1 セッション、49 分間) 行った。Mult スケジュールでは、1 セッション内で、FR20 と DRL20 課題をそれぞれ 2 分間と 5 分間交互に 7 回ずつ提示した (計 49 分間)。

母獣の体重増加率、産仔数、仔獣の体重増加率、同腹から生まれた仔の雌雄の比率を統計解析した。Mult FR20DRL20 スケジュールにおける影響は、それぞれの課題ごとに、1 分間あたりのエサの数(報酬獲得率)、1 分間あたりの反応数(反応率)を算出して解析した。

D. 研究結果

D-1. 3,3',4,4',5-ペンタクロロビフェニル (PCB126) による新生仔マウスの生殖細胞およびステロイド合成系に対する影響 (主任研究者 遠山 千春)

マウス精巣で発現している 10 種類の遺伝子 (hsp86, calnexin-t, protamine-2, ABP, P450scc, P450c17, 3 β -HSD, 17 β -HSD, cyclophilin, G3PDH) について、その発現を器官培養系のマウス精巣での発現と比較し、精巣の器官培養系が *in vivo* のマウス精巣におけるこれら遺伝子の発現状況を反映していることを確認し、実験に用いた。器官培養系の対照群 (DMSO) では CYP1A1 mRNA の発現は検出されなかった。しかし

ながら、100 あるいは 1000 nM の PCB126 を曝露した培養精巣では CYP1A1 mRNA の発現レベルは対照群に比べ有意に増加していた。

PCB126 が新生仔マウス精巣の精粗細胞 (gonocytes) とセルトリ細胞の体細胞分裂活性に与える影響は、BrdU ラベリングインデックスからは有意な影響は認められなかった。また、アポトーシスの誘導、あるいは細胞増殖への影響も検出できなかった。

PCB126 存在下で器官培養した新生仔マウス精巣において 3 β -HSD 及び 17 β -HSD の mRNA 発現は、PCB126 のいずれの濃度においても変化が認められなかった。しかしながら、P450scc mRNA 発現量は PCB126 に曝露したすべての精巣において対照群に比べ統計学的に有意に減少し、用量依存的な減少を示し、これとは反対に、P450c17 mRNA の発現量は 1000 nM 濃度の PCB126 に曝露した場合にのみ対照群に比べて有意な発現上昇を示した。

D-2. 胎仔期ダイオキシン類曝露による前立腺発育遅延に関する原因遺伝子のマイクロアレイ解析 (主任研究者 遠山千春)

C57B/6J マウスに TCDD を曝露した際、産仔の前立腺発育遅延が最も顕著に見られる臨界時期が GD13 であることが報告されている。一方、GD17 の投与では前立腺発育遅延は観察されない。本研究では、この 2 つのステージで胎仔の感受性にどのような差があるのかマイクロアレイを用いて解析した。

今回用いたマイクロアレイは、3756 の遺伝子を搭載しており、そのうち 822 遺伝子が今回のいずれか 4 つの投与群で有意なスポットとして検出された。そのうち、132 遺伝子が GD13-TCDD 投与群で発現促進 (アップレギュレーション) (ratio > 1.5) され、239 遺伝子が発現抑制 (ダウンレギュレーション) (ratio < 0.67) されることがわかった (図 2)。しかしながら、そのうち GD17-TCDD 投与群でもアップレギュレー

ションあるいはダウンレギュレーションされる遺伝子は、それぞれわずか 14 と 38 遺伝子のみであった。

D-3. コプラナーPCB(PCB118, PCB114)の AhR 非依存性の甲状腺ホルモンおよびレチノイド代謝に及ぼす影響とメカニズムの検討 (主任研究者 遠山千春)

12 週齢の野生型と TTR 欠損マウスに 50 mg/kg の PCB118 と PCB114 を投与し、7 日後に肝臓中の CYP1A1 タンパクを免疫組織化学的に検出した。PCB114 投与群で肝臓中 CYP1A1 の顕著な誘導合成が認められたが、PCB118 群では認められなかった。

血清 TT4 濃度は野生型マウスでは PCB118 投与群において、オイル投与対照群に比べて有意に低下したが PCB114 投与群では違いが観察されなかった。同様に、血清レチノール量は PCB118 投与群においてのみオイル投与対照群に比べて有意に低下した。このことは、PCB118 の影響は、AhR を介さない影響であることを示唆する。血液中 TT4 及びレチノールを結合して輸送する機能を有する蛋白質である 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^{-/-}) と比較をしたところ、PCB118 のみが甲状腺ホルモンレベルおよび血清中 Retinol 量を低下させたことから、その作用に対して TTR の関与が認められた。

オイル投与対照群と比較して、PCB118 投与群で 2 倍以上に発現上昇した遺伝子は 54 遺伝子であった。特に CYP2B9 (11.5)、CYP2B10 (4.3)、CYP2A4 (4.1)、CYP2A5 (4.0)、CYP4A14 (3.9)、CYP2C55 (3.8)、CYP1A2 (3.7)、retinol dehydrogenase 11 (2.7)、CYP1A1 (2.5)は高い割合で上昇していた。PCB114 投与群と比較して、PCB118 投与マウスで 2 倍以上に発現上昇した遺伝子は 46 遺伝子であった。特に CYP2B9 (11.5)、CYP2B10 (4.3)、retinol dehydrogenase 11 (2.2)、CYP2C55 (2.1)、CYP2B13 (2.0) に

差が認められた。

D-4. コプラナーPCB と TCDD の脳の発達過程における毒性発現機構の比較解析 (分担研究者：前田秀一郎)

本年度は、TCDD 曝露による影響を調べた。Contextual fear conditioning test では、オイル対照群のラットで観察される雌雄の差 (雄は約 45%、雌は約 30%の freezing) が、TCDD 投与群では有意に減少 (雄は約 20%の freezing で雌では非投与群の雌と有意差無し) した。このことから、周産期の TCDD への曝露は、雄の成熟後の学習行動に影響を及ぼす可能性が示唆された。このラットにおいて、海馬 CA1 領域における CREB のリン酸化について検討したところ、非投与群では、雄は雌に対して、p-CREB-ir cell の割合が増加していたが、TCDD 投与群の雄は非投与群の雄に対して p-CREB-ir cell の割合が減少していた。以上の結果から、周産期の TCDD 曝露が成熟後の学習行動に影響を及ぼし、学習の低下が引き起こされ、さらにこの学習行動の低下には、海馬 CA1 領域の CREB の活性化の減少が影響している可能性が示唆された。

TCDD 5 µg/kg を妊娠 12.5 日目の 57BL/6N マウスに投与し、6 日後、雌雄の胎仔それぞれ 1 匹ずつ、計 6 匹の脳から採取した RNA サンプル、ならびに、妊娠 18.5 日目の対照群の雌雄胎仔、計 6 匹の脳から採取した RNA サンプルにつき解析した。この結果、調べた 3 匹の雄または雌全てにおいて、TCDD 投与により 1.5 倍以上に増加する mRNA を、雄で 8 種類、雌で 12 種類、逆に 0.6 倍以下に減少する mRNA を雄で 49 種類、雌で 33 種類見出した。

RN 細胞及び Hepal1c7 細胞の AhR が機能していることを確かめるため、10 nM の TCDD で 24 時間処理後、リアルタイム RT-PCR で CYP1A1 mRNA 量を測定した。RN 細胞では、CYP1A1 mRNA 量の増加を認めなかったが、Hepal1c7 細胞では 45 倍に増加していた。この細胞における c-Src のリ

ン酸化を抗 pY416Src 抗体を用いてウエスタンブロッティング、ならびに c-Src 特異抗体による免疫沈降複合体により検討したが、TCDD 曝露後 0.5 時間及び 3 時間後において、細胞可溶化物及び Triton 不溶画には、検出できなかった。

D-5. コプラナーPCB と TCDD の学習行動への影響の比較解析 (主任研究者 遠山千春)

母獣の体重増加率、産仔数、仔獣の体重増加率、雌雄仔の比率については、TCDD および PCB126 曝露全群とコントロール群との間に差はみられなかった。低用量 TCDD および TEQ 相当量の PCB126 の母体曝露により、成熟後の仔動物においてオペラント行動試験の成績に影響があらわれた。

TCDD 曝露により、FR20 の反応率及び報酬獲得率、共に、コントロール群に比べ T50 群が有意に低く、T200 群が有意に高かった。T800 群では有意差は見られなかったものの低下する傾向がみられた。DRL20 での反応率は、T200 群がコントロール群よりも有意に高く、報酬獲得率は、TCDD 曝露全群がコントロール群よりも有意に低かった。

PCB126 曝露により、FR20 の反応率及び報酬獲得率、共に、P2000 群が有意に高く、P8000 群で有意に低下した。DRL20 の反応率については、曝露全群ともコントロール群との間に差はみられなかった。報酬獲得率は、P2000 群がコントロール群に比べて低かった。

TCDD と PCB126 曝露群との比較をしたところ、FR 課題の反応率及び報酬獲得率への影響のパターンは上述のように極めて類似をしていた。しかし、TEQ 単位で同等量の投与の場合、PCB126 の作用のほうが TCDD よりも低い傾向が観察された。

TCDD 曝露群と、各 TCDD の TEQ に相当の PCB126 曝露群との間で、FR 課題では最低用量群で TCDD 作用が顕著であり、最高用量群では PCB126 の作用が有意であった。DRL20 においては、T200 ng/kg 群が P2000

群に比べ有意に高率反応を示した。報酬獲得率では、T50 群と P500 群との間に差が認められ ($p < 0.01$)、T50 群は、P500 群と比べると報酬獲得率が有意に低かった。

E. 考察

E-1. 3,3',4,4',5-ペンタクロロビフェニル (PCB126) による新生仔マウスの生殖細胞およびステロイド合成系に対する影響 (主任研究者 遠山 千春)

CYP1A1 酵素の誘導は、ダイオキシン様化合物曝露に対する極めて感度が高いバイオマーカーである。本研究においても、培養した新生仔精巣で PCB126 により用量依存的な CYP1A1 mRNA の発現が顕著に検出された。この結果は PCB126 が新生仔精巣内の AhR を介して直接的に作用したことを示している。しかしながら *in vivo* で TCDD に曝露した成熟ラットの精巣では CYP1A1 が誘導されない。今後の研究で器官培養した新生仔精巣と成熟精巣との CYP1A1 mRNA 発現の顕著な違いについて調べることが必要である。

本研究では、PCB126 によって、器官培養した精巣の生殖細胞やセルトリ細胞の BrdU ラベリングインデックス、雄性生殖細胞数の分子マーカー Hsp86 mRNA の発現、ならびにセルトリ細胞数の分子マーカー ABP mRNA の発現の変化は認められなかった。PCB126 が新生仔マウス精巣での精粗細胞 (gonocytes) やセルトリ細胞の増殖活性には影響を与えないことを示している。また、PCB126 によって、TUNEL 陽性の生殖細胞およびセルトリ細胞は検出されなかった。これらの結果は PCB126 が新生仔期の精原細胞 (prespermatogenic cells) およびセルトリ細胞にアポトーシスを誘導せず、増殖活性にも影響を与えないことを示している。

ダイオキシン類が新生仔精巣におけるステロイド合成酵素の mRNA レベルに直接作用するかどうかはまだ明らかではない。本

研究では PCB126 の曝露により器官培養した新生仔マウス精巣における P450_{sc} の mRNA 発現が有意に減少し、P450c17 mRNA 発現では有意に増加した。ゲノム塩基配列解析によって P450 アロマターゼの遺伝子の 5'上流領域にはプロモーター領域やエクソン内に XRE 様のエンハンサーエレメントが存在していることが示された。それゆえダイオキシン-AhR 複合体が P450 アロマターゼの遺伝子発現を直接的に制御しているのかもしれない。

PCB126 により P450c17 mRNA 発現が増加した現象について、我々はコプラナー PCB のもつ非 TCDD 毒性が検出できたものであると考えている。Andric ら (2000) はコプラナー PCB がほとんど含まれていないと思われる PCB 混合物の Askarel を全身性に投与した場合と精巣だけ局所的に投与した場合とを比べると両者の作用が完全に異なっている事を報告した。この報告は、全身性に投与したときには PCB 混合物が下垂体—精巣軸にエンドクリン様に作用して、ゴナドトロピンの分泌を変化させることによって間接的に精巣でのテストステロン合成量を減少させたことを示している。しかしながら、PCB 混合物の精巣内直接投与では、P450c17 の酵素活性は有意に増加する。我々の実験において 1000 nM の濃度の PCB126 を培養精巣に添加した場合、P450c17 mRNA 量が精巣で増加したのは PCB126 が P450c17 の転写量を直接的に増加させることを示している。これは Askarel に含まれるコプラナー PCB 量を考慮すると、PCB 代謝物が示すエストロゲン様作用の結果である可能性が高いと考えられる。

E-2. 胎仔期ダイオキシン類曝露による前立腺発育遅延に関する原因遺伝子のマイクロアレイ解析 (主任研究者 遠山千春)

GD13-TCDD 投与群でアップレギュレーションあるいはダウンレギュレーションされ、かつ GD17-TCDD 投与群でアップレギュレーションあるいはダウンレギュレーション

されない遺伝子のうち、代謝系酵素遺伝子、細胞内シグナル伝達関連の遺伝子が特に多いことが解った。GD13 のマウス胎仔が GD17 胎仔とは異なる TCDD 応答性遺伝子のセットを発現していることを意味している。GD17 胎仔への TCDD 曝露は上記前立腺の発育遅延を起こさないことが報告されており、今回 GD13 で検出した遺伝子の中に AhR-ダイオキシン依存性の原因遺伝子がある可能性がある。

今回は、胎仔全体を用いてマイクロアレイ解析の予備的な検討を行った。現在、泌尿生殖複合体を用いて詳細な検討を進めるとともに、PCB 曝露との比較検討を行っている。

E-3. コプラナー PCB (PCB118, PCB114) の AhR 非依存性の甲状腺ホルモンおよびレチノイド代謝に及ぼす影響とメカニズムの検討 (主任研究者 遠山千春)

PCB118 投与群では肝臓中 CYP1A1 遺伝子の発現およびタンパク質の合成誘導がほとんど認められないにもかかわらず野生型マウスの血清および肝臓レチノイド量がオイル投与対照群に比べて有意に減少した。他方、PCB114 は野生型および TTR 欠損マウスにおいて血清中レチノール量に対する影響はなかった。従って、PCB118 は、AhR を介さないで、レチノイド代謝に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

興味深いことに、PCB114 は TTR 欠損マウスで、肝臓中のレチノイド量を有意に低下した。PCB114 への曝露により肝臓中 CYP1A1 の誘導合成が生じることから、PCB114 のレチノイド代謝攪乱作用機構は、AhR が介在することが示唆された。

TTR の血中および肝臓中レチノイド代謝への関与について調べたところ、PCB118 投与群にのみ野生型マウス血清中のレチノール量の有意な減少を認めたことから、PCB118 による血清中レチノール量の減少には、TTR が関与することが明らかとなった。PCB118 は生体内で比較的水酸化されや

すいことが報告されていることから、おそらくその水酸化代謝物が血中 TTR と結合してレチノールの尿中排泄増加につながり、血中レチノール量の減少が起こることが考えられた。

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基づく TEF を指標として評価されてきたが、本実験結果によりコプラナー PCB の中でも、レチノイド代謝への影響に対する毒性機構が AhR には関係なく TTR を介する場合、さらに AhR と TTR 以外の要因の可能性が明らかとなった。このことから、今後ダイオキシン類の毒性評価には非 TCDD 毒性であるコプラナー PCB 毒性を考慮する必要があることが示唆された。

E-4. コプラナー PCB と TCDD の脳の発達過程における毒性発現機構の比較解析 (分担研究者：前田秀一郎)

本研究では、コプラナー PCB の毒性発現機構を TCDD 類似毒性と非 TCDD 毒性に分類することを目的に、先ず TCDD 毒性発現機構を解析し、以下の新知見を得た。

海馬が関与する学習行動である contextual fear conditioning には著明な雌雄差があり、周産期の TCDD への曝露により、この雌雄差が消失することを見出した。さらに、学習後の海馬 CA1 領域の p-CREB-ir cell の割合が、雄では雌に対して増加していた。雄の TCDD 投与群では非投与群に対して海馬 CA1 領域の p-CREB-ir cell の割合が有意に減少しており、この結果から contextual fear conditioning の行動上の変化と、海馬 CA1 領域の CREB の活性化の変化が相関することが示された。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が、本研究では、TCDD 投与による成長後の学習行動の変化と、海馬 CA1 領域の CREB の活性化の変化が相関することが示された点で、TCDD による脳神経毒性惹起

の分子機構を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。

TCDD 曝露が脳神経毒性を惹起する分子機構を明らかにするため、DNA マイクロアレイ法を用いて、TCDD への周産期曝露による胎仔の脳内遺伝子発現変化を、より網羅的に検索した。本研究で同定した種々の TCDD 応答遺伝子は、TCDD の脳神経毒性発現機構の解明に役立つだけでなく、バイオマーカーとして、根拠のある TCDD のリスクアセスメントにも貢献し得ると考えられる。今後、PCB 曝露影響との比較をすることにより、PCB の脳毒性発現機構を TCDD 類似毒性発現機構と非 TCDD 毒性発現機構に分類し得るだろう。

活性化型 Src 認識抗体を用いた実験では、TCDD による c-Src は検出できなかった。TCDD 投与後 10 分以内の非常に早い一過性の活性化については今後調べる必要がある。c-Src のキナーゼ活性に依存しない機能（例えばアダプターとしての作用）については検討の必要がある。今後、TCDD と PCB の毒性発現に c-Src が異なる関与をすることが明らかとなれば、単に Ah receptor を介すか否かによる識別法とは特異性の異なる、TCDD 類似毒性と非 TCDD 毒性を識別するための鋭敏な方策の確立を促進できると考えられる。

E-5. コプラナー PCB と TCDD の学習行動への影響の比較解析 (主任研究者 遠山千春)

母獣の体重増加率、産仔数、仔獣の体重増加率、雌雄仔の比率に対する影響は、TCDD 曝露群および PCB126 曝露群共に、コントロール群との間に差はみられない条件において、低用量 TCDD および TEQ 相当量の PCB126 の妊娠期曝露により、仔動物の成熟後に、オペラント行動に影響が現れた。この影響は、TCDD および PCB126 ともに、曝露用量依存的ではなく、曝露用量特異的であった。また、FR20 における反応率及び報酬獲得率について、逆 U 字型反

応パターンが、TCDD と PCB126 共に観察された。PCB126 では TCDD に対する相対毒性強度は、同等か幾分低めと思われる。

最低用量(50ng/kg)の TCDD 曝露群において、仔動物における成熟後のオペラント行動に影響が見られたことは、記憶・学習機能がわずかな量の TCDD 曝露に対しても非常に敏感に反応したことを表している。

TCDD では最高用量では影響が認められなかったが、PCB126 ではコントロール群と比べ、反応率・報酬獲得率が有意に低下したことは、TCDD と PCB126 の毒性メカニズムの違いがあることを示唆する。

F. 研究発表

1. 論文発表

Wu Q., Ohsako S., Ishimura R., Suzuki J. S., and **Tohyama C.** Exposure of Mouse

Preimplantation Embryos to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) Alters the Methylation Status of Imprinted Genes *H19* and *Igf2*. *Biol. Reproduction* (2004, in press)

Fukuzawa N. H., Ohsako S., Wu Q., Sakaue M., Fujii-Kuriyama Y., Baba T., and Tohyama C. Testicular cytochrome P450_{scc} and LHR as possible targets of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in the mouse. *Mol. Cell. Endocrinol.* (2004, in press)

Ishizuka M., Yonemoto J., Zaha H., **Tohyama C.**, and Sone H. Perinatal exposure to low dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin alters sex-dependent expression of hepatic CYP2C11. *J. Biochem. Toxicol.* 17:, 278-2, (2003)

Ohsako S., Kubota K., Kurosawa S., Takeda K., Wu Q., Ishimura R., and **Tohyama C.** Alterations of gene expression in adult male

rat testis and pituitary shortly after subacute administration of the antiandrogen flutamide. *J Reprod Dev*, 49: 275-290, (2003)

Kubota K., Ohsako S., Kurosawa S., Takeda K., Wu Q., Sakaue M., Kawakami T., Ishimura R., and **Tohyama C.** Effects of vinclozolin administration on sperm production and testosterone biosynthetic pathway in adult male rat. *J Reprod Dev*, 49: 403-412, (2003)

Inouye K., Ito T., Fujimaki H., Takahashi Y., Takemori T., Pan X., **Tohyama C.**, and Nohara K. Suppressive effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on the high-affinity antibody response in C57BL/6 mice. *Toxicol. Sci*, 74: 315-324, (2003)

Doi H., Baba T., **Tohyama C.**, and Nohara K. Functional activation of arylhydrocarbon receptor (AhR) in primary T cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Chemosphere*, 52: 655-662, (2003)

Arisawa K., Matsumura T., **Tohyama C.**, Saito H., Satoh H., Nagai M., Morita M., and Suzuki T. Fish intake, plasma omega-3 polyunsaturated fatty acids, and polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins/polychlorinated dibenzo-furans and co-planar polychlorinated biphenyls in the blood of the Japanese population. *Int Arch Occ Env Hea*, 76: 205-21, (2003)

Moriguchi T., Motohashi H., Hosoya T., Nakajima O., Takahashi S., Ohsako S., Aoki Y., Nishimura N., **Tohyama C.**, Fujii-Kuriyama Y., and Yamamoto M. Distinct response to dioxin in an arylhydrocarbon receptor (AHR)-humanized mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:

5652-5657, (2003)

Nishimura N., Yonemoto J., Miyabara Y., Sato M., and **Tohyama C.** Rat thyroid hyperplasia induced by gestational and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Endocrinology*, 144: 2075-2083, (2003)

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*, 17: 259-269, (2003)

Takeyama M, **Tohyama C.** (2003) Developmental neurotoxicity of dioxin and its related compounds. *Industrial Health* 41:215-230

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*, 17: 259-269, (2003)

2.学会発表

Nishimura, N., Yonemoto, J., Takeuchi, Y., Yokoi, C., Nishimura, H. and Tohyama, C. Hydronephrosis and renal cyp1a1 induction in the rat kidney by lactational exposure to dioxin. 43rd Annual Meeting of Society of Toxicology, Baltimore. (2004).

Ohsako, S., Kubota, K., and Tohyama, C. Cloning of rat 5 α -reductase type2 gene promoter region and an evidence of no relationship between its transactivation regulation and arylhydrocarbon receptor.

43rd Annual Meeting of Society of Toxicology, Baltimore. (2004).

遠山千春. 低用量ダイオキシン曝露と健康リスク. 生物系特定産業技術研究推進機構 平成 11 年度「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」若手研究者支援型採択課題「環境化学物質応答の分子機構の解明」研究総括シンポジウム, つくば. (2004)

遠山千春. 環境ホルモンと健康リスク. 平成 15 年度秋田県医師会第 6 回産業医研修会・第 2 回医療廃棄物研修会, 秋田. (2004)

Takeyama M, Sone H and Tohyama C. Maternal exposure to dioxin causes central precocious puberty in female rats. 21st International Neurotoxicology Conference, Honolulu. (2004)

遠山千春. 低用量ダイオキシン曝露と健康リスク. フォーラム 2003: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 仙台. (2003)

野原恵子, 伊藤智彦, 遠山千春. ダイオキシンの免疫系に対する作用メカニズム. フォーラム 2003: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 仙台. (2003)

井上薫, 潘小青, 今井統隆, 遠山千春, 野原恵子. 低用量ダイオキシン曝露による免疫系への影響. 第 10 回日本免疫毒性学会学術大会, 相模原. (2003)

伊藤智彦, 九十九伸一, 山本雅之, 本橋ほづみ, 鈴木教郎, 藤井義明, 三村純正, 遠山千春, 野原恵子. 恒常的活性化型 arylhydrocarbon receptor 変異体を用いた T 細胞へのダイオキシンの影響の解明. 第 10 回日本免疫毒性学会学術大会, 相模原. (2003)

Takeyama M, Sone H and Tohyama C. Maternal exposure to dioxin-induced precocious puberty in the female Rat. The 9th Meeting of the International Neurotoxicology Association, Dresden. (2003)

Ishimura R., Kawakami T., Ohsako S. and Tohyama C. Immature angiogenesis in the rat placental labyrinth after exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 23rd International Symposium on Halogenated Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants, Boston. (2003)

Kawakami T., Ishimura R., Ohsako S., Takeda K and Tohyama C. Strain difference in placental dysfunction and fetal death in rats exposed to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 23rd International Symposium on Halogenated Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants, Boston. (2003)

Maeda S., Takeyama M. and Tohyama C. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on brain development and function. 23rd International Symposium on Halogenated Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants, Boston. (2003)

Nishimura N., Yonemoto J., Yokoi C. and Tohyama C. Hydronephrosis at weaning not during gestation, is caused by lactational exposure to

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in holtzman rats. 23rd International Symposium on Halogenated Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants, Boston. (2003)

中田明子, 西村典子, 竹内陽子, 横井千沙子, 遠山千春, グウエン・ヴァン・チュエン. 第 57 回日本栄養・食糧学会大会, 福岡. (2003)

池田雅彦, 鈴木千夏, 山下純子, 遠山千春, 富田多嘉子. ダイオキシンのラット脳の性分化に対する経胎盤, 経母乳曝露の影響-ダイオキシン用量依存症. 内分泌攪乱物質特別シンポジウム -性腺軸(視床下部-下垂体-性腺)の発育と異常-, 葉山 (2003)

野原恵子, 藤巻秀和, 遠山千春. ダイオキシン曝露がアレルギー疾患に及ぼす影響. アレルギー学会春季臨床大会, 横浜 (2003)

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

特に無し

2.実用新案登録

特に無し

3.その他

特に無し

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

3,3',4,4',5-ペンタクロロビフェニル（PCB126）による
新生仔マウスの生殖細胞およびステロイド合成系に対する影響

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

コプラナーポリ塩素化ビフェニル類（co-PCB）はダイオキシン類の一種でアリール炭化水素レセプター（AhR）を介して TCDD 様の毒性を示すだけでなく、PCB 様の毒性も有する。子宮内および授乳期のダイオキシン曝露により引き起こされる雄性生殖系への影響は、精子数の減少や雄性ホルモンであるテストステロンの減少などが知られている。しかしながら、その詳細は依然不明なままである。本研究では、co-PCB (PCB126) 単体の非 TCDD 毒性に着目して雄性生殖系に及ぼす TCDD 毒性との違いを検討した。また、新生仔マウス精巣の器官培養系を用いて PCB126 が精子形成やステロイド合成系に及ぼす直接影響についても検討した。その結果、PCB126 は新生仔マウス精巣における生殖細胞およびセルトリ細胞の増殖能には直接的影響を与えないことが示された。しかしながら、精巣におけるテストステロン合成酵素の P450_{scc} の mRNA 発現を減少させ、P450_{c17} の mRNA の発現は増加を示した。P450_{c17} の mRNA の発現増加は PCB 代謝物によるエストロゲン様作用を示したものと考えられる。

研究協力者

福澤徳穂、大迫誠一郎 国立環境研究所環境健康研究領域

A. 研究目的

ダイオキシン類の異性体の中で、毒性等価係数が付与されているダイオキシン類は、ポリ塩素化ジベンゾ-p-ダイオキシン類（PCDD）、ポリ塩素化ジベンゾフラン類（PCDF）、コプラナーポリ塩素化ビフェニル類（co-PCB）の各々の異性体 29 種類から構成される。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。日本人が一日に食品から摂取するダイオキシンのうち、2,3,7,8-TCDD、1,2,3,7,8-PeCDD、2,3,7,8-PeCDF、3,3',4,4',5-PenCB (PCB126) の 4 種類のみで全ダイオキシン摂取量の約 70%を占め、

そのうちコプラナー PCB 異性体の中で最強の毒性を示す PCB126 が、約 35%を占める（Maruyama *et.al.*, 2002）。日本人が全食品から摂取するダイオキシンのうち、約 50%を魚から摂取しており（Maruyama *et.al.*, 2002）、欧米諸国と比べて PCB 摂取率が非常に高い。1998 年以降、ダイオキシン類として分類されるようになった 12 種類のコプラナー PCB 異性体には、TCDD の毒性を 1 としたときに相対毒性として 0.1 から 0.00001 までの毒性等価係数が付与されており、言い換えれば、これら PCB は、TCDD 毒性に加えて、非 TCDD としての毒性を併せもっていることになる。PCB は TCDD 同様に脂肪親油性の化合物で人の母乳、血漿、組織から検出されているほか、多くの野生動物組織にも高濃度で蓄積されている。特

にコプラナーPCBはリガンドに依存した転写因子アリアル炭化水素レセプター (AhR) を介したシグナル伝達経路を介して TCDD に類似した様々な有害な毒性を示す一方で、PCBの毒性やホルモン様作用があり、胎盤を通過して発生中の胎児に移行する。しかしながら、コプラナーPCB単体の非TCDD毒性に着目した研究は乏しい。

子宮内及び授乳期のTCDD曝露により引き起こされる雄性生殖系への影響は、特に精子数の減少 (Mably *et al.*, 1992a; Wilker *et al.*, 1996; Gray *et al.*, 1997) や、生殖器重量の減少 (Mably *et al.*, 1992b; Roman *et al.*, 1998a) などがある。妊娠15日目(GD15)のHoltzmanラットにTCDDを単回投与した母親から産まれた雄産仔では、64 ng TCDD/kg bwの低用量曝露においても精巣重量や一日精子産生数が統計学的に有意に減少したとの報告がある (Mably *et al.*, 1992a)。動物種によっては400と1000 ng/kg bwの高用量でTCDDを投与した場合、受精能が減少したことも示された。これらは、胎児期のTCDD曝露によって精子形成に障害が生じ、雄性不妊を引き起こしていることを示している。またGrayらは(1997)、GD15のLong Evans (LE) ラットに50、200、800 ng/kg bwの用量でTCDDを曝露すると、雄産仔の生殖系に直接影響を与え、精巣上体精子数、射出精子数が減少したと報告している。しかしながら、このTCDDの用量では精巣重量や一日精子産生数(DSP)に影響が見られなかった。我々もまたMablyらの実験プロトコール (Mably *et al.*, 1992a) を用いて追試すると、TCDDによって前立腺腹葉重量の劇的な減少は認められたが、精巣重量の減少やDSPの減少は、最高用量の800 ng/kg bwでTCDDを曝露した場合においても認められなかった (Ohsako *et al.*, 2001)。これらの報告から考えても、ダイオキシンの精子形成に及ぼす影響についての詳細は依然不明なままである。またFaqiらはPCB126を10 μ g/kg bwの用量でGD15のWistar系ラッ

トの母親に経口単回投与すると、雄産仔の精巣重量やDSPには変化が無いが、テストステロン濃度は統計学的に有意に減少をしたことを報告している (Faqi *et al.*, 1998b)。これらの結果がTCDD類似の作用か、あるいはPCB特有の作用であるのかを示すことは重要である。

我々はコプラナーPCB (PCB126) のもつTCDD毒性とPCB特有の非TCDD毒性の現れ方の違いをより明確に検討するために、PCB126を用いてラットにおける精子発生、及びステロイド合成に及ぼす影響を検討した。本研究では、ダイオキシン曝露に対してもっとも感受性が高い時期と思われる新生仔時期のマウス精巣を用いて器官培養法を確立し、PCB126が精巣に直接的影響を与えるかどうかを検討した。その結果、PCB126は新生仔マウス精巣における生殖細胞およびセルトリ細胞の増殖能には直接的な影響を与えないことが示された。しかしながら、精巣におけるテストステロン合成に必須の酵素群の発現には直接的な影響を与え、P450scc mRNAの発現を減少し、P450c17mRNAの発現は増加を示した。P450c17の発現増加はco-PCBの非TCDD毒性を示したものであると思われるのでここに報告する。

B. 研究方法

1. 試薬と材料

3,3',4,4',5-ペンタクロロビフェニル (IUPAC名, PCB126) は森田昌敏博士 (NIES, Tsukuba, Japan) より贈与いただいた。ヌクレオポアフィルターはワットマン社 (Clifton, NJ, USA) から購入した。Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、仔牛血清 (Lot #1027934)、Amplification Grade Deoxyribonuclease I (DNase I)、SuperScript™ II RNaseH-逆転写酵素、Oligo (dT) 12-18 プライマー、Urtla PURE™ アガロースはライフ・テクノロジー社 (Rockville, MD, USA) から購入した。抗生物質 (ペニ

シリーン・ストレプトマイシン) と 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) は シグマ社 (St. Louis, MO, USA) から購入した。ペルオキシダーゼ標識抗-BrdU マウスモノクローナル抗体は Becton Dickinson 社 (San Jose, CA, USA) から購入した。In-Situ 細胞死検出キット-AP は ロッシュ・モレキュラー・バイオケミカルズ社 (Mannheim, Germany) から購入した。QIA prep RNA 精製キット (RNeasy) はキアゲン・GmbH 社 (Hilden, Germany) から購入した。TaKaRa Ex Taq™ ポリメラーゼ、10 x Ex Taq™ バッファー、TaKaRa LA Taq™ ポリメラーゼ、2 x GC バッファー I, II、10 mM dNTP 混合液は TaKaRa バイオケミカルズ社 (Otsu, Japan) から購入した。

2. 器官培養系

ICR 系統の妊娠マウスをチャールズ・リバー社 (Tokyo, Japan) から購入し、本研究所の動物室においてコンベンショナル環境で飼育した。新生仔雄マウスは出生直後 (PND 0) に頸椎脱臼によりト殺し精巣を摘出した。培養液には 10% 仔牛血清と 100 µg/ml の抗生物質が含まれている DMEM を使用し、ヌクレオポアフィルター (孔サイズ: 0.1 µm, 直径 25 mm) を浮かべ、摘出精巣をのせて培養した。精巣は 37°C、95% air、5% CO₂ 条件下で培養した。培養液には最終濃度 0, 10, 100 または 1000 nM で PCB126 を添加した。PCB126 を含む培養液中で 48 時間培養した後、新しい培養液を添加してさらに 48 時間培養した。培養最終時に終濃度 50 µg/ml で BrdU を添加後さらに 1 時間培養した。また PCB126-free の培養液を用いて上述と同様な方法で新生仔精巣を培養し、0, 6, 12, 24, 48, 96, 192 時間後に回収した。新生仔マウス精巣の器官培養の予備的実験として 12 日間培養した場合に培養精巣の中心部の組織所見はネクロシス様構造を認めるが、4 日間培養ではほとんどすべての生殖細胞とセルトリ細胞が生存しているため、本研究では 4 日間

の培養時間を選択した。

3. BrdU-ラベリング と TUNEL 法

培養精巣は Carnoy's 液を用いて固定後、パラフィン包埋した。5 µm-切片を作成し、脱パラフィン後に内因性ペルオキシダーゼを除去するために 3% H₂O₂ の添加したメタノール中で 30 分間インキュベートした。その後、1 N HCl に 60 分間浸透させてゲノミック DNA を変性させた。洗浄後、試料は 1% 牛血清を含んだブロッキング液で処理し、ペルオキシダーゼ標識した抗-BrdU マウスモノクローナル抗体 (1:50) で 1 時間インキュベートした。洗浄後、DAB (3, 3'-diaminobenzidine) 液を試料に添加し発色させた。BrdU-陽性生殖細胞とセルトリ細胞数は、それぞれの個数を計測し 1 標本あたりの生殖細胞とセルトリ細胞の全個数で割ることで相対値化した。

新生仔マウス培養精巣でアポトーシスを検出するため In-Situ 細胞死検出キットを使用した。試料を脱パラフィン化し 20 µg/ml のプロテナーゼ K で 37°C、15 分間インキュベートした。切片は 10 mM の PBS (pH 7.4) で 2 回洗浄し、キット添付のプロトコールに従って TUNEL 試薬で検出した。

4. 半定量 RT-PCR 法

RT-PCR 法は以前の報告で述べた (Ohsako *et al.*, 2001)。培養精巣 (n=4) 由来の全 RNA は QIA prep RNA 精製キットを用いて調製した。溶出した全 RNA サンプルは 1 µg の全 RNA に対し 1 unit の DNase I でゲノム除去処理を行った。全 RNA (20 µg) を 200 unit の SuperScript™ II 逆転写酵素と 0.5 µg の oligo (dT) 12-18 プライマーを用いて 20 µl の反応系で添付の標準プロトコールに従って逆転写した。逆転写した cDNA サンプルは hsp86, calnexin-t, protamine-2, androgen binding protein (ABP), cytochrome P450 1A1 (CYP1A1), cytochrome P450 side chain cleavage (P450sc), cytochrome P450 17β-hydroxylase/17,20-lyase

(P450c17), 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase-type I (3 β -HSD), 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type III (17 β -HSD), cyclophilin, G3PDH の mRNA レベルを測定するために使用した。プライマー配列と PCR 産物の長さは表 1 に示した。hsp86, calnexin-t, protamine-2, ABP, cyclophilin, G3PDH, P450scc, 3 β -HSD の mRNA を増幅させる場合には 0.5 μ l の 合成 cDNA を 25 μ l の反応系 (0.625 unit TaKaRa Ex TaqTM ポリメラーゼ, 1 x EX TaqTM バッファー, 0.2 mM dNTP 混合液, 2 μ M 特異プライマー) を使用した。CYP1A1 mRNA の増幅には、0.5 μ l の 合成 cDNA を 25 μ l の反応系 (1.25 unit TaKaRa La TaqTM ポリメラーゼ, 1 x GC バッファー-I, 0.4 mM dNTP 混合液, 4 μ M 特異プライマー) を使用した。P450c17 と 17 β -HSD mRNA の増幅には、0.5 μ l の 合成 cDNA を 25 μ l の反応系 (1.25 unit TaKaRa La TaqTM ポリメラーゼ, 1 x GC バッファー-II, 0.4 mM dNTP 混合液, 4 μ M 特異プライマー) を使用した。RT-PCR のサイクル数は cyclophilin, G3PDH は 20 cycle, hsp86 と 3 β -HSD は 25 cycle, calnexin-t, protamine-2, ABP, P450scc, P450c17, 17 β -HSD は 35 cycle を使用した。RT-PCR の増幅条件 (Tm 値) は hsp86, calnexin-t, protamine-2, ABP, CYP1A1, cyclophilin, G3PDH では 95°C, 30 sec; 60°C, 30 sec; 70°C, 45 sec で、また P450scc, P450c17, 3 β -HSD, 17 β -HSD は 95°C, 30 sec; 57°C, 30 sec; 70°C, 1 min で増幅した。PCR 産物は 2% のアガロースゲルで分離した。標的 mRNA 産物は、Scion Images software (Scion Corporation, Frederick, USA) を用いて内部標準に cyclophilin または G3PDH を使用して相対化した。PCR 産物は pGEM-T Easy ベクターに導入してサブクローニングを行い、ABI Prism Big Dye terminator cycle シークエンシングキット (PE-Biosystems, Foster City, USA) を用いた dideoxy 法でシークエンスした。

5. 統計学的解析

BrdU ラベリングインデックスと半定量 RT-PCR 解析におけるバンド強度値はソフトウェアに StatView for Windows version 5.0 (SAS Institute, Cary, NC, UAS) を使用して分散分析 (ANOVA) を行い、平均値の差の検定は Fisher's PLSD test により P 値は 0.05 以下を有意に設定した。

C. 研究結果

1. *in vivo* と *in vitro* マウス精巣での mRNA 発現の比較

本研究で使用した器官培養系を確立するために、*in vivo* のマウス精巣で発現している 10 種類の遺伝子 (hsp86, calnexin-t, protamine-2, ABP, P450scc, P450c17, 3 β -HSD, 17 β -HSD, cyclophilin, G3PDH) について、その発現を *in vitro* のマウス精巣での発現と比較した。*in vivo* のマウス精巣として PND 0 (新生仔期), 4, 8, 12, 24, 70 (成熟期) の精巣を使用し、*in vitro* のマウス精巣として 10% 仔牛血清を添加した基本培地で 0, 6, 12, 24, 48, 96, 192 時間器官培養した新生仔マウス精巣を使用した (図. 1)。

hsp86, calnexin-t, protamine-2 の 3 種類の遺伝子発現パターンを生殖細胞の発生段階を示すためのマーカーとして使用した。Hsp86 は精祖細胞 (gonocyte) から減数分裂後の生殖細胞 (postmeiotic germ cell) まで長期間発現している生殖細胞マーカーであり (Lee, 1990), *in vivo* のマウス精巣ではすべての日齢の精巣で発現が確認された (図. 1A)。その mRNA 量は PND 0 よりも PND 4 と PND 8 で低く、PND 24 以降で増加した。一方、新生仔マウス精巣の器官培養系 (*in vitro*) ではすべての培養時間で恒常的に発現した。calnexin-t は減数分裂初期の生殖細胞 (early meiotic phase germ cell) マーカー (Ohsako *et al.*, 1994) であり、*in vivo* のマウス精巣では PND 12 から検出された。また protamine-2 はハプロイドの生殖細胞マーカー (Johnson *et al.*, 1988) であり、PND 24 以

降で検出された。しかしながらこれらの mRNA は器官培養した精巣では全く検出されなかった (図. 1A)。セルトリ細胞の細胞数を分子レベルで示すためのマーカーとして使用したアンドロゲン結合タンパク質 (ABP) (Wang *et al.*, 1989) は、*in vivo* のマウス精巣で PND12 まで mRNA の発現増加が認められたが、その後減少した (図. 1A)。培養精巣における ABP mRNA は 6 時間 から 192 時間まで一定レベルでの発現が観察された。ハウスキープ遺伝子である cyclophilin と G3PDH はこの培養系で一様に発現を維持した。

ライディッヒ細胞におけるテストステロン合成にはステロイド合成酵素群の P450_{scc}, P450_{c17}, 3 β -HSD, 17 β -HSD が重要な役割を担う。そこでこれらの酵素の mRNA レベルを半定量 RT-PCR 法を用いて測定した。P450_{scc}, P450_{c17}, 3 β -HSD, 17 β -HSD の mRNA レベルは出生時 (PND 0) の *in vivo* の新生仔マウス精巣と器官培養開始時の精巣では同一の発現を示すが *in vivo* の PND 4 のマウス精巣では P450_{scc} と P450_{c17} mRNA の発現はほとんど検出されず、その後 PND 70 に至るまで発現が徐々に増加した (図 1A)。一方、培養精巣では 0 時間から 192 時間までの培養時系列すべてにおいて P450_{scc} mRNA の発現が *in vivo* の PND 4 と PND 8 の精巣よりも高く維持された (図. 1A, B)。また、培養精巣での P450_{c17} mRNA の発現は 6 時間から 96 時間まで明瞭に検出され、192 時間の培養ではわずかに増加した (図. 1B)。3 β -HSD mRNA の *in vivo* マウス精巣における発現は PND 0 から PND 24 まで安定に発現し、PND 70 ではわずかに増加した (図. 1A)。培養精巣においても 3 β HSD mRNA の発現は培養期間中を通して安定に維持された (図. 1B)。*in vivo* のマウス精巣における 17 β -HSD mRNA の発現は PND 24 までは減少したが、その間 PND 8 ではわずかに増加を示し、PND 70 では増加した (図. 1A)。一方、培養精巣における 17 β -HSD mRNA の発

現は培養 192 時間 まで徐々に減少した (図. 1B)。

2. CYP1A1 mRNA の誘導

新生仔マウス精巣 (PND 0) は、PCB126 を最終濃度 0, 10, 100, 1000 nM となるように培養液に添加して 48 時間培養した。CYP1A1 の誘導は、ダイオキシン曝露のバイオマーカーでありダイオキシン様化合物の投与後 24 時間後に肝臓などの主な臓器で観察される。本研究では精巣で引き起こされる二次的な変化を検討するために 48 時間の曝露期間を選択した。PCB126 に曝露後さらに 2 日間培養し、培養精巣から全 RNA を精製して CYP1A1 mRNA の発現を半定量的 RT-PCR 法を用いて解析した。器官培養系の対照群 (DMSO) では CYP1A1 mRNA の発現は検出されなかった。しかしながら、100 あるいは 1000 nM の PCB126 を曝露した培養精巣では CYP1A1 mRNA の発現レベルは対照群に比べ有意に増加していた ($p < 0.01$) (図. 2)。

3. PCB126 の生殖細胞とセルトリ細胞の増殖に及ぼす影響

PCB126 が新生仔マウス精巣の精粗細胞 (gonocytes) とセルトリ細胞の体細胞分裂活性に与える影響を検討するために、新生仔マウス精巣 (n=12) を様々な濃度の PCB126 存在下で個別に培養し、培養最終時に BrdU でラベルした。PCB126 の存在下では生殖細胞のラベリングインデックスは、本研究に使用したどの PCB126 濃度においてもほとんど一定に維持された。一方、セルトリ細胞のラベリングインデックスは PCB126 の存在下でわずかに減少傾向を示したが、統計学的に有意な差は認められなかった (図 3)。我々はまた、器官培養した精巣で PCB126 によりアポトーシスが誘導されたかどうかを同一試料を用いて TUNEL 法で検討した。しかしながら、TUNEL 陽性を示す生殖細胞やセルトリ細胞は、対照群と PCB126 曝露群のどちらの

培養精巣においても認められなかった (データ未掲載)。

細胞数を示すための分子マーカーとして使用した生殖細胞マーカーの hsp86 とセルトリ細胞マーカーの ABP について、この培養精巣における発現を半定量的 RT-PCR で検討した。hsp86 mRNA の発現はいずれの PCB126 濃度においても変化が認められなかった (図. 4)。ABP mRNA の発現は 1000 nM の PCB126 存在下でわずかな減少傾向を示したが、統計学的に有意な差は認められなかった (図. 4)。

4. PCB126 のステロイド合成酵素の mRNA 発現におよぼす影響

最終濃度 0, 10, 100, 1000 nM の PCB126 存在下で器官培養した新生仔マウス精巣における 3 β -HSD と 17 β -HSD の mRNA 発現は、PCB126 のいずれの濃度においても変化が認められなかった (図. 5)。しかしながら、培養精巣での P450scc mRNA 発現量は PCB126 に曝露したすべての精巣において対照群に比べ統計学的に有意に減少し ($p < 0.01$)、用量依存的な減少を示した (図. 5)。反対に P450c17 mRNA の発現量は 1000 nM 濃度の PCB126 に曝露した場合のみ対照群に比べ統計学的に有意な発現上昇を示した ($p < 0.01$)。

D. 考察

1. 本研究に用いた新生仔マウス精巣の器官培養系の特徴

本研究では、出生時から成熟期に至る各ステージのマウス精巣と器官培養した精巣とを比較するために、これらの精巣における精子形成とステロイド合成に関わる遺伝子について、その発現プロフィールを提示した (図. 1)。マウス精巣では、hsp86 mRNA が生殖細胞でのみ発現している (Lee, 1990)。新生仔ラット精巣では hsp86 タンパク質が精粗細胞 (gonocyte) と増殖段階にある精原細胞 (spermatogonia) に高く発現している

(Ohsako *et al.*, 1995)。本研究では、PND0 のマウス精巣に比べて PND4 と PND8 の精巣における hsp86 mRNA の発現が減少した (図. 1A)。このことは体細胞、特にセルトリ細胞の数が生殖細胞数に比べて増加したことを示した可能性がある。その結果、生後 8 日目までの生殖細胞の割合が減少する (Nagano *et al.*, 2000)。またセルトリ細胞が生産する分泌タンパク質の ABP (Wang *et al.*, 1989) は新生仔マウス精巣において生後 12 日まで増加し、その後減少する。この減少は、セルトリ細胞の数が生殖細胞数に比べ増加したことを示唆している (図. 1A)。新生仔精巣の器官培養系では hsp86 mRNA の発現は培養期間すべてを通して明瞭に検出された。このことは体細胞に対する生殖細胞の割合が変化しないことを示している。他の生殖細胞マーカーとして、calnexin-t はパキテン期精母細胞またはそれ以降の精母細胞 (spermatocytes) で発現し (Ohsako *et al.*, 1994)、protamine-2 はハプロイドの精細胞に発現する (Johnson *et al.*, 1988) ことが知られている。しかしながら本研究においては protamine-2 の発現は、培養系で 8 日間培養した場合にも検出できなかった。このことは生殖細胞が減数分裂に入らなかったことを示している。*in vivo* の新生仔マウス精巣では精粗細胞は PND 1.5 に増殖を再開し (Nagano *et al.*, 2000)、増殖した精原細胞は PND8 から最初の減数分裂を始め (図. 1A)、calnexin-t が検出される。そのためこの器官培養系では精粗細胞の減数分裂への突入までは再現できなかったと考えられる。また、培養 4 日目における生殖細胞の増殖活性は *in vivo* における PND4 の精巣のものと同様な値を示している。

4 種類のステロイド合成酵素 (P450scc, P450c17, 3 β -HSD, 17 β -HSD) の mRNA 発現は、ライディッヒ細胞によるテストステロン合成に必須でありステロイド合成における酵素的過程の律速段階となる (Stocco *et al.*, 1996)。本研究で 3 β -HSD と 17 β -HSD の増幅に用いたプライマー配列は、精巣でも