

っとも優位な HSD アイソフォームである 3 β -HSD type I と 17 β -HSD type III に由来している (Baker *et al.*, 1999; Baker *et al.*, 1997)。しかしながら精巣でのインタクトな 3 β -HSD の発現は、すべてのステージにおいて一様であったが、P450_{scc} と P450_{c17} mRNA の発現は PND0 では高く、初めの 4 日間で急激に減少し、その後 PND70 へと成熟期に向かうにつれて発現が徐々に上昇した。実際、齧歯類の雄の新生仔では出生後 2 時間以内に劇的かつ一過的にテストステロン濃度が上昇してその後急激に減少し (Corbier *et al.*, 1998; Rhoda *et al.*, 1984)、その後思春期に入るとテストステロン濃度は成熟期に達するまで再び上昇し続ける (Miyachi *et al.*, 1972)。この出生直後から成熟期までのステロイド合成のプロフィールを本研究では、テストステロン合成酵素である P450_{scc} や P450_{c17} の mRNA の発現レベルが示しているように思われる。これに対し培養精巣では、P450_{scc} の mRNA 発現が培養 8 日間を通して、*in vivo* の PND4 から PND 8 の精巣での発現よりも高いレベルを維持した。それゆえ、少なくとも P450_{scc} の mRNA の発現は器官培養系において維持されていると結論づけられる。これは培養液中に含まれる仔牛血清のゴナドトロピンによって P450_{scc} の転写のためのシグナル伝達経路が刺激されたためかもしれない。

2. 器官培養した新生仔マウス精巣では PCB126 により CYP1A1 が誘導される

ダイオキシンに曝露すると AhR を介して CYP1A1 が誘導される (Poland and Knutson, 1982; Denison *et al.*, 1991; Whilock *et al.*, 1990; Safe *et al.*, 1986)。CYP1A1 のような外来化学物質を代謝する酵素の誘導は、ダイオキシン様化合物曝露のもっとも感受性の高いバイオマーカーとなる (Safe *et al.*, 1994; Hooper *et al.*, 1995)。PCB126 には毒性等価係数 0.1 が付与されており (Van den Berg *et al.*, 1998)、PCB126 によって肝臓では

EROD 活性として検出される CYP1A1 の酵素活性が誘導された (DeVito *et al.*, 2000)。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。PCB126 を含む co-PCB は精巣において比較的強い TCDD 様の活性を誘導する。この結果は PCB126 が新生仔精巣に、恐らく精巣内の 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 (Roman *et al.*, 1998b)。これは我々の雄ラットを用いた予備的な実験でも確認された。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。この違いは精巣での発生段階的または時期特異的な CYP1A1 発現の違いであるか、あるいは CYP1A1 遺伝子ファミリーの異種間の違いであるかもしれない。

3. PCB126 は器官培養した新生仔マウス精巣での生殖細胞とセルトリ細胞の体細胞分裂活性に影響を与えない

本研究で使用したすべての濃度の PCB126 において、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には変化が認められなかった。雄性生殖細胞数を定量化するための分子マーカーとして用いた Hsp86 mRNA の発現およびセルトリ細胞数を定量化するための分子マーカーとして用いた ABP mRNA の発現には、PCB126 による変化は認められなかった (図. 4)。これらの Brd-U ラベリングインデックスや半定量的 RT-PCR による結果は、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。さらに、いずれの濃度の PCB126 においても 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。新生仔マウス精巣にはアポトーシスをおこす細胞群が存在しないと報告されていることから (Wang

et al., 1998)、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。

母親経由で胎児期に TCDD を曝露された雄新生仔の精子形成に及ぼす影響は、相反する実験結果が報告されており、その詳細はまだ不明である。Mably (1992a) らは、低用量の TCDD を周産期に曝露すると、雄産仔の幼若期から成熟期にかけて一様に精巣重量や一日精子産生数 (DSP) が減少すると報告している。しかしながら、Gray (1997) らはそれらを確認できなかった。また、Faqi (1998a) らは、雌ラットに初期用量として交配する 2 週間前から TCDD を投与し、一週間に一度ずつ維持用量として TCDD を投与したところ、精巣重量は変化しないものの DSP は明らかに減少すると報告している。一方、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で単回投与を行うと、産仔の精巣重量や DSP には変化が無い (Faqi *et al.*, 1998) ことも報告した。我々も以前に、TCDD を GD15 の Holtzman ラットに投与し、子宮および授乳を介して暴露された雄新生仔が性成熟に達しても精巣の発達や、精子形成には影響を及ぼさないと報告した (Ohsako *et al.*, 2001)。

少なくとも新生仔マウス精巣の器官培養によって得られた結果は、ダイオキシン類が出生直後の精巣に対して、精細胞やセルトリ細胞の増殖に直接的な影響を与えないことを示している。この報告は周産期曝露においてラット精巣の精巣重量と DSP にはダイオキシンが影響しないことを部分的に支持していると思われる。

4. PCB126 は新生仔マウス精巣内のステロイド合成酵素 mRNA 発現に影響をあたえる

ダイオキシン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_{scc} の mRNA 発現が有意に減少し、P450_{c17} mRNA 発現では有意に増加した。卵巣における報告では、思春期前および成熟ラットの顆粒層細胞の培養系において、RT-PCR 法を用いて解析されており、TCDD 存在下で P450 アロマターゼ mRNA 発現が減少している (Dasmahapatra *et al.*, 2000)。実際、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 (Hickey *et al.*, 1990)。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。しかしながら、我々の半定量的 RT-PCR 法を用いた実験では PND70 の成熟マウス精巣においても P450 アロマターゼの発現を検出できなかった(データ未掲載)ので、今後 P450 アロマターゼの発現がダイオキシンによって直接的に影響を受けるかどうかを検討する必要がある。

ダイオキシンが成熟マウス精巣の P450_{scc} の活性を減少させることを示した報告は多数ある。ラットでは TCDD が P450_{scc} の活性減少とコレステロール輸送系の調節阻害によって精巣内テストステロン濃度が減少し、プレグネノロン合成への変換阻害を引き起こす (Kleeman *et al.*, 1990; Moore *et al.*, 1991)。同様に、PCB126 を含む PCB 混合物を投与した牛の精巣ではミトコンドリアの P450_{scc} 活性を強く阻害する (Machala *et al.*, 1998)。また、思春期前の雌ラット由来の顆粒層細胞の培養系においては、TCDD により P450_{scc} mRNA の発現が有意に減少する (Dasmahapatra *et al.*, 2000)。我々の研究では PCB126 がより直接的に、新生仔マウス精巣で発現する P450_{scc} 発現を抑制することを示すことができたが、これは精巣内テストステロン産生に影響すると考えられる。実際、Peterson らは、1.0 μg

/kg bw の用量で TCDD を GD15 のホルツマンラットに投与した場合に、雄産仔では出生直後のテストステロンサージが出生後 4 時間まで遅れ、サージの増幅率も 53% に減少すると報告している (Mably et. al., 1992)。このダイオキシンによる新生仔でのテストステロンサージの減少は言い換えれば、転写レベルでダイオキシンが直接 P450scc の発現抑制に働いたことを示しており、少なくとも部分的にサージ遅延ならびに減少を説明している可能性がある。

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。手短に述べると、Askarel の単回腹腔内投与では P450c17 活性が阻害され、血清内テストステロン量が顕著に減少する。一方、Askarel の単回精巣内投与では P450c17 の活性は Askarel により刺激され血清テストステロン値は有意に増加する。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 (図. 5) PCB126 が P450c17 の転写量を直接的に増加させることを指し示している。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. 結論

本研究では、ダイオキシン様応答を示す co-PCB 同族体の PCB126 を用いて、新生仔マウス精巣の器官培養を行い、ダイオキシンの示す精巣への直接影響の検討と、co-PCB のもつ TCDD 様の毒性と PCB 特有の非 TCDD 毒性の現れ方の違いを検討することを試みた。その結果、PCB126 は雄性生殖細胞 (Gonocyte) とセルトリ細胞の増殖には直接的な影響を与えないが、精巣内ステロイド合成にはより直接的に作用して、P450 系テストステロン合成酵素である P450scc mRNA の発現を PCB126 の用量依存的に減少させ、P450c17 mRNA の発現を用量依存的に増加させることが明らかになった。PCB126 による P450c17 mRNA の発現増加作用は非 TCDD 毒性である可能性が示された。

F. 参考文献

- Andric, S.A., Kostic, T.A., Dragisic, S.M., Andric, N.L., Stojilkovic, S.S., Kovacevic, R.Z. (2000). Acute effects of polychlorinated biphenyl-containing and -free transformer fluids on rat testicular steroidogenesis. *Environmental Health Perspectives* 108, 955-959.
- Baker, P.J., Sha, J.A., McBride, M.W., Peng, L., Payne, A.H., O'Shaughnessy, P.J. (1999). Expression of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase type I and type VI isoforms in the mouse testis during development. *European Journal of Biochemistry / FEBS* 260, 911-917.
- Baker, P.J., Sha, J.H., O'Shaughnessy, P.J. (1997). Localisation and regulation of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 3 mRNA during development in the mouse testis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 133, 127-133.
- Corbier, P., Kerdelhue, B., Picon, R., Roffi, J. (1978). Changes in testicular weight and

- serum gonadotropin and testosterone levels before, during, and after birth in the perinatal rat. *Endocrinology* 103, 1985-1991.
- Dasmahapatra, A.K., Wimpee, B.A., Trewin, A.L., Wimpee, C.F., Ghorai, J.K., Hutz, R.J. (2000). Demonstration of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin attenuation of P450 steroidogenic enzyme mRNAs in rat granulosa cell in vitro by competitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Molecular and Cellular Endocrinology* 164, 5-18.
- Denison, M.S. (1991). The molecular mechanism of action of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons. *Chemosphere* 23, 1825-1830.
- DeVito, M.J., Menache, M.G., Diliberto, J.J., Ross, D.G., Birnbaum, L.S. (2000). Dose-response relationships for induction of CYP1A1 and CYP1A2 enzyme activity in liver, lung, and skin in female mice following subchronic exposure to polychlorinated biphenyls. *Toxicology and Applied Pharmacology* 15, 157-172.
- Faqi, A.S., Dalsenter, P.R., Merker, H.J., Chahoud, I. (1998a). Reproductive toxicity and tissue concentration of low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in male offspring rats exposed throughout pregnancy and lactation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 150, 383-92.
- Faqi, A.S., Dalsenter, P.R., Merker, H.J., Chahoud, I. (1998b). Effects on developmental landmarks and reproductive capability of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl in offspring of rats exposed during pregnancy. *Human & Experimental Toxicology* 17, 365-372.
- Gray, L.E., Ostby, J.S., Kelce, W.R. (1997). A dose-response analysis of the reproductive effects of a single gestational dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in male Long Evans Hooded rat offspring. *Toxicology and Applied Pharmacology* 146, 11-20.
- Hickey, G.J., Krasnow, J.S., Beattie, G., Richards, J.S. (1990). Aromatase cytochrome P450 ovarian granulosa cells before and after luteinization: adenosine 3',5'-monophosphate-dependent and independent regulation. Cloning and sequencing of rat aromatase cDNA and 5' genomic DNA. *Molecular Endocrinology* 4, 3-12.
- Hooper, K., Clark, G.C. (1995). Workshop on perinatal exposure to dioxin-like compounds. VI. Role of biomarkers. *Environmental Health Perspectives* 103, 161-167.
- Johnson, P.A., Peschon, J.J., Yelick, P.C., Palmiter, R.D., Hecht, N.B. (1988). Sequence homologies in the mouse protamine 1 and 2 genes. *Biochimica et Biophysica Acta* 950, 45-53.
- Kleeman, J.M., Moore, R.W., Peterson, R.E. (1990). Inhibition of testicular steroidogenesis in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-treated rats: evidence that the key lesion occurs prior to or during pregnenolone formation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 106, 112-125.
- Lee, S-J. (1990). Expression of HSP86 in male germ cells. *Molecular and Cellular Biology* 10, 3239-3242.
- Mably, T.A., Bjerke, D.L., Moore, R.W., Gendron-Fitzpatrick, A., Peterson, R.E. (1992a). *In utero* and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 3. Effects on spermatogenesis and reproductive capability. *Toxicology and*

- Applied Pharmacology* 114, 118-126.
- Mably, T.A., Moore, R.W., Peterson, R.E. (1992b). *In utero* and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 1. Effects on androgenic status. *Toxicology and Applied Pharmacology* 114, 97-106.
- Machala, M., Neca, J., Drabek, P., Ulrich, R., Sabatova, V., Nezveda, K., Raszyk, J., Gajduskova, V. (1998). Effects of chronic exposure to PCBs on cytochrome P450 systems and steroidogenesis in liver and testis of bulls (*Bos Taurus*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* 120, 65-70.
- Maruyama, W., Yoshida, K., Tanaka, T., Nakanishi, J. (2002). Possible range of dioxin concentration in human tissues: simulation with a physiologically based model. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 65:2053-2073.
- Miyachi, Y., Nieschlag, E., Lipsett, M.B. (1973). The secretion of gonadotropins and testosterone by the neonatal male rat. *Endocrinology* 92, 1-5.
- Moore, R.W., Jefcoate, C.R., Peterson, R.E. (1991). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin inhibits steroidogenesis in the rat testis by inhibiting the mobilization of cholesterol to cytochrome P450_{sc}. *Toxicology and Applied Pharmacology* 109, 85-97.
- Nagano, R., Tabata, S., Nakanishi, Y., Ohsako, S., Kurohmaru, M., Hayashi, Y. (2000). Reproliferation and relocation of mouse male germ cells (gonocytes) during prespermatogenesis. *The Anatomical Records* 258, 210-220.
- Ohsako, S., Bunick, D., Hayashi, Y. (1995). Immunocytochemical observation of the 90-kDa heat shock protein (HSP90): high expression in primordial and premeiotic germ cells of male and female rat gonads. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 43, 67-76.
- Ohsako, S., Hayashi Y., Bunick D. (1994). Molecular cloning and sequencing of calnexin-t: an abundant male germ cell-specific calcium-binding protein of the endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry* 269, 14140-14148.
- Ohsako, S., Miyabara, Y., Nishimura, N., Kurosawa, S., Sakaue, M., Ishimura, R., Sato, M., Aoki, Y., Sone, H., Tohyama, C., Yonemoto, J. (2001). Maternal exposure to a low dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) suppressed the development of reproductive organs of male rats: dose-dependent increase of mRNA levels of 5 α - reductase type 2 in contrast to decrease of androgen receptor in the pubertal ventral prostate. *Toxicological Sciences* 60, 132-143.
- Poland, A. and Knutson, L.C. (1982). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 22, 517-554.
- Rhoda, J., Corbier, P., Roffi, J. (1984). Gonadal steroid concentrations in serum and hypothalamus of the rat at birth: aromatization of testosterone to 17 β -estradiol. *Endocrinology* 114, 1754-1760.
- Roman, B.L., Timms, B.G., Prins, G.S., Peterson, R.E. (1998a). *In utero* and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin impairs prostate development. 2. Effects on growth and cytodifferentiation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 150, 254-270.

- Roman, B.L., Pollenz, R.S., Peterson, R.E. (1998b). Responsiveness of the adult male rat reproductive tract to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin exposure: Ah receptor and ARNT expression, CYP1A1 induction, and Ah receptor down-regulation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 150, 228-239.
- Safe, S. (1986). Comparative toxicology and mechanism of action of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 26, 371-399.
- Safe, S.H. (1994). Polychlorinated biphenyls (PCBs), environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Critical Reviews of Toxicology* 24, 87-149.
- Stocco, D.M., Clark, B.J. (1996). Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis. *Biochemical Pharmacology* 51, 197-205.
- Van den Berg, M., Birnbaum, L., Bosveld, A.T., Brunstrom, B., Cook, P., Feeley, M., Giesy, J.P., Hanberg, A., Hasegawa, R., Kennedy, S.W., Kubiak, T., Larsen, J.C., van Leeuwen, F.X., Liem, A.K., Nolt, C., Peterson, R.E., Poellinger, L., Safe, S., Schrenk, D., Tillitt, D., Tysklind, M., Younes, M., Waern, F., Zacharewski, T. (1998). Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environmental Health Perspectives* 106, 775-792.
- Wang, R.A., Nakane, P.K., Koji, T. (1998). Autonomous cell death of mouse male germ cells during fetal and postnatal period. *Biology of Reproduction* 58, 1250-1256.
- Wang, Y.M., Sullivan, P.M., Petrusz, P., Yarbrough, W., Joseph, D.R. (1989). The androgen-binding protein gene is expressed in CD1 mouse testis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 63, 85-92.
- Whilock J.P.Jr. (1990). Genetic and molecular aspects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 30, 251-277.
- Wilker, C., Johnson, L., Safe, S. (1996). Effects of developmental exposure to indole-3-carbinol or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on reproductive potential of male rat offspring. *Toxicology and Applied Pharmacology* 141, 68-75.
- 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. 実用新案取得
特に無し
 3. その他
特に無し
- I. 図の説明
- 図 1. マウス精巣の発生段階とマウス精巣の器官培養系における時系列変化における遺伝子発現変化のプロフィール
- PND 0 (新生仔期) から PND 70 (成熟期) までのマウス精巣と 0 時間から 192 時間まで培養した新生仔マウス精巣に対し、10 種類の遺伝子 (hsp86, calnexin-t, protamine-2, ABP, P450scc, P450c17, 3 β -HSD, 17 β -HSD, cyclophilin, G3PDH) について半定量的 RT-PCR 法を行った。詳細は材料と方法に示した。A, *in vivo* (左図) 精巣と *in vitro* (右図) 精巣での mRNA プロフィールの比較。注目すべき点は新生仔マウス精巣 (*in vivo*) での P450scc の遺伝子発現量であり PND 4 で急激に減少し PND 70 まで徐々に上昇している。一方、培養した精巣での mRNA 量は培養期間中を通してほとんど一様に維持されている。B, 内部標準として cyclophilin で標準化した培養精巣におけるステロイド

合成酵素 mRNA 発現量の相対値。数値はそれぞれ3 個体から得られた値を平均化して標準誤差で表示した。培養精巣における P450scc と 3 β -HSD の mRNA 量は培養 8 日間を通して、新生仔マウス精巣の 8 日目での発現量と同程度であった。培養精巣における P450c17 の mRNA 量は培養開始後 6 時間で急激に減少した。

図 2. PCB126 による新生仔マウス器官培養精巣での CYP1A1 mRNA の誘導

仔牛血清を添加した基本培養液に最終濃度 0-1000 nM になるように PCB126 を添加した後、48 時間の曝露を行った新生仔精巣から全 RNA を抽出した。A, CYP1A1 と cyclophilin の PCR の電気泳動パターン B, 内部標準 cyclophilin に対する CYP1A1 mRNA の発現量。数値は 4 個体それぞれから得られた値を平均化して標準誤差で表示した。*印は Fisher's PLSD テストによる ANOVA 解析により 対照群に対して有意な差が検出されたことを示す(** p < 0.01)。

図 3. PCB126 による新生仔マウス器官培養

精巣での生殖細胞とセルトリ細胞の増殖
仔牛血清を添加した基本培養液に最終濃度 0-1000 nM になるように PCB126 を添加した後、48 時間の曝露を行った新生仔精巣から全 RNA を抽出した。詳細は材料と方法に示した。A, 器官培養した精巣における生殖細胞とセルトリ細胞の BrdU ラベリングインデックス。数値は 12 個体それぞれから検出された値を平均化して標準誤差で表した。どちらの細胞においても細胞増殖率に対して PCB126 の用量依存的な変化は認められなかった。B, 抗 BrdU 抗体を使用した培養精巣での免疫組織化学。100 nM の PCB126 を曝露した培養精巣と対照群の培養精巣の光学顕微鏡像。茶色に染色される

核は BrdU-陽性細胞。すべての切片はヘマトキシリン染色を行った。倍率 X200。

図 4. 半定量的 RT-PCR による PCB126 による新生仔マウス精巣の hsp86 と ABP mRNA 量

仔牛血清を添加した基本培養液に PCB126 を最終濃度 0-1000 nM で添加した後、48 時間の曝露を行った新生仔精巣から全 RNA を抽出した。A, hsp86, ABP と cyclophilin の PCR の電気泳動パターン B, 内部標準 cyclophilin に対する hsp86, ABP mRNA 量。数値はそれぞれ 4 個体からの値を平均化して標準誤差で表した。hsp86 と ABP の mRNA 量には PCB126 の用量依存的な変化は認められなかった。

図 5. 半定量的 RT-PCR による PCB126 による新生仔マウス精巣のステロイド合成酵素 mRNA 量

仔牛血清を添加した基本培養液に PCB126 を最終濃度 0-1000 nM で添加した後、48 時間の曝露を行った新生仔精巣から全 RNA を抽出した。A P450scc, P450c17, 3 β -HSD, 17 β -HSD, cyclophilin の PCR の電気泳動パターン B, 内部標準 cyclophilin に対するステロイド合成酵素の mRNA 量。数値はそれぞれ 4 個体からの値を平均化して標準誤差で表した。*印は Fisher's PLSD テストによる ANOVA 解析により 対照群に対して有意な差が検出されたことを示す(** p < 0.01)。注目すべき点は、P450scc mRNA 発現量が PCB126 の用量依的に増加したこと、また P450c17 mRNA 発現量は 1000 nM の PCB126 で有意に増加したこと、3 β -HSD, 17 β -HSD の mRNA 発現量には用量依的な変化が認められなかったことである。

表 1. 半定量 RT-PCR 法に使用したプライマー

Genes	Primer sequence (5'-3')		Product size (bp)	GenBank accession No.
	Forward primer	Reverse primer		
Hsp86	AACCAATGGGTCGT GGAACAAAG	ACAGATCAAAAGGA GCGCGTCTT	512	M36830
Calnexin- t	TGCTAGCAGACACTG GTGATTTG GGTTCGCTACCGAAT	TGACTCTAGATGCC CGATCTCTC CTTCGGGATCTTCT	1418 422	U08373 X07626
Protamin e-2	GA CTATGCCTGAGACAA	GCA ATAGAAAGGACTTC	660	NM011367
ABP	ATCTCTGC CGCTCAGTGCTGGT	CATCTTTGC GGTTGAGCATGGG	714	AF195119
P450scc	CAAAG	GCACT TCTTCAACCACGGG	655	M64863
P450c17	CTTGTGGGTCTCTTG CTGCTCAT	AATATGTCC TGGAGAATTTGCCA	595	M58567
3 α -HSD	ATGTTGGTGCAGGA GAAAGAACT	GTAACACAC GGAATCGTTGAGCG	492	U66827
17 α -HSD	ACAACGTTGGAATGC TCCCCAGC	GTGCTGCTA TGGTCTGGTGAGCA	734	NM009992
CYP1A1	CTCATTGAGCATTGT CAGGACAG	TCCTGGACA TAGCACATCCATGC	382	M60456
Cyclophil in	TGGAGATGAATCTGT AGGACGAG AGTGGAGATTGTTGC	CCTCTAGAA GGGAGTTGCTGTTG AAGTCGCAGGA	791	NM008084
G3PDH	CATCAACGA			

☒ 1

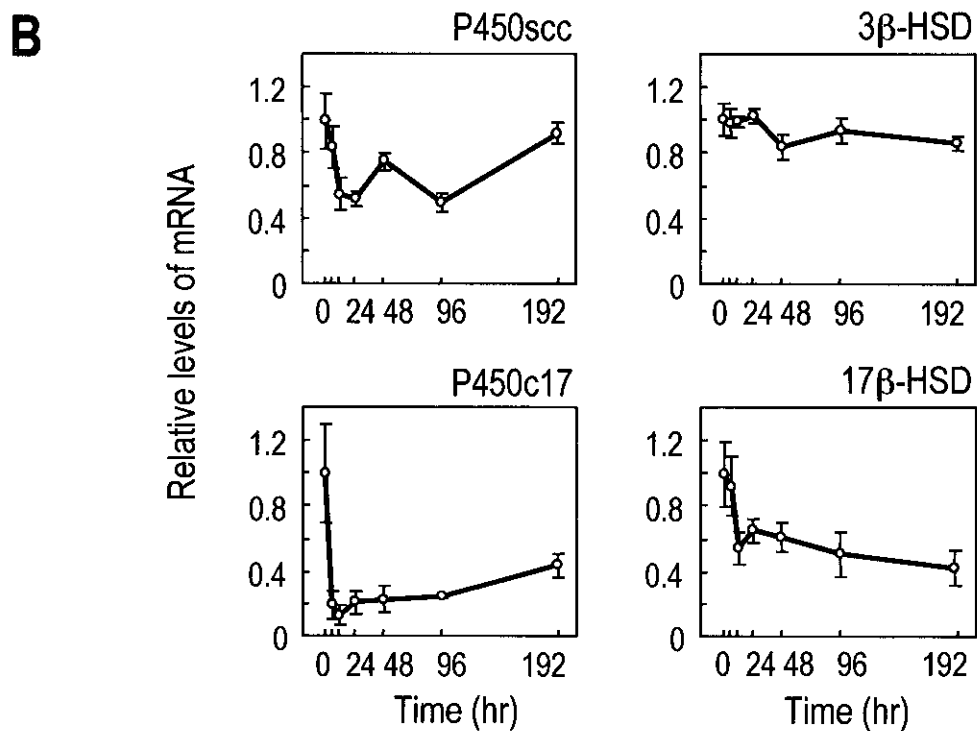
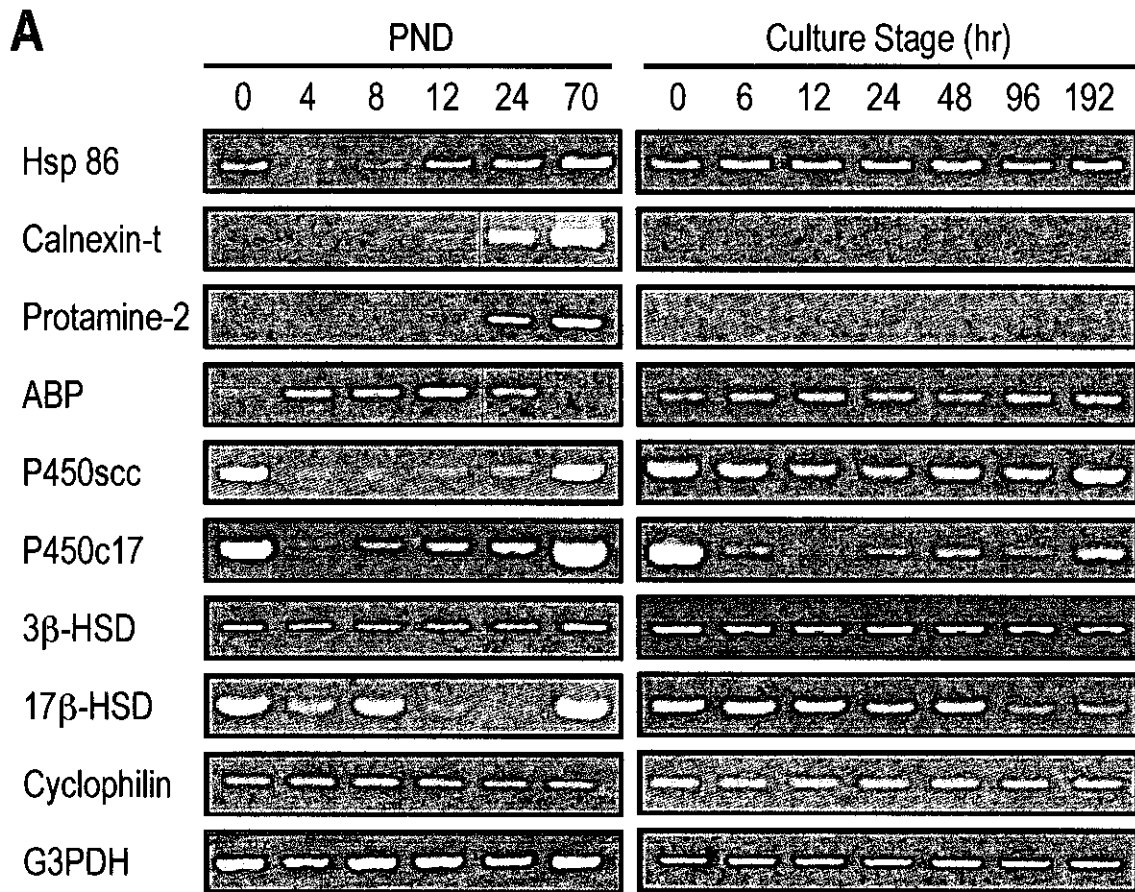
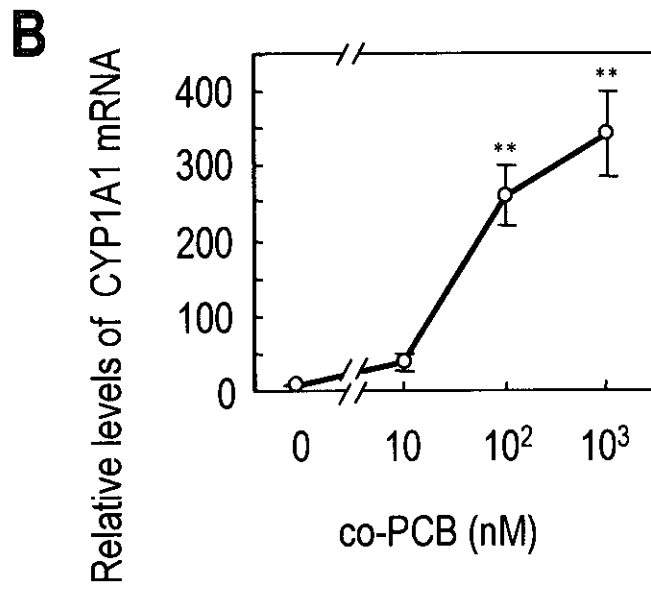
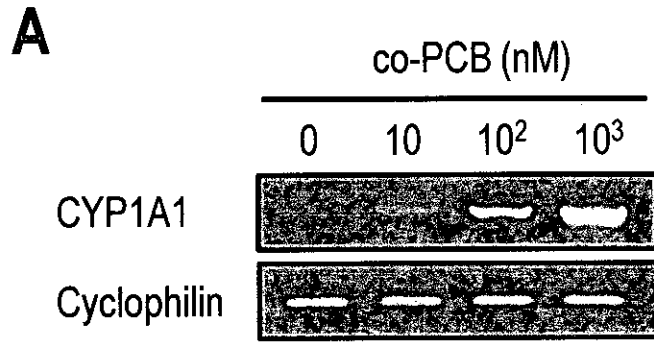
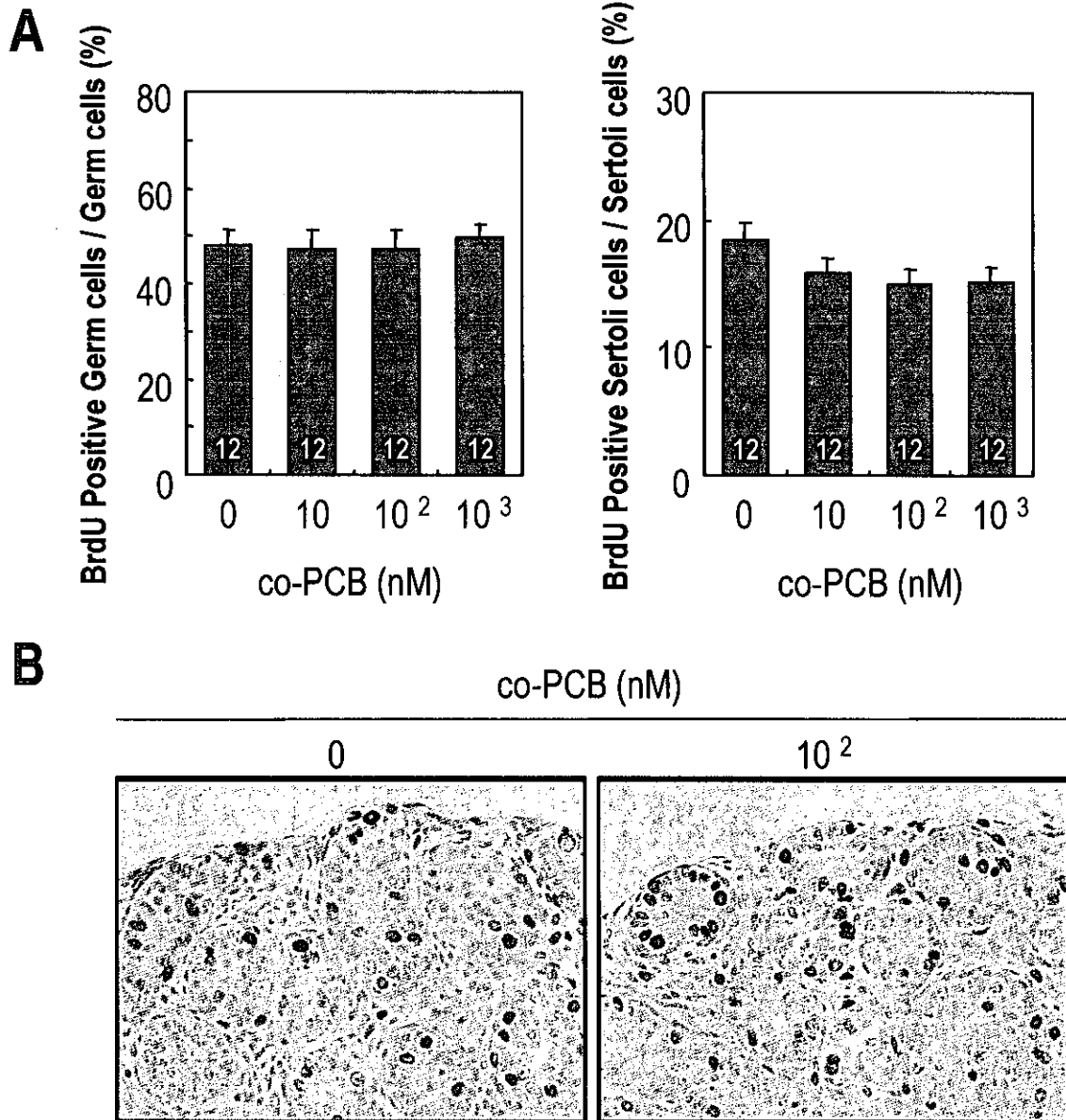
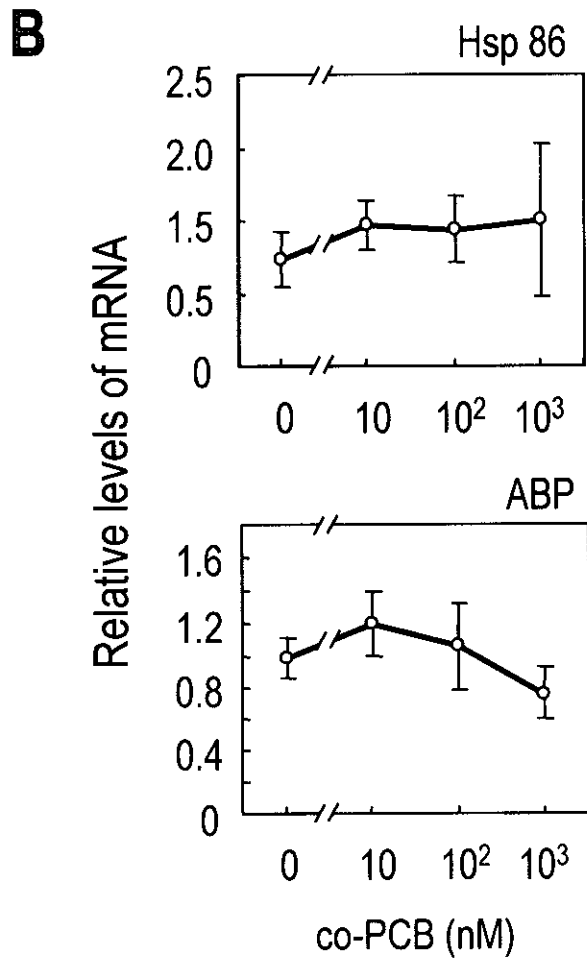
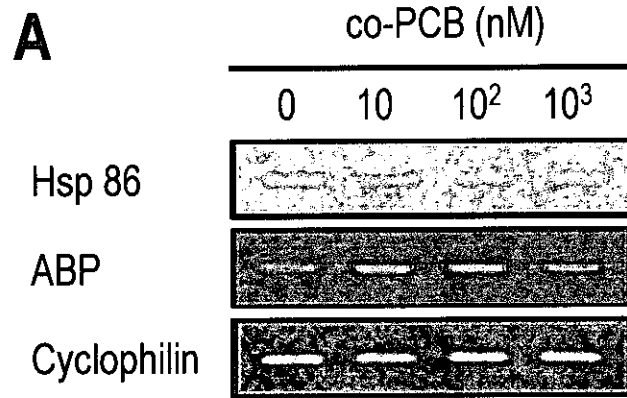


图 2



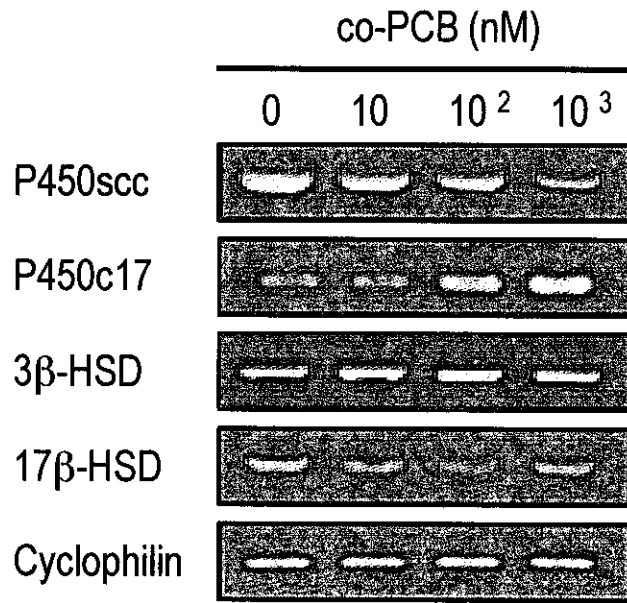
☒ 3



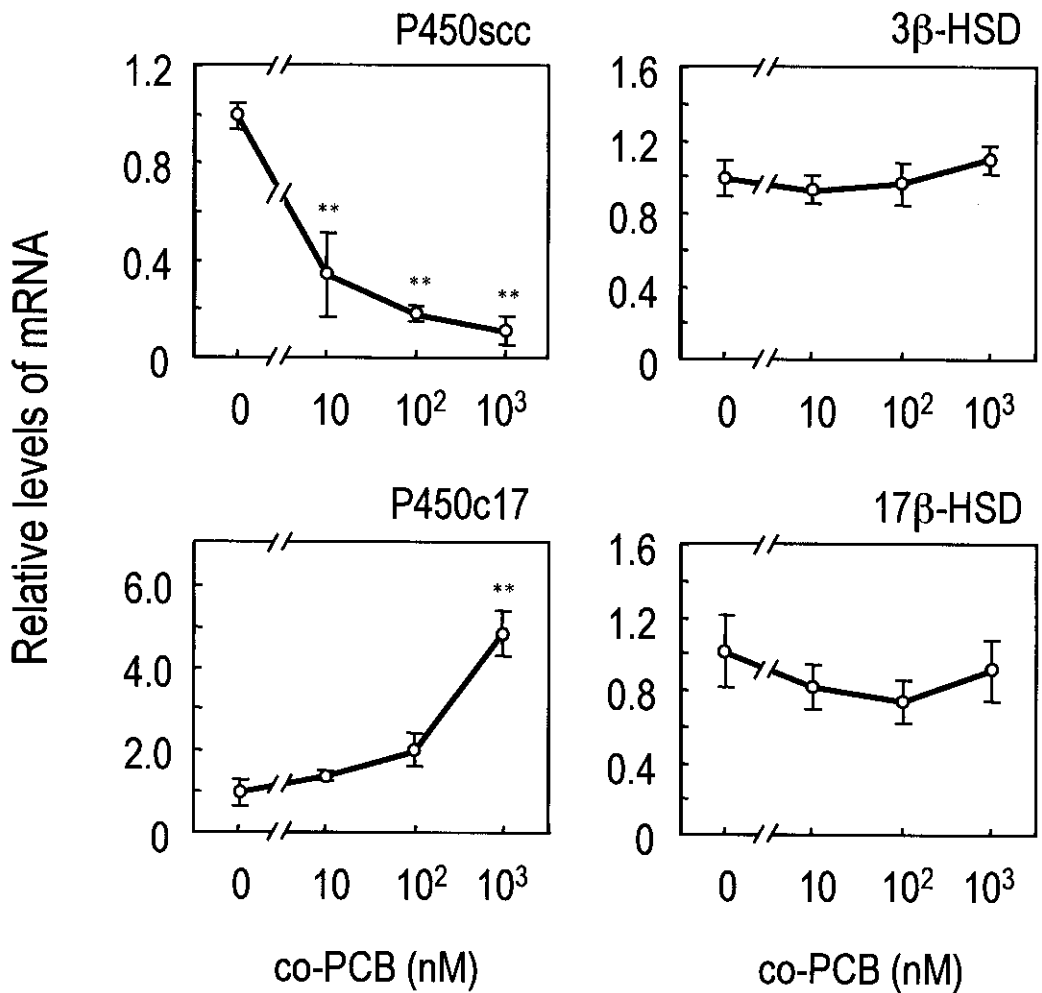


☒ 5

A



B



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

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 国立環境研究所環境健康研究領域 領域長

研究要旨

これまで、主にラットを用いた実験系により、妊娠 15 日目に TCDD を単回投与すると生まれてきた雄の前立腺腹葉の重量が対照群に比べて有意に減少すること、またこの現象は、妊娠後期（妊娠 18 日目）や出生後の曝露では起きないことから、臨界時期が存在することを報告した。本研究では、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 µg/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。その結果、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。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。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。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。

研究協力者

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

ダイオキシン類の母体曝露により生じる生まれた子への影響の中でも、雄性生殖器官発育への影響は、実験動物を使用した報告で極めて低用量で起こるとされることから、ヒトの健康リスクを考える上でも極めて重要な現象の一つである (Mably *et al.*, 1992, Gray *et al.*, 1997, Roman *et al.*, 1998)。我々もこれまで、主にラットを用いた実験系により、妊娠 15 日目に TCDD を単回で投与すると生まれてきた雄の前立腺腹葉重量が対照群に比べて有意に減少することを確認している (Ohsako *et al.*, 2001)。またこの

現象は、妊娠後期（妊娠 18 日目）や出生後の曝露では起きないことから、臨界時期が存在することも示された (Ohsako *et al.*, 2002)。この胎仔期曝露による前立腺発育遅延という現象は、マウスでも同様に生じ、マウスにおいても臨界時期が存在することが報告されている (Lin *et al.*, 2002a)。さらに、この現象は胎仔の AhR 遺伝子に完全に依存しているが (Lin *et al.*, 2002b)、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 (Ohsako *et al.*, unpublished data)。

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. 研究方法

2, 3, 7, 8-TCDD (純度は 99.5%、溶媒 n-nonane、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) は Cambridge Isotope Laboratory より購入、コーンオイルに溶解し、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ にて使用した。したがって、ピークルには 2% n-nonane/corn oil を用いた。妊娠 3 日目の C57B/6J マウス (日本クレア) を購入し、妊娠 13 日目と妊娠 17 日目に TCDD を 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 母体重 (5 ml/kg) にて経口投与した。同一用量 (5 ml/kg) でピークルを対照群に同じく妊娠 13 日目と妊娠 17 日目に投与した。投与 24 時間目にエーテル麻酔下で胎仔を摘出し、液体窒素にて凍結、-80°C で一次保存した。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、そのうちの雄胎仔のみを選別した。各群 5 個体分の RNA サンプル 100 μg を混合し、妊娠 13 日目 TCDD 投与群 (GD13-TCDD)、妊娠 17 日目 TCDD 投与群 (GD17-TCDD)、妊娠 13 日目ピークル投与群 (GD13-Vehicle)、妊娠 17 日目ピークル投与群 (GD17-Vehicle) とし、以下のマイクロアレイ解析に用いた。RNA サンプルはまず 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, CA, USA)) にハイブリダイズ

し、洗浄後マイクロアレイスキャナー (GenePix, Axon Instrument, CA, USA) にてスキャニングし、スポットインテンシティをソフトウェア (ArrayGauge software) で解析した。

C. 研究結果

妊娠 13 日目は C57B/6J マウスにおいて TCDD 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ける臨界時期であることが報告されている (Lin *et al.*, 2002a)。一方、妊娠 17 日目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。

本マイクロアレイ (Atlas Mouse Glass Array 3.8I, Clontech) は、3756 の遺伝子を搭載しているが (図 1)、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. 考察

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。

今回は、TCDD 曝露後の胎仔全体を用いてマイクロアレイの材料に用いている。臨界時期特異的に、泌尿生殖複合体への

TCDD 作用が、生後の雄性生殖器官の発達に影響を及ぼすことから、現在、非尿生殖複合体を摘出することによる遺伝子の網羅的検討を行っている。胎仔全体の解析結果との比較をすることも、原因遺伝子の特定に役立つことであろう。さらに、PCB の非 TCDD 毒性の同定のための検討も解析中である。

E. 結論

以上の結果は、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。

F. 参考文献

Mably, T. A., Moore, R. W., and Peterson, R. E. (1992). *In utero* and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 1. Effects on androgenic status. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 114, 97-107.

Roman, B. L., Timms, B. G., Prins, G. S., and Peterson, R. E. (1998). *In utero* and lactational exposure of the male rat to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin impairs prostate development. 2. Effects on growth and cytodifferentiation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 150, 254-270.

Gray, L. E., Ostby, Jr. J. S., and Kelce, W. R. (1997). A dose-response analysis of the reproductive effects of a single gestational dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in male Long Evans hooded rat offspring. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 146, 11-20.

Faqi, A. S., Dalsenter, P. R., Merker, H. J., and Chahoud, I. (1998). Reproductive toxicity

and tissue concentrations of low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in male offspring rats exposed throughout pregnancy and lactation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 150, 383-392.

Ohsako, S., Miyabara, Y., Nishimura, N., Kurosawa, S., Sakaue, M., Ishimura, R., Sato, M., Aoki, Y., Sone, H., Tohyama, C., and Yonemoto, J. (2001). Maternal exposure to a low dose of 2,3,7,8-

tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) suppressed the development of reproductive organs of male rats: dose-dependent increase of mRNA levels of 5 α -reductase type 2 in contrast to decrease of androgen receptor in the pubertal ventral prostate. *Toxicol. Sci.* 60, 132-143.

Theobald, H. M., Roman, B. L., Lin, T. M., Ohtani, S., Chen, S. W., and Peterson, R. E. (2000). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin inhibits luminal cell differentiation and androgen responsiveness of the ventral prostate without inhibiting prostatic 5 α -dihydrotestosterone formation or testicular androgen production in rat offspring. *Toxicol. Sci.* 58, 324-338.

Ohsako S., Miyabara Y., Sakaue M., Ishimura R., Kakeyama M., Izumi H., Yonemoto J., and Tohyama C. Developmental stage-specific effects of perinatal 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin exposure on reproductive organs of male rat offspring. *Toxicol. Sci.* 66 (1), 283-292, (2002)

Lin T.M., Simanainen U., Moore R.W., Peterson R.E. Critical windows of vulnerability for effects of 2,3,7,8-

tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on prostate and seminal vesicle development in C57BL/6 mice. *Toxicol. Sci.* 69 (1), 202-209, (2002a)

Lin T.M., Ko K., Moore R.W., Simanainen U., Oberley T.D., Peterson R.E. Effects of aryl hydrocarbon receptor null mutation and *in utero* and lactational, 2,3,7,8-

tetrachlorodibenzo- p-dioxin exposure on prostate and seminal vesicle development in C57BL/6 mice. *Toxicol Sci* 68 (2), 479-487, (2002b)

与雄胎仔サンプル; GD13-TCDD, 妊娠 13 日目 TCDD 投与雄胎仔サンプル; GD17-Vehicle, 妊娠 17 日目 Vehicle 投与雄胎仔サンプル; GD17-TCDD, 妊娠 17 日目 TCDD 投与雄胎仔サンプル。

G. 健康危険情報 特に無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

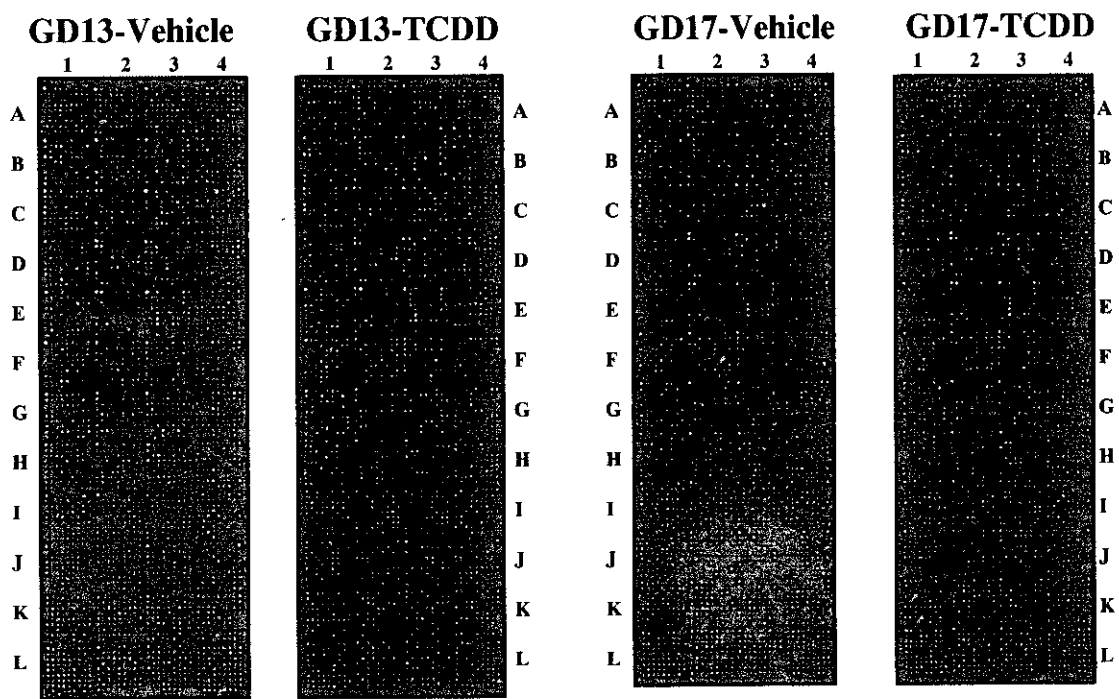
1. 特許取得
特に無し
2. 実用新案取得
特に無し
3. その他
特に無し

I. 図の説明

図1 Atlas Mouse Glass Array 3.8I による胎仔期 TCDD 曝露による遺伝子発現変動解析。GD13-Vehicle, 妊娠 13 日目 Vehicle 投

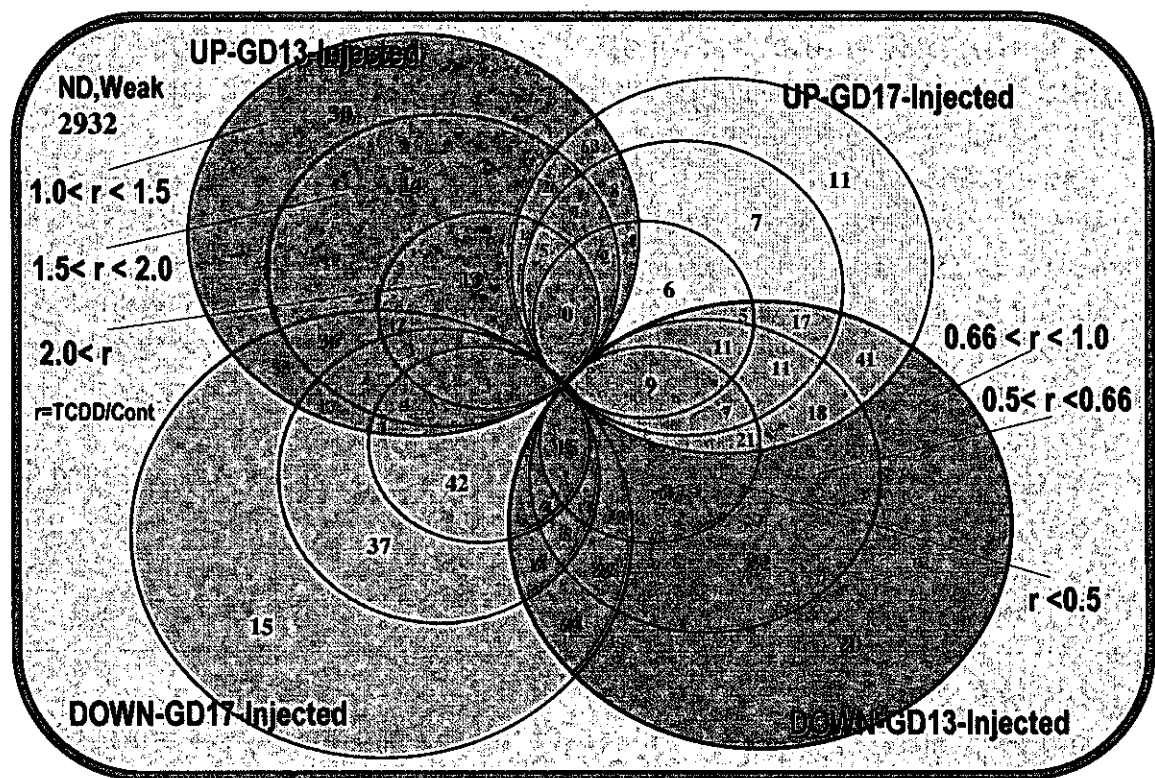
図2. Atlas Mouse Glass Array 3.8I による胎仔期 TCDD 曝露による遺伝子発現変動解析結果。UP-GD13-Injected, 妊娠 13 日目 TCDD 投与雄胎仔で発現促進した遺伝群; UP-GD17-Injected, 妊娠 17 日目 TCDD 投与雄胎仔で発現促進した遺伝群; DOWN-GD13-Injected, 妊娠 13 日目 TCDD 投与雄胎仔で発現抑制した遺伝群; DOWN-GD17-Injected, 妊娠 17 日目 TCDD 投与雄胎仔で発現抑制した遺伝群。GD13 投与および GD17 投与とともに発現促進した遺伝子が極端に少ないことに注意。

図 1



←: 変動の見られた典型的遺伝子

図 2



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 国立環境研究所環境健康研究領域 領域長

研究要旨

毒性等価係数（toxic equivalency factor, TEF）の異なるコプラナーPCB（2,3',4,4'5-五塩素化ビフェニル；PCB118、2,3,4,4'5-五塩素化ビフェニル；PCB114）の甲状腺およびレチノイド代謝への攪乱作用を調べ、PCB 類の Arylhydrocarbon receptor (AhR) を介さない非 TCDD 毒性のメカニズムとこの場合の毒性指標となる遺伝子を発現遺伝子の網羅的な遺伝子解析により検討した。

(1) コプラナーPCB の甲状腺ホルモンおよびレチノイド代謝への影響が AhR 依存性か否かを調べるために、PCB118（TEF:0.0001）と PCB114（TEF:0.0005）の投与実験を行った。PCB118 投与マウスでのみ AhR の活性化を伴わずに甲状腺ホルモンおよび血清レチノールレベルの低下が認められた。

(2) 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 PCB118 および PCB114 投与実験を行った結果、PCB118 だけは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。

(3) PCB118 あるいは PCB114 を曝露したマウスの肝における発現遺伝子を網羅的に解析したところ、PCB118 だけに顕著に誘導される遺伝子が明らかとなった。この遺伝子はコプラナーPCB の毒性指標としての可能性が示唆された。

本実験結果は、コプラナーPCB の中でも甲状腺ホルモンおよびレチノイド代謝攪乱に対する毒性機構が AhR 非依存性の場合があり、この場合の指標となる可能性のある遺伝子が同定された。このことから、コプラナーPCB を含むダイオキシン類の毒性評価には、今後は非 TCDD 毒性であるコプラナーPCB 毒性を考慮する必要性があることが示唆された。

研究協力者

西村典子、米元純三、竹内陽子、横井千沙子 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、
前田秀一郎 山梨大学大学院医学工学総合研究部

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。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たり、レチノイド代謝を攪乱す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