

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(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やレチノイド代謝攪乱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。

本実験では、PCB118、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、網羅的に発現遺伝子を解析することによりPCBの毒性指標をの可能性を探索した。

B. 材料および方法

1. 実験動物、投与量及び投与方法

PCB118とPCB114をAccuStandard Inc. (NewHaven, CT)から購入し、コーン油に溶解して、各50 mg/mlの調整液を作成した。

2. TTR 遺伝子欠損マウスの PCB118、PCB114 投与実験

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用いた。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。一群7匹のマウスに50 mg/kg bwのPCBを単回経口投与し、その7日後に血液を採取し、肝臓、胸腺は採取して重量を測定後に分析材料とした。

3. 飼育条件

飼育条件は温度24±1、湿度50±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ボ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。マウスの導入、飼育および処理はすべて国立環境研究所の動物実験手順に従って行った。

4. 甲状腺ホルモンの測定

血清中Total T4(TT4)はRIA法(DPC Products Corporation, Buckinghamshire, UK)により定量した。

5. レチノイドの測定

血清はジエチルエーテル抽出、肝臓は1.5%ピロガロール/エタノール溶液中でホモジナイズ後、n-ヘキサン抽出を行なった。抽出液を窒素気流下で蒸発乾固後、MeOHに再溶解して0.5 µmのメンブランフィルターを通し液体高速クロマトグラフィー(HPLC)分析用試料とした。

レチノールとレチニールパルミチン酸を標準品として、定量は蛍光検出器(474, Waters)付きHPLC(2690, Waters)を用い、蛍光検出は励起波長340 nm、蛍光波長460 nmとした。分析カラムはMightysil RP-18 GP 250-4.6 (5 µm, 関東化学)を用いた。溶離溶媒はジクロロメタン/アセトニトリル(25:75)を用い、流量1 mL/minとした。本実験ではレチノール(Retinol)およびパルミチン酸エステル(Retinyol 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とした。

6. CYP1A1の免疫組織染色

肝臓の一部をザンボニー液で24時間固定した後、パラフィン包埋した。4 µmのパラフィン切片を脱パラフィンした後、内因性パーオキシダーゼ活性の阻止(0.3% H₂O₂ 加メタノール30分)を行い生理食塩水(PBS)で洗浄する。CYP1A1の一次抗体と37度で1時間反応させる。生理食塩水(PBS)

で洗浄後、ビオチン化二次抗体と 37 度で 1 時間反応させる。PBS にて洗浄後、アビジン・ビオチン複合体 (PK-400, Vector Lab, Burlingame, California) で 30 分室温にて反応後、PBS で洗浄、0.003% hydrogen peroxide を基質として

3,3'-Diaminobenzidine-tetrahydrochloride (Sigma, St. Louis, Missouri)を加えて発色する。ヘマトキシリン染色で対比染色を行った。

7. マウス肝の発現遺伝子の解析

各群雌マウス 3 匹分の肝臓モジネート液を 1 試料として、マウス DNA チップコンソーシアム事務局・実験センター・日本レーザ電子株式会社 (名古屋市中区熱田区三本松町 20-9) に DNA チップ解析を依頼した。

8. 統計学的手法

本実験のデータは、平均値±標準誤差 (mean ± standard error) で表示し、コーン油対照群と曝露群間の有意差の検定は Student's *t*-test で行った (有意水準両側 5%)。

C. 研究結果

1. PCB118 と PCB114 の甲状腺ホルモンレベルへの影響

対照群では、TTR 欠損マウスの TT4 レベルは、野生型マウスの約 50-60% であった。血清 TT4 濃度は野生型マウスでは PCB118 投与群において、対照群に比べて有意に低下した。TTR 欠損マウスの血清 TT4 濃度は PCB 投与による低下は見られなかった (図 1)。

2. PCB118 と PCB114 のレチノイド代謝に及ぼす影響と TTR との関係

PCB118 と PCB114 曝露による肝臓内レチノイド濃度に及ぼす影響とその際の TTR との相互関係を調べるために 12 週齢の野生型マウスと TTR 欠損マウス (雄) に 50 mg/kg の PCB118 と PCB114 を投与し、そ

の 7 日後に血清および肝臓中レチノイド量を測定した (図 2)。オイル投与マウスにおいて、TTR の欠損は血清中レチノール量を約 10% にまで著しく低下した。

PCB118 投与により野生型マウスで血清レチノール量がオイル投与対照群に比べて有意に低下したが、PCB114 投与による血清レチノール量に対する影響は認められなかった。このことから、PCB118 は PCB114 の血清中レチノール代謝に及ぼす影響と異なることがわかった。PCB118 投与により野生型マウスおよび TTR 欠損マウスの肝臓中でレチノール量の減少が認められたが、パルミチン酸および総レチノイド量の減少は見られなかった。TCDD と異なる作用が見られた。PCB114 曝露は野生型マウスでは減少作用はなく、TTR 欠損マウスにおいてオイル投与対照群に比べて肝臓レチノールおよび総レチノイド量の有意な低下が認められた。

3. PCB118、PCB114 の肝臓中 CYP1A1 の免疫組織染色

肝臓中 CYP1A1 の免疫組織染色を行った結果、PCB114 投与群で CYP1A1 の顕著な合成誘導が認められた。すなわちこれらのマウス肝臓では中心静脈周辺の肝実質細胞に CYP1A1 の著しい染色性が認められた。尚、小葉間結合組織周辺の肝実質細胞は陰性であり、CYP1A1 酵素の局在が他の薬物代謝系酵素の局在とよく一致していた。PCB118 投与群のマウス肝臓においては CYP1A1 による染色性はほとんど見られなかった (図 3)。

4. PCB118 または PCB114 曝露の野生型マウスおよび TTR 欠損マウス肝臓における PCB118 または PCB114 濃度

PCB118 と PCB114 曝露のマウスにおいて野生型マウスおよび TTR 欠損マウス肝臓における PCB118 と PCB114 濃度に有意差は認められなかった (図 4)。

5. PCB118 と PCB114 の肝における発現遺伝子の変動

Oil 投与対照マウスと比較して、PCB118 投与マウスで 2 倍以上に発現上昇した遺伝子は 54 遺伝子であったが、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 投与マウスと比較して、PCB118 投与マウスで 2 倍以上に発現上昇した遺伝子は 46 遺伝子であったが、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. 考察

コプラナーPCB (PCB118、PCB114) の甲状腺ホルモン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) を介し毒性等価係数 (toxic equivalent factor, TEF) で評価される TCDD 毒性作用と、AhR を介さない非 TCDD 毒性のメカニズムを検討した。このことは TCDD や PCB の毒性を正しくリスク評価する際の情報提供に寄与するものと考えられる。

TTR はげっ歯類における血清レチノールおよび甲状腺ホルモンの主要な輸送蛋白である。血中のレチノールはレチノール結合蛋白質 (RBP)、甲状腺ホルモンのサイロキシン (T4)、および TTR が結合した巨大分子として標的器官に輸送され、同時に腎臓から濾過消失するのを防ぐ機能も果たしている。この巨大分子の形成が阻害されると低分子化する結果、レチノールが糸球体から濾過され血中レチノールの減少が起こるとされている。TTR を遺伝的に欠損したマウス (TTR^{-/-}) の血清レチノール量はオイル投与の対照群で野生型マウスの約 10% に減少していた。このことは血中レチノール

量の保持に TTR が不可欠であることが明らかとなった。

12 週齢の雄野生型マウスに PCB118 を投与すると血中レチノール量が著しく減少した。さらに、PCB118 投与は野生型マウスの肝臓中レチノイド量をも有意に低下させた。

生体で代謝されやすい PCB のレチノール代謝攪乱機構は PCB の水酸化体が TTR と結合するために尿中排泄増加につながりレチノール量の減少が起こることが知られている。12 週齢の雄野生型、TTR 欠損マウスに PCB118 および PCB114 を単回経口投与し、血中および肝臓中レチノイド代謝に及ぼす影響を調べたところ、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。PCB118 は野生型および TTR 欠損マウスの肝臓中レチノール量を低下した。

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。興味深いことに、PCB114 は TTR 欠損で、肝臓中のレチノイド量を有意に低下した。このことから PCB114 のレチノイド代謝攪乱作用機構は、TEF に基づく、AhR が介在することを示唆した。

一方、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ール量がオイル投与対照群に比べて有意に減少した。この場合は、肝臓レチノイド代謝攪乱作用に TTR が関与している可能性が示唆された。

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. 結論

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) の甲状腺ホルモン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 毒性のメカニズムを検討した。その結果、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があることが判明した。

F. 参考文献

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* 144, 2075-2083/

Nishimura N, Miyabara Y, Sato M, Yonemoto J, Tohyama C. (2002) Immunohistochemical localization of thyroid stimulating hormone induced by a low oral dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in female Sprague-Dawley rats. *Toxicology* 171, 73-82

G. 健康危険情報

特になし

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

I. 図の説明

図1 PCB118またはPCB114曝露の野生型およびTTR欠損マウス血清甲状腺ホルモンレベルに及ぼす影響

12週齢野生型およびTTR欠損マウスにPCB118またはPCB114を投与し、7日目に解剖して、血清甲状腺ホルモンレベルを測定した。結果は、 $\text{平均値} \pm \text{標準偏差}$ ($n=6-7$) で表示した。

*オイル投与対照群と比較して有意差有り ($P < 0.05$)。

図2 PCB118またはPCB114曝露の野生型およびTTR欠損マウス肝臓レチノイド量に及ぼす影響

12週齢野生型およびTTR欠損マウスにPCB118またはPCB114を投与し、7日目に解剖して、肝臓中レチノイド量を測定した。結果は、 $\text{平均値} \pm \text{標準偏差}$ ($n=6-7$) で表示した。

*オイル投与対照群と比較して有意差有り ($P < 0.05$)。

#野生型マウスと比較して有意差有り ($P < 0.05$)。

図3 PCB118、PCB114曝露の野生型およびTTR欠損マウス肝臓中のCYP1A1蛋白の免

疫組織染色

12週齢野生型およびTTR欠損マウスにPCB118またはPCB114を投与した後、7日目に解剖して、肝臓のパラフィン組織標本を作製し、免疫酵素抗体法によりCYP1A1の蛋白を染色した。PCB118曝露の場合は肝臓細胞に強いCYP1A1蛋白の誘導が認められたが、PCB114曝露による肝臓中CYP1A1蛋白の誘導は見られなかった。

A, B: オイル投与対照群の野生型マウス (A) 及びTTR欠損マウス (B) の肝臓: CYP1A1の染色性は全く認められなかった。C, D: PCB118曝露野生型マウスおよびTTR欠損マウスの肝臓: 中心静脈周辺部の肝実質細胞に極めて僅かな弱い染色が認められたが、ほとんどの肝実質細胞は陰性であった。

E, F: PCB114曝露野生型マウスおよびTTR欠損マウスの肝臓: 中心静脈周辺部の肝実質細胞に強い染色性が認められた。門脈結合組織周辺の肝細胞は陰性であった。

Bar = 50 μm

図4 PCB118またはPCB114曝露の野生型およびTTR欠損マウス肝臓におけるPCB118またはPCB114濃度

結果は、 $\text{平均値} \pm \text{標準偏差}$ ($n=3$) で表示した。

表1. PCB118, PCB114に曝露したマウス肝において発現上昇した遺伝子

Oil投与対照マウスと比較して、PCB118投与マウスで 2倍以上に発現上昇した遺伝子(54遺伝子の中から抜粋)

CYP2B9(11.5)、CYP2B10(4.3)、CYP2A4(4.1)、CYP2A5(4.0)、
CYP4A14(3.9)、CYP2C55(3.8)、CYP 1 A2(3.7)、retinol
dehydrogenase 11(2.7)、CYP1A1(2.5)

PCB114投与マウスと比較して、PCB118投与マウスで2倍以上に発現上昇した遺伝子(46遺伝子の中から抜粋)

CYP2B9(11.5)、CYP2B10(4.3)、retinol dehydrogenase 11(2.2)、
CYP2C55(2.1)、CYP2B13(2.0)、

Figure 1

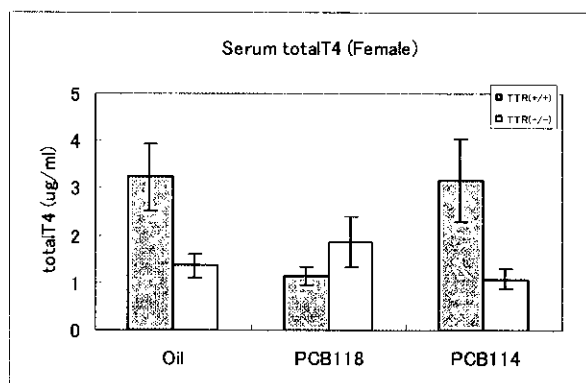
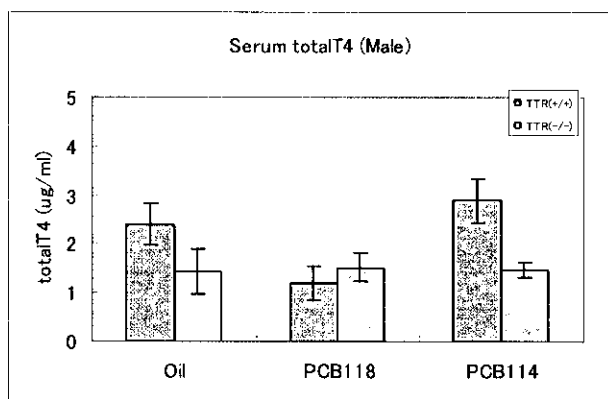


図 2

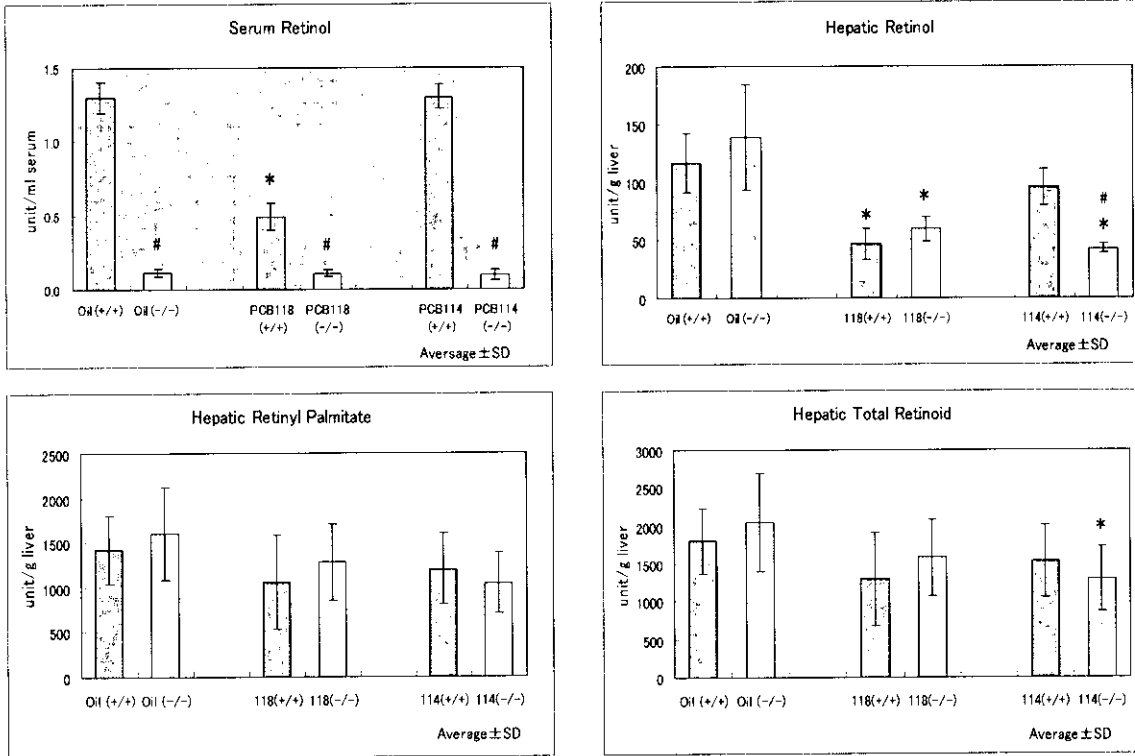


图 3

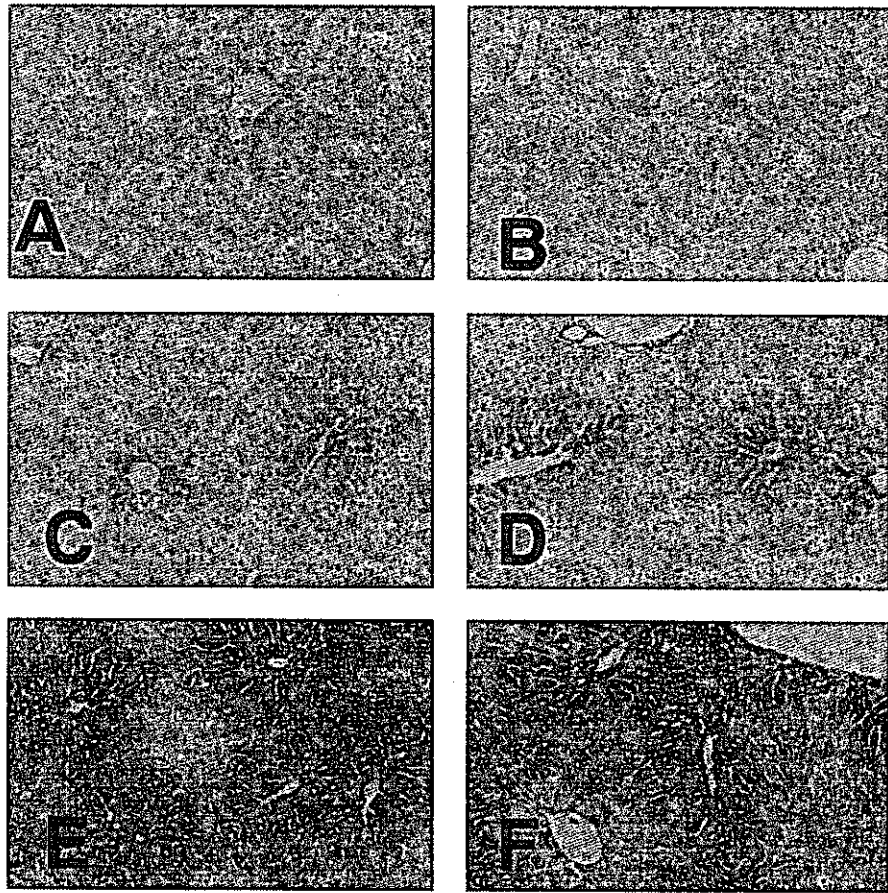
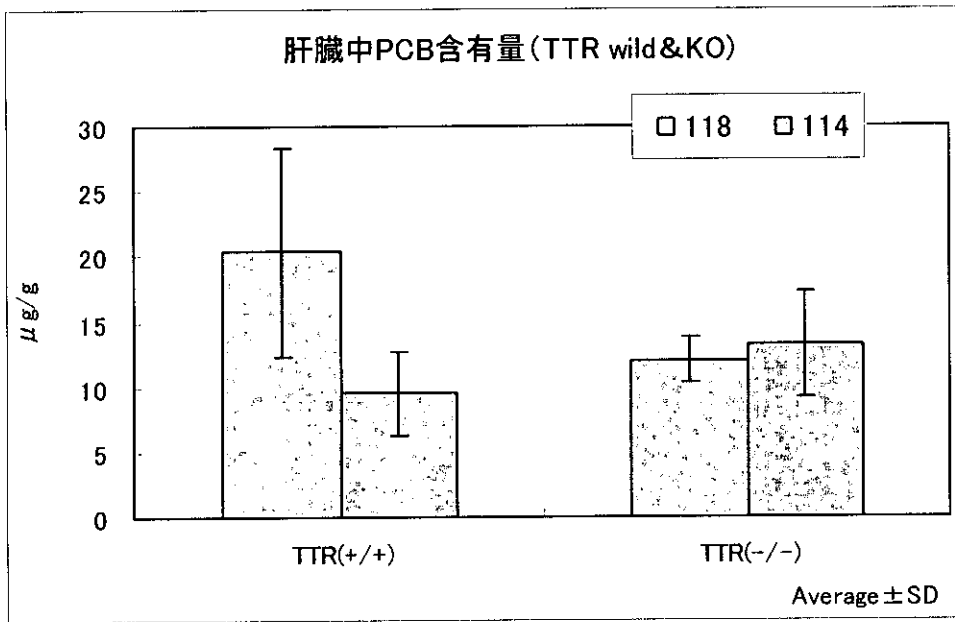


図 4



コプラナーPCBとTCDDの毒性発現機構の比較解析

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

研究要旨

PCBの毒性をTCDD類似毒性と非TCDD毒性に分類することを目的に、以下3項目のように、TCDDの毒性発現機構を解析した。(1)妊娠15日目のWistar/STラットにTCDDを1 μ g/kgの用量で投与し、胎仔が生後12週時に海馬依存性学習行動への影響をcontextual fear conditioning testで検討した。この結果、周産期のTCDD曝露が成熟後の学習能力を低下させ、この低下には、海馬CA1領域のcyclic AMP response element binding proteinの活性低下が関与する可能性が高いことを見出した。(2)妊娠12.5日目の3匹のC57BL/6NマウスにTCDDを5 μ g/kg投与し、6日後、これら6匹のマウス体内の雌雄の胎仔、それぞれ1匹ずつ、計12匹の脳から採取したRNAサンプル中の種々のmRNAの量を、DNAマイクロアレイ法で解析した。この結果、調べた3匹の雄または雌の全てで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、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。(3)c-Srcを介したTCDDの毒性発現機構の存在が示唆されている。そこで、Hepa-1c1c7細胞株とc-Srcの誘導発現系を導入したNIH3T3細胞株にTCDDを投与し、その後3時間迄にc-Srcの活性化が起こるかどうかを検討したが、TCDD投与に応答したc-Srcの活性化を認めなかった。

A 研究目的

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)は、発癌性、免疫毒性、生殖毒性など人体に種々の毒性をもつことが懸念されている(Tohyama, 2002)。また、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(Vreugdenhil, et al., 2002)、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(Cheng, et al., 2002, Haavisto, et al., 2001, Hays, et al., 2002, Ikeda, et al., 2002, Kakeyama, et al., 2001, Pitt, et al., 2000, Unkila, et al., 1995)。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(Hojo, et al., 2002, Zareba, et al., 2002)。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(Kakeyama and Tohyama, 2003, Petersen, et al., 2000)。

一方、c-Src欠損マウスにおいては、TCDDの毒性発現が抑制されるので、c-SrcはTCDDの毒性発現に関与すると考えられる(Dunlap, et al. 1999, Matsumura, et al., 1997)。さらに、Hepa-1c1c7培養細胞を用いた解析によれば(Blankenship, et al., 1997)、TCDD添加後30分以内に膜画分蛋白中のc-Src蛋白レベルが上昇し、同じ画分中の分子量60kDa蛋白の磷酸化が上昇する。これらの上昇はaryl hydrocarbon receptor(AhR)依存のかつaryl hydrocarbon nuclear translocator(ARNT)非依存的に起こる。しかし、この60 kDa磷酸化蛋白がc-Srcと証明されていないため、TCDDへの初期応答として、c-Srcチロシンキナーゼの活性化(比活性の上昇)

が起きているか否かは不明である。一方、c-Src の機能発現には、多くの場合その活性化を伴うことが知られている(Brown, et al., 1996, Bjorge, et al., 2000)。

本研究では、PCB の毒性発現機構を TCDD 類似機構と非 TCDD 機構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) 内分泌攪乱物質への胎仔期における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、TCDD を妊娠ラットに投与し、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た。さらに行動実験後の脳の海馬における cyclic AMP response element binding protein (CREB) と呼ばれる転写因子の活性化を、免疫組織化学的方法により検討した。

2) TCDD への胎仔期における曝露により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、低用量の TCDD を妊娠マウスに投与し、体内の胎仔脳の 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、Kato, et al., 1997)に TCDD を投与し、その後 3 時間迄に c-Src の活性化が起こるかどうかを検討した。

B. 研究方法

1. TCDD

実験動物には、Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, U.S.A) から購入した TCDD(50 µg/ml、ノナン溶液)を、TCDD の含量が 0.5 µg/ml となるようにコーン油に溶解させ、マウスまたはラット用胃ゾンデで強制経口投与した。対照群にはコーン油

を同様に投与した。培養細胞には、Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, U.S.A) から購入した TCDD を、TCDD 濃度が 50 µM となるように DMSO に溶解させて用いた。対照群には DMSO を同様に用いた。

2. 実験動物および飼育条件

Wistar/ST ラットは日本 SLC 株式会社から購入し、C57BL/6N マウスは日本クレア株式会社から購入した。飼育および処理は山梨大学の動物実験手順に従って行った。

3. 実験計画

3.1. 妊娠 15 日目の 5 匹の Wistar/ST ラットに体重当たり 1 µg/kg の TCDD を、対照妊娠ラット 5 匹には等量のコーンオイルを、胃ゾンデで強制経口投与し、生まれた仔ラットを、4 週齢で離乳し、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、脳の新鮮凍結切片を用いて、免疫組織化学的方法により調べた。

3.2. 体重当たり 0 µg/kg または 5 µg/kg の TCDD を妊娠 12.5 日目の 3 匹の C57BL/6N マウスに投与し、6 日後、これら 6 匹の妊娠マウス体内の雌雄の胎仔、それぞれ 1 匹ずつ、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。

3.3. 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、その後 3 時間迄に c-Src の活性化が起こるかどうかを次のように検討した。

1) 活性化型 Src 認識抗体を用いたウエスタンブロッティングによる活性化 Src の検出 2) 細胞可溶化物中の c-Src キナーゼの比活性の比較 3) 細胞の TritonX 不溶画分中の c-Src レベルの変動の解析。

4. 分析方法

4.1. contextual fear conditioning test

contextual fear conditioning は、ラットを特別のチャンパー（条件刺激）に入れ、3 分後に 2 秒間の電撃ショック（無条件刺激）を足に 5 秒間隔で 3 回与える。この時ラットは、この特殊な状況下に置かれると電撃ショックが来ることを学習し、次にこのチャンパーに入れられると、電撃ショックが与えられなくても、運動停止(freezing)、血圧上昇、脱糞等の恐怖反応を示す。そこで我々は、恐怖条件付けの後、1 時間後に再びチャンパーに入れ、5 分間の freezing 時間を測定した。freezing 時間の変動については、一元分散分析の後に Fisher の PLSD 法を用いて、統計的な有意差を検討した。

4.2. Immunohistochemistry

contextual fear conditioning test 終了後、直ちにラットの脳を採取し、ドライアイスで冷却したイソペンタンで急速に凍結し、セクション作製まで -80°C で保存した。海馬セクションの作製は、Paxinos and Watson のラット脳アトラスに従い、 $10\mu\text{m}$ の切片をクライオスタットで作製した。固定は 4%パラホルムアルデヒドで 15 分間行った。一次抗体は、抗 pCREB 抗体（リン酸化セリン 133）(CST, Inc)あるいは、抗 CREB 抗体 (CALBIOCHEM)を用い、 4°C で 48 時間反応させた。p-CREB 特異的抗体によって染色された細胞 (p-CREB-ir cell) の割合は、抗 p-CREB 抗体によって染色された細胞数を、抗 CREB 抗体によって染色された細胞数で割ることで示した。

4.3. DNA マイクロアレイ

CodeLink DNA マイクロアレイ(1 枚あたり、約 1 万種の異なる cDNA に相当する 30 塩基長のオリゴヌクレオチドを結合させたもの；Amersham 社製)を用いて解析した。

4.4. c-Src 抗体

抗 c-Src 抗体(マウスモノクローナル 327)

及び抗活性化型 Src(リン酸化チロシン 416) 抗体(CST, Inc.)を用いた。

4.5. 細胞培養

RN 細胞は、DMEM に 10%CS(Calf serum), penicillin/streptomycin, amphotericin B, hygromycin B, G418 を含む培地中で 37°C 、5% CO_2 の条件下で培養した(Kato, et al., 1997)。Hepa-1c1c7 細胞(ATCC より入手)は、a-MEM(ヌクレオシド不含)に 10%FCS、penicillin/streptomycin を含む培地中で 37°C 、5% CO_2 の条件下で培養した。

4.6. 細胞可溶化液の調製

細胞を可溶化する前に、使用直前に調製した pervanadate（チロシンホスファターゼ阻害剤）で細胞を処理し、細胞洗浄液及び可溶化 buffer 共に pervanadate を加えたものを用いた。

4.7. TritonX 可溶(TS)及び不溶(TI)画分の調製

上記のように細胞を前処理、洗浄後、pervanadate を含む TS 及び TI buffer で各画分を得た(Hamaguchi, et al., 1987)。ただし、TS 画分として、 $150,000\times g$ 、1 時間遠心後の上清、また TI 画分として $150,000\times g$ 、30 分遠心後の上清を用いた。

4.8. 免疫沈降反応

細胞蛋白量 200~800 μg を含む可溶化液を用いた。前処理には、マウスまたはウサギの IgG と protein A/G agarose (Santa Cruz) を用いた。一次抗体と 1 時間、次いで protein A/G agarose と 2 時間混合後、抗原抗体沈降複合体を可溶化 buffer で洗浄した。

4.9. ウェスタンブロッティング

細胞可溶化液（蛋白量は 50 μg 以下）または免疫沈降物を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた後、ニトロセルロース膜に転写した。同膜をブロッキング後一次抗体で室温 1 時間反応させたのち ECL

化学発光システム (Amersham Pharmacia Biotech)で処理後、LAS1000 イメージアナライザー(富士フィルム)により検出定量した。

4.10. c-Src の自己リン酸化活性の測定

細胞蛋白 800 μ g を含む細胞可溶化液より得た免疫沈降物を二等分し、一方を c-Src 蛋白レベルの決定のためウエスタンブロットティングにかけ、他方をリン酸化活性の測定 (Kato, et al., 1997)に用いた。c-Src への 32 P の取り込みを定量するため、免疫沈降物を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた後 BAS2500 システム (富士フィルム) で解析した。

C. 結果

1. contextual fear conditioning test

非投与群では、5 匹のマウスから生まれた雌雄各 9 匹を調べた。雄は約 45%、雌は約 30%の freezing を示し、著明な性差が認められた。一方、TCDD 投与群では、5 匹のマウスから生まれた雄 8 匹、雌 9 匹を調べた。雄は約 20%の freezing を示し、非投与群の雄に対して有意に freezing 時間が減少した。雌では、非投与群の雌に対して freezing 時間への影響は見られなかった (図 1)。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。

2. 免疫組織化学的方法による海馬 CA1 領域における p-CREB の解析

海馬 CA1 領域における CREB のリン酸化について検討した結果、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。一方、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 (図 2)。

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

の減少が影響している可能性が示唆された。

3. DNA マイクロアレイ

体重当り 5 μ g/kg の TCDD を妊娠 12.5 日目の 3 匹の C57BL/6N マウスに投与し、6 日後、これら 3 匹の妊娠マウス体内の雌雄の胎仔、それぞれ 1 匹ずつ、計 6 匹の脳から採取した RNA サンプルと妊娠 18.5 日目の 3 匹の対照 TCDD 非投与 C57BL/6N マウス中の雌雄の胎仔、それぞれ 1 匹ずつ、計 6 匹の脳から採取した RNA サンプルにつき解析した。各サンプルあたり 1 枚の DNA マイクロアレイを用いた。この結果、調べた 3 匹の雄または雌全てで 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。

4. RN 細胞及び Hepa1c1c7 細胞の AhR の TCDD 応答能の確認:リアルタイム RT-PCR 法による CYP1A1 遺伝子発現誘導の確認

RN 細胞及び Hepa1c1c7 細胞の AhR が機能していることを確かめるため、10nM の TCDD で 24 時間処理後、細胞を可溶化して RNA を単離後、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。一方、Hepa1c1c7 細胞では、TCDD 投与により 45 倍に増加していた。

5. TCDD の初期応答における Hepa1c1c7 細胞 c-Src の活性化

活性化型の Src ファミリー蛋白(Src)は 416 番目のチロシンがリン酸化されている。そこで、この活性化型 Src を認識する抗 pY416Src 抗体によるウエスタンブロットティングを行ない、TCDD 投与後 0.5 時間及び 3 時間経過した細胞可溶化物中の活性化型 Src のレベルを測定した。その結果、TCDD 投与による同レベルの変動はいずれの時間経過に於いても検出されなかった。なお

c-Src のレベルも一定であった。

抗 pY416Src 抗体を用いた場合、活性化型 Src 全体に占める活性化型 c-Src の量的割合やその活性化の割合によっては、見かけ上差が見つからない可能性がある。そこで、c-Src 特異抗体による免疫沈降複合体を用いて c-Src チロシンキナーゼの比活性を比較した。その結果、c-Src の生成量および自己リン酸化活性とも変動せず比活性が一定で c-Src の活性化は検出できなかった (図 3)。

c-Src は、活性化すると細胞の Triton 不溶 (TI)画分に移行することが知られており、活性化型 c-Src は細胞骨格と結合していると考えられている (Hamaguchi, et al., 1987)。そこで、TCDD 投与後 0.5 時間及び 3 時間経過した細胞を Triton (TS)画分と TI 画分に分離し、それぞれの c-Src の生成量および自己リン酸化活性を測定した。その結果、両画分中の c-Src 蛋白量及び自己リン酸化活性とも TCDD 投与による変動は無かった。

D. 考察

本研究では、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、まず TCDD 毒性発現機構を解析し、以下の新知見を得た。

1) 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 (Hojo, et al., 2002, Zareba, et al., 2002) 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。今後、性分化に重要な時期である生後間もない時期での海馬における遺伝子発現の変化を解析する。次に、これら TCDD による結果を PCB による結果と比較し、その差異を明らかにすることによって、PCB の脳毒性発現機構を TCDD 類似機構と非 TCDD 機構に分類することを目指す。

2) 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への曝露によっても今回同定したと同様の遺伝子群の発現変化を認めるかどうかを明らかにすることにより、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と考えられる。

3) 活性化型 Src 認識抗体を用いたウエスタンブロッ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 TI 画分中の c-Src レベルの変動の解析、のいずれのアプローチに於いても TCDD 投与に反応した c-Src の活性化は認められなかった。本研究では、c-Src キナーゼの正負の活性調節を担うリン酸化チロシン (PY416 及び PY527 等) を保護するため、より強力なチロシンホスファターゼ阻害剤である pervanadate で細胞を処置した (Mariner, et al., 2001)。従って、サンプル調製中に修飾を受けてキナーゼ活性が変化した可能性は無視できる。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。また、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. 結論

体重当たり 1 µg/kg の TCDD を妊娠 15 日目の Wistar/ST ラットに投与し、胎仔が生後 12 週時に海馬依存性学習行動への影響を contextual fear conditioning test で検討した。この結果、周産期の TCDD 曝露が成熟後の学習能力を低下させ、この低下には、海馬 CA1 領域の cyclic AMP response element binding protein の活性低下が関与する可能性が高いことを見出した。次に体重当たり 5 µg/kg の TCDD を妊娠 12.5 日目の C57BL/6N マウスに投与し、6 日後に胎仔脳の mRNA の量を、DNA マイクロアレイ法で解析した。この結果、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、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。さらに、Hepa-1c1c7 細胞株と c-Src の誘導発現系を導入した NIH3T3 細胞株に TCDD を投与し、その後 3 時間迄に c-Src の活性化が起こるかどうかを検討したが、TCDD 投与に応答した c-Src の活性化を認めなかった。

F. 参考文献

- Bjorge JD, Jakymiw A, Fujita DJ. (2000) Selected glimpses into the activation and function of Src kinase. *Oncogene* **19**:5620-35
- Blankenship A, Matsumura F. (1997) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)

causes an Ah receptor-dependent and ARNT-independent increase in membrane levels and activity of p60^{Src}. *Environ Toxicol Pharmacol* **3**:211-20

- Brown MT, Cooper JA. (1996) Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta* **1287**:121-49
- Cheng SB, Kuchiiwa S, Nagatomo I, Akasaki Y, Uchida M, Tominaga M, et al. (2002) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin treatment induces c-Fos expression in the forebrain of the Long-Evans rat. *Brain Res* **931**:176-80
- Dunlap DY, Moreno-Aliaga MJ, Wu Z, Matsumura F. (1999) Differential toxicities of TCDD in vivo among normal, c-src knockout, geldanamycin- and quercetin-treated mice. *Toxicology* **135**:95-107
- Haavisto T, Nurmela K, Pohjanvirta R, Huuskonen H, El-Gehani F, Paranko J. (2001) Prenatal testosterone and luteinizing hormone levels in male rats exposed during pregnancy to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and diethylstilbestrol. *Mol Cell Endocrinol* **178**:169-79
- Hays LE, Carpenter CD, Petersen SL. (2002) Evidence that GABAergic neurons in the preoptic area of the rat brain are targets of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin during development. *Environ Health Perspect* **110**:369-76
- Hojo R, Stern S, Zareba G, Markowski VP, Cox C, Kost JT, Weiss B. (2002) Sexually dimorphic behavioral responses to prenatal dioxin exposure. *Environ Health Perspect*

- 110:247-54
- Ikeda M, Inukai N, Mitsui T, Sone H, Yonemoto J, Tohyama C, et al. (2002) Changes in fetal brain aromatase activity following *in utero* 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin exposure in rats. *Environ Toxicol Pharmacol* **11**:1-7
- Takeyama M, Sone H, Tohyama C. (2001) Changes in expression of NMDA receptor subunit mRNA by perinatal exposure to dioxin. *Neuroreport* **12**:4009-4012
- Takeyama M, Tohyama C. (2003) Developmental neurotoxicity of dioxin and its related compounds. *Industrial Health* **41**:215-230
- Kato G, Maeda S. (1997) High-level expression of human c-Src can cause a spherical morphology without loss of anchorage-dependent growth of NIH3T3 cells. *FEBS Lett* **411**:317-21
- Mariner DJ, Anastasiadis P, Keilhack H, Bohmer F-D, Wang J, Reynolds AB. (2001) Identification of Src phosphorylation sites in the catenin p120^{ctn}. *J Biol Chem* **276**:28006-13
- Matsumura F, Enan E, Dunlap DY, Pinkeerton KE, Peake J. (1997) Altered *in vitro* toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in c-src deficient mice. *Biochem Pharmacol* **53**:1397-1404
- Petersen SL, Curran MA, Marconi SA, Carpenter CD, Lubbers LS, McAbee MD. (2000) Distribution of mRNAs encoding the arylhydrocarbon receptor, arylhydrocarbon receptor nuclear translocator, and arylhydrocarbon receptor nuclear translocator-2 in the rat brain and brainstem. *J Comp Neurol* **427**:428-39
- Pitt JA, Buckalew AR, House DE, Abbott BD. (2000) Adrenocorticotropin (ACTH) and corticosterone secretion by perfused pituitary and adrenal glands from rodents exposed to 2,3,7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Toxicology* **151**:25-35
- Tohyama C. (2002) Low-dose exposure to dioxin, its toxicities and health risk assessment. *Environ Sci* **9**:37-50
- Unkila M, Pohjanvirta R, Tuomisto J. (1995) Biochemical effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and related compounds on the central nervous system. *Int J Biochem Cell Biol* **27**:443-455
- Vreugdenhil HJI, Slijper FME, Mulder PGH, Weisglas-Kuperus N. (2002) Effects of perinatal exposure to PCBs and dioxins on play behavior in Dutch children at school age. *Environ Health Perspect* **110**: A593-A598
- Zareba G, Hojo R, Zareba KM, Watanabe C, Markowski VP, Baggs RB, et al. (2002) Sexually dimorphic alterations of brain cortical dominance in rats prenatally exposed to TCDD. *J Appl Toxicol* **22**:129-137
- 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 contextual fear conditioning test

ラットを特別のチャンバー（条件刺激）に入れ、3分後に2秒間の電撃ショック（無条件刺激）を足に5秒間隔で3回与える。1時間後に再びチャンバーに入れ、5分間のfreezing時間を測定した。

図2 免疫組織化学的方法による海馬 CA1 領域における p-CREB の解析

p-CREB 特異的抗体によって染色された細胞(p-CREB-ir cell)の割合は、抗 p-CREB 抗体によって染色された細胞数を、抗 CREB 抗体によって染色された細胞数で割ることで示した。

図3 TCDD 投与が Hepa1c1c7 細胞の c-Src チロシンキナーゼ活性におよぼす影響

TCDD(10nM)を投与してから 0.5 時間及び 3 時間後に調製した細胞可溶化物より c-Src 蛋白を免疫沈降し二等分した。一方を自己燐酸化活性の測定(A)に、他方をウエスタンブロッティングによる c-Src 蛋白量の測定(B)に用いた。NC, negative control としてマウス IgG で免疫沈降した； +, TCDD 投与； -, TCDD 非投与。

☒ 1

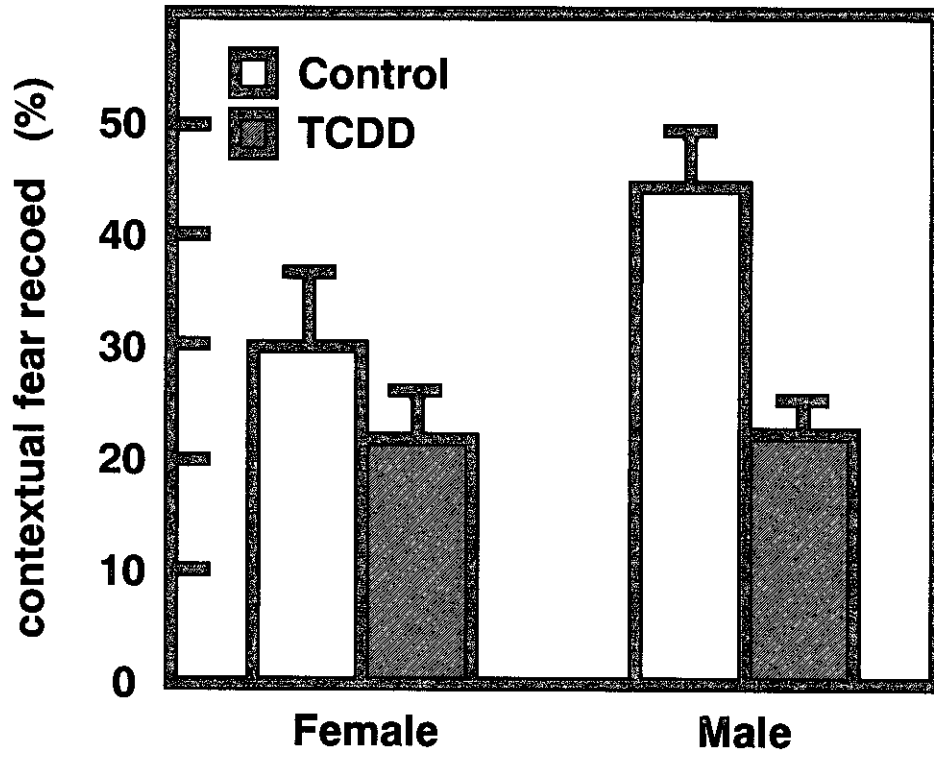


図 2

