

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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 遠山 千春

(東京大学大学院医学系研究科附属 疾患生命工学センター)

平成17(2005)年4月

目次

I. 総括研究報告	
コプラナーPCB の非ダイオキシン毒性の識別によるダイオキシン耐容摂取量の設定の在り方に関する研究 -----	1
遠山 千春 (東京大学大学院医学系研究科 疾患生命工学センター 教授)	
II. 分担研究報告	
1. 胎仔期前立腺発育異常におけるダイオキシン類曝露と PCB 曝露の違いに関するマイクロアレイ解析による検討-----	15
遠山 千春 (東京大学大学院医学系研究科 疾患生命工学センター 教授)	
2. PCB153 を用いた学習行動における非ダイオキシン様毒性の解析-----	29
遠山 千春 (東京大学大学院医学系研究科 疾患生命工学センター 教授)	
3. PCB の血中甲状腺ホルモン濃度低下作用における TCDD 様作用と非 TCDD 様作用の識別-----	38
加藤 善久 (静岡県立大学薬学部 講師)	
4. コプラナーPCB (PCB118 および PCB114)、並びに PCB153 の甲状腺ホルモン代謝と遺伝子発現に及ぼす影響の比較検討-----	49
遠山 千春 (東京大学大学院医学系研究科 疾患生命工学センター 教授)	
5. PCB と TCDD の毒性発現機構の比較解析のための脳における影響評価系の開発-----	62
前田秀一郎 (山梨大学大学院医学工学総合研究部 教授)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	67
IV. 研究成果の刊行物・別刷-----	69

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
総括研究報告書

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

東京大学大学院医学系研究科 疾患生命工学センター 教授
(前職： 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(PCB77, 114,118,126)ならびに非TCDD様のPCBであるPCB153を曝露することによって、生殖機能、甲状腺ホルモン、レチノイド代謝、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。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。マイクロアレイ解析から、PCB118に特有の遺伝子発現変化が認められた。PCB126は、新生仔マウスの精巣培養系、ラットにおけるオペラント行動による記憶学習機能に対して、非TCDD作用がある可能性が示唆された。非コプラナーPCBのPCB153は、記憶・学習機能阻害や甲状腺ホルモン恒常性かく乱、泌尿器複合体における遺伝子発現などに、AhRを介さずに作用する可能性が示唆された。コプラナーPCB異性体(PCB77, 114,118,126)は、非TCDD毒性を有することが示唆された。

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

加藤善久 静岡県立大学薬学部 講師

研究協力者：

大迫誠一郎、鈴木純子 国立環境研究所環境健康研究領域 分子細胞毒性研究室

掛山正心 北條理恵子 国立環境研究所環境健康研究領域 生体防御研究室

西村典子、米元純三、横井千沙子、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健康影響評価チーム

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とPCB153をそれぞれ、TCDD毒性と非TCDD毒性の陽性コントロールとして用い、コプラナーPCBのうち、PCB77、PCB126、PCB114及び118を投与した動物、あるいは細胞を用いて検討した。そして、非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

ダイオキシン類の健康リスクを考慮する際に主要な影響は、これまでの疫学的・実験的研究から、発ガンや肝臓機能などの一般毒性よりは、次世代の生殖機能、記憶学習機能、免疫機能であり、これらの機能に対する影響指標を耐容摂取量を設定する際に用いることが適当であることが確認されている。

ダイオキシン類の耐容一日摂取量は、TCDD特有の毒性の観点から29種類の異性体を対象に設定されている。このうち、12種類のコプラナーPCBの各異性体には、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までの値(毒性等価係数)が付与されている。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が、これら異性体の非TCDD毒性にはこれまで十分な注意が払われてこなかった。本研究は、コプラナーPCBが有するTCDD毒性と非TCDD毒性を、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提供を目的としている。

具体的には、毒性スペクトルの把握のため、TCDDと2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl(PCB153)をTCDD様毒性と非コプラナー毒性の指標として用いた。

コプラナーPCBとしては、3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (PCB77; TEF=0.0001)、2,3,4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB114; TEF=0.0005)、2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB118; TEF=0.0001)、3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126; TEF=0.1) を、それぞれの実験条件により、適宜、用いた。用量は、毒性等価係数 (TEF) に則して TEQ 値に揃えて比較検討した。本年度は、これまでのフォワード・トキシコロジーの知見をふまえて、PCB77、PCB114 と PCB118 を投与したマウスにおける甲状腺ホルモン代謝ならびに、肝臓における遺伝子の網羅的解析と特定の遺伝子発現に着目をして解析をした。さらに、AhR とは結合しないことから、その影響が観察をされるとすれば非 TCDD 毒性とみなすことができる PCB 異性体として PCB153 を用いた。そして、PCB153 を投与したマウスの泌尿生殖洞、ラットにおける記憶学習機能、さらには甲状腺ホルモン代謝作用の違いについて検討した。

(倫理面への配慮)

実験動物の使用に際しては、各研究実施機関における動物実験倫理規定に準拠して実験を行った。

C. 研究方法

C-1. 生殖機能への影響 (主任研究者：遠山千春)

泌尿生殖洞複合体のマイクロアレイ解析：妊娠 14 日目 (GD14) および 17 日目 (GD17) の C57B/6J マウスに TCDD (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、PCB153 (10 mg/kg) または溶媒

対照としてコーン油を投与した。投与 6 時間後と 24 時間目に胎仔を摘出した。雄胎仔から、所定の方法により泌尿生殖洞を摘出した。

泌尿生殖洞組織から RNeasy Micro Kit を用いてトータル RNA を回収した。この RNA の発現レベルは、所定の方法に従い GeneChip Murine Genome U74Av.2 Array と Affymetrix GeneChip オペレーションシステムを用いて、解析した。使用したマイクロアレイは合計 12 枚であり、各ステージおよび各化合物ごとに対照群と曝露群 2 種 (6 時間と 24 時間) で 8 種の比較解析を施した。

C-2. 記憶学習機能への影響 (主任研究者：遠山千春)

Long-Evans 系ラットに、妊娠 5、15 日目あるいは出産後 3 日目の母ラットに対して、2 mg/kg の PCB153 を、単回経口投与した。また、妊娠 5、15 日目および出産後 3 日目の 3 回にわたり、PCB153 をそれぞれ 2 mg/kg 、合計 6 mg/kg 投与した。仔ラットが成熟後 (9-11 週齢)、一定の回数 of レバー押し反応に対して報酬を一つ与えるオペラント課題を課した (20 回目のレバー押し反応に対しエサを提示する、以下 FR20)。1 日 1 セッションを連続して 15 日間行った。FR20 学習課題における曝露影響は、学習基準 (1 セッションで報酬を 43 個 (85%) 以上獲得) に達した動物の数、および報酬獲得率を算出した。

C-3. 甲状腺ホルモン代謝における TCDD 毒性と非 TCDD 毒性 (分担研究者：加藤善久)

C57BL/6 系マウスおよび DBA/2 系マウスに、PCB77(50 mg/kg)、PCB 118 (50 mg/kg)、PCB 153(100 mg/kg) を投与し、経時的に血清中総 T4、遊離 T4、総 T3、甲状腺刺激ホルモン(TSH)濃度、肝ミクロソームの薬物代謝酵素活性および UGT1A の発現量、血清中 PCB の水酸化代謝物濃度、肝臓中 T4 トランスポーター遺伝子の発現量を測定した。さらに、各 PCB 投与後経時的に¹²⁵I]T4 を静脈内投与し、¹²⁵I]T4 の血清クリアランス、胆汁中¹²⁵I]T4 のグルクロン酸抱合体の排泄量、血清中¹²⁵I]T4 と血清タンパクとの結合率、¹²⁵I]T4 の組織分布量(28 組織)を測定した。

C-4. 甲状腺ホルモン代謝と遺伝子の網羅的解析 (主任研究者： 遠山千春)

野生型マウス及び TTR 欠損マウスに、PCB114 または PCB118 を投与して甲状腺ホルモン及びレチノイド代謝の影響を観察し、マイクロアレイ解析を行い、発現に顕著な変動が観察された遺伝子について、リアルタイム RT-PCR による解析を行った。

PCB153 (200 mg/kg) を単回経口投与して、7 日後に血清および肝臓を採取し、甲状腺ホルモン、関連遺伝子の発現解析、免疫組織学的検索を行った。

C-5. 脳内の遺伝子発現と毒性影響評価系の検討 (分担研究者： 前田秀一郎)

妊娠 12.5 日目の C57BL/6N マウスに TCDD (5 µg/kg) を投与し、6 日後、これらマウスの胎仔の脳から RNA を抽出した。両群のマウスの遺伝子発現レベルを DNA マイクロアレイ(CodeLink)で比較

解析し、発現量に差異を認めた遺伝子については、Real-time RT-PCR により再検討した。さらに、差異を確認した遺伝子について、脳切片を用いて、組織レベルでの発現部位、及び発現量を In situ hybridization 法により解析した。

D. 研究結果

D-1. 生殖機能への影響 (主任研究者： 遠山千春)

使用したマイクロアレイ (Murine Genome U74v2 GeneChip, Affymetrix) は、12,488 の遺伝子を搭載している。化合物投与により有意に変動した遺伝子 (-1> Signal Log Ratio > 1) を選別した。その中で、TCDD 曝露により変動したものとしては、CYP1A1, Tiparp, AhRR, Fmo5, PPAR 等の既知のダイオキシン誘導性遺伝子が含まれていた。また、興味深い遺伝子としては、Connexin30, 17β-HSDII, Involcurin, SPRR2A などの発現誘導が検出された。

一方、PCB153 の投与により変動した遺伝子は TCDD に比べると少なかったが、CYP1B1 は TCDD 投与と同様に PCB153 でも有意な誘導が観察され、また、PCB153 特異的に発現抑制される遺伝子として Ret proto-oncogene が見いだされた。

D-2. 記憶学習機能への影響 (主任研究者： 遠山千春)

今回用いた用量の PCB153 によっては、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、毒性影響が検出されなかった。コントロール群では、FR20 開始 1 日目では 8 匹中 4 匹

のラットが学習基準に達しており、5日目には有意な上昇がみられ、7日目以降はすべての動物が学習基準に達した。

他方、GD5曝露群では5日目を過ぎてもスコアが低く、学習基準に達した動物数がコントロール群よりも有意に低い日が観察された。GD15群では後半で上昇傾向がみられたもののコントロール群よりは低く、7日目と13日目は有意に低かった。PND3群では有意な違いは認められず、むしろ開始後4日間はコントロール群よりも高い傾向が見られた。反復曝露群であるGD5+GD15+PND3群では最も顕著な影響が観察されコントロール群よりも有意な低下がみられた。

15日間中の報酬獲得率は、コントロール群と比較してGD5群、GD15群、GD5+GD15+PND3群が有意に低く、PND3群はコントロール群と変わらなかった。またGD15群およびGD5+GD15+PND3群は、GD5群と比較しても有意に低かった。

D-3. 甲状腺ホルモン代謝における TCDD 毒性と非 TCDD 毒性 (分担研究者: 加藤善久)

C57BL/6系およびDBA/2系マウスにPCB77、118、または153を投与すると、血清中総T4および遊離T4濃度はいずれも有意に低下した。血清中総T3濃度は、一方、血清中TSH濃度はいずれのPCBを投与した場合にもほとんど変化しなかった。

肝臓 ethoxyresorufin O-dealkylase (EROD)活性はC57BL/6系マウスでPCB77、PCB118投与により顕著に、また

DBA/2系マウスにPCB77およびPCB153投与によりわずかに増加した。

Pentoxoresorufin O-dealkylase (PROD)活性はC57BL/6系マウスでPCB118、PCB153投与により顕著に、またC57BL/6系マウスでPCB77投与、DBA/2系マウスでPCB153投与によりわずかに増加した。この時、UGT1AおよびUGT1A1の発現量は、C57BL/6系マウスにPCB118、PCB153投与により有意に増加した。一方、DBA/2系マウスでは、それらの発現量はいずれのPCB投与においても増加しなかった。

胆汁中T4のグルクロン酸抱合体の排泄量は、T4投与後120分において、C57BL/6系マウスにPCB77投与では89%、PCB118投与では37%、PCB153投与では213%増加したが、DBA/2系マウスでは、PCB77、CB118を投与した場合にわずかに増加した。

血中からのT4の消失は、C57BL/6系マウスにいずれのPCBを投与したとき、またDBA/2系マウスにPCB77を投与したときに有意に亢進した。

肝臓のT4トランスポーター、L型アミノ酸トランスポーター(LAT1)、有機アニオン輸送ポリペプチド(Oatp1)のmRNAの発現量は、両マウスにいずれのPCBを投与した場合にも変化しなかった。一方、モノカルボン酸トランスポーター(MCT8)のmRNAの発現量は、C57BL/6系マウスにPCB118投与により有意に増加し、DBA/2系マウスにPCB153投与により増加傾向が見られた。

血中T4とトランスサイレチン(TTR)との結合率は、C57BL/6系マウスにPCB153投与、またDBA/2系マウスにPCB118お

よび PCB153 投与では、いずれのタンパクとの結合率にも変化は全く認められなかった。また、C57BL/6 系マウスに各 PCB を投与したときの血清中水酸化代謝物濃度は、3-OH-2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB153 投与) > 4-OH-2,3,3',4',5-pentachlorobiphenyl (PCB118 投与) > 4-OH-3,3',4',5-tetrachlorobiphenyl (PCB77 投与) の順であった。一方、DBA/2 系マウスに各 PCB を投与したときの血清中水酸化代謝物濃度は、4-OH-3,3',4',5-tetrachlorobiphenyl (PCB77 投与) > 4-OH-2,3,3',4',5-pentachlorobiphenyl (PCB118 投与) > 3-OH-2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB153 投与) の順であった。

D-4. 甲状腺ホルモン代謝と遺伝子の網羅的解析 (主任研究者：遠山千春)

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。リアルタイム RT-PCR により特に発現レベルが上昇していた遺伝子は、CYP2B10、および CYP2C55 であった。

PCB114 投与マウスと比較して、PCB118 投与マウスで発現上昇した遺伝子のうち、CYP2B10 および CYP2C55 に差が認められたが、Saa1、CYP1A1、UGT1 は PCB118 と PCB114 との間に差は見られなかった。比較検討のために行った PCB153 投与マウスでは、雌雄共に用量依存的な血清 T4 量の減少が認められ、オイル投与群の約 50% に低下した。TTR 欠損雌マウスにおいては、PCB153 投与による T4 の有

意な低下が認められた。PCB153 投与マウス肝臓における遺伝子の網羅的解析の結果、特に PCB153 投与マウスでは雌雄マウスともに投与量に依存する CYP2B10 および CYP2C55 の発現量増加が認められた。各群共に CYP1A1 遺伝子の発現はほとんど認められなかった。

D-5. 脳内の遺伝子発現と毒性影響評価系の検討 (分担研究者：前田秀一郎)

TCDD 投与により雌雄共に発現量が増加した遺伝子を 7 種、減少した遺伝子を 1 種見出した。また、雄のみで増加した遺伝子を 27 種類、減少した遺伝子を 39 種類、雌のみで増加した遺伝子を 64 種類、減少した遺伝子を 10 種類見出した (1.5 倍以上の増加、または 0.6 倍以下の減少を、変化が見られたものとした)。このうち、CYP1B1 遺伝子と 2 種類のケモカイン遺伝子については、Real-time RT-PCR 法によって DNA マイクロアレイの結果と同様の結果が得られた。雌雄共に発現量の増加が認められたケモカイン遺伝子の胎仔脳における局在を *in situ hybridization* 法で調べた。TCDD 投与群では、脳室周囲、及び脳表面周囲に、より強いシグナルが認められた。

E. 考察

E-1. 生殖機能への影響 (主任研究者：遠山千春)

TCDD 投与によって、泌尿生殖洞において CYP1A1、Tiparp、AhRR、Fmo5、PPAR 等のダイオキシンによって誘導を受ける

ことが知られている遺伝子の誘導が確認された。泌尿生殖洞で誘導される遺伝子として、Connexin30, Involcurin, SPRR2Aなどが検出されが、これら遺伝子は、ギャブジュンクシオン構成タンパクならびに表皮の角質層において多量に発現するタンパクである。Connexinファミリーは皮膚組織に高発現し、細胞間コミュニケーションに必須なチャンネル構成タンパクであり、特にConnexin30の欠損は難聴などの疾患と関連していることが知られている(5)。したがって、このタンパクは高度に分化した組織の細胞の正常な機能に必須と考えられ、このような分子が未分化の雄性生殖器官のに異常に高発現することは、TCDD曝露による組織分化の早期化現象と言えるかもしれない。また、Involcurin, SPRR2Aなども同様に皮膚組織、特に角質層に高度に発現し、ハウスタブの主要構成成分である(6)。このような表皮系組織に特異的な遺伝子が、泌尿生殖洞において誘導されることは興味深い。

一方、PCB153の投与により変動した遺伝子はTCDDに比べると少なかった。CYP1B1はPCB153でも有意な誘導が観察された。また、PCB153特異的に発現抑制される遺伝子としてRet proto-oncogeneが見いだされ、PCB特異的反応が泌尿生殖洞においても発生することが示された。PCB153の用量は生体反応を引き起こすには不十分であったかもしれないが、TCDDとは異なるこのような変動遺伝子はPCBの非ダイオキシン影響の指標として有用となろう。

E-2. 記憶学習機能への影響 (主任研究者：遠山千春)

PCB153の母体曝露により、仔動物における成熟後のオペラント行動に影響が認められ、PCB153の発達期曝露が記憶・学習機能の発達障害を引き起こすことが強く示唆された。

本研究には3つの主要な発見がある。第一に、我々の知る限り、これまで報告された非コプラナーPCB曝露実験よりも遙かに低い曝露量で影響が観察されたことがあげられる。第二に、PCB153の曝露は、出生後の曝露開始では影響が極めて弱く、胎仔期曝露で顕著な影響が観察されたことである。第三に、GD15群における報酬獲得率がGD5群よりも有意に低かったことから、PCB153は特に妊娠後期の曝露に強い影響が現れることが示唆されたことである。すなわち、脳の発達時系列において、胎生後期がPCB153に対する高感受性時期であると考えられる。

昨年度報告したTCDD、PCB126曝露実験では、800 ng/kgのTCDD曝露(妊娠15日目の母動物に単回経口投与)では影響が認められなかったが、8000 ng/kgのPCB126(=800 ng TEQ/kg)では有意な影響が見られたことから、TCDDとPCB126の毒性メカニズムの違いがあることが示唆された。本実験では、PCB153でもラットの学習行動に影響を及ぼすことが明らかとなった。以上の結果を考え合わせると、コプラナーPCBも非コプラナーPCBもTCDDとは異なる毒性すなわち非TCDD様毒性を持つ可能性が極めて高いと考えられる。

E-3. 甲状腺ホルモン代謝における TCDD 毒性と非 TCDD 毒性 (分担研究者: 加藤善久)

TCDD 高感受性 C57BL/6 系マウスおよび TCDD 低感受性 DBA/2 系マウスに、ダイオキシン様 PCB 異性体である PCB77 及び 118 ならびに非 TCDD 様 PCB 153 を投与することによって、これらの PCB 異性体が AhR あるいは CAR を介して作用しているか、その程度について検討した。ミクロソームの EROD および PROD 活性測定の結果から、PCB77 および PCB118 が強力な AhR アゴニストであること、また DBA/2 系マウスは、AhR アゴニストに対して感受性が低いことが確認された。PROD 活性の結果から、PCB118 および PCB153 は、フェノバルピタール(PB)のように CAR に対する親和性が高いこと、また PCB77 もわずかながら CAR と結合し、弱い PB 様作用を有することが示唆された。また、DBA/2 系マウスは、C57BL/6 系マウスに比べ CAR アゴニストに対しても、感受性が低いことが示唆された。上記の異なるタイプの PCB を投与したときの血清中 T4 濃度の低下には、いずれの PCB 投与の場合にも、血中 T4 の肝臓への移行量の増加が大きく寄与していることが示唆された。この移行量の増加には、PCB77 および PCB118 投与では、非 TCDD 様作用である血清中 T4 と TTR との結合阻害が関与している可能性が示唆された。また、PCB118、PCB153 投与では、MCT8 など特定の T4 トランスポーターの関与が考えられる。さらに、PCB118 投与では TCDD 様と非 TCDD 様作用により、

PCB153 投与では非 TCDD 様作用により UGT1A を誘導し、また PCB77 投与では未知因子により、T4 のグルクロン酸抱合体の胆汁排泄量の増加が、血清中 T4 濃度の低下に関与していることが示唆された。

E-4. 甲状腺ホルモン代謝と遺伝子の網羅的解析 (主任研究者: 遠山千春)

昨年度までの本研究結果から、雄の野生型マウスに PCB118 を投与すると血清甲状腺ホルモンおよびレチノール量が著しく減少し、肝臓中レチノイド量も有意に低下することが判明した。この場合、PCB114 は肝臓において CYP1A1 を顕著に誘導するが、PCB118 はほとんど誘導をしないことを組織化学的に明らかにした。本年度の PCB153 を投与した野生型マウスにおいて、用量依存的な T4 レベルの低下が認められた。

昨年度までに、PCB114 または PCB118 を投与したマウス肝臓中の遺伝子の網羅的解析を行い、そのうち、顕著に発現が観察された遺伝子として、のうち、これらの PCB 異性体を投与したマウスの肝臓中の遺伝子の網羅的解析を行い、さらにその本実験結果から PCB118 および PCB153 投与による薬物代謝系酵素の CytochromeP450 系遺伝子 47 種類のなかで、特に Cyp2B10 と CYP2C55 が顕著に発現することわかり、毒性指標として有効であることが分かった。また DNA チップの解析は PCB118 で、TTR 遺伝子が約 1.5 倍に発現増加していることから、PCB118 の水酸化代謝産物の TTR への結合による血中 T4 の減少の推察された。

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、甲状腺ホルモンおよび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-5. 脳内の遺伝子発現と毒性影響評価系の検討 (分担研究者：前田秀一郎)

本研究では、PCB の毒性発現機構を TCDD 類似毒性と非 TCDD 毒性に分類する評価法を確立することを目的に、先ず TCDD への周産期曝露が胎仔脳における遺伝子発現をどう変化させるかを、DNA マイクロアレイ法で網羅的に解析し、2 種類のケモカイン遺伝子の発現量が増加することを明らかにした。

ケモカイン遺伝子群は、主に炎症時の白血球の遊走に関与しているが、最近、ノックアウトマウスを用いた研究により、ケモカイン遺伝子群のうちの一つが、海馬歯状回の形成に必須であることが報告され、脳神経系の形成にも関与していることが示唆されている。これらケモカイン遺伝子群のうち、2 種類の発現量が TCDD 投与により雌雄ともに増加していた。この結果は、胎仔期における TCDD への曝露が、ケモカインを介して脳神経

毒性を惹起する可能性を示唆する。

F. 結論

コプラナーPCB 異性体の持つ非 TCDD 毒性を識別して耐容摂取量の設定の基礎資料を提供するために、TCDD と PCB153 を、それぞれ TCDD 毒性と非 TCDD 毒性のスペクトラムの両端の物質として用い、PCB77、PCB114、PCB118 の各コプラナー PCB を用いて動物実験を行った。

マウス胎仔の泌尿生殖洞における TCDD ならびに PCB153 曝露によって、TCDD 曝露では CYP1A ファミリーや AhRR 等の既知の AhR 依存性誘導遺伝子が多数発現上昇することがわかり、この器官がダイオキシンに高感受性であることが確認された。PCB153 の投与により変動した遺伝子は TCDD に比べると少なく、GD14 投与初期に特異的に変動する遺伝子として、alpha-actin, myosin-light chain, troponin-C 等の筋組織関連遺伝子の発現上昇、Ret proto-oncogene の発現抑制が見いだされた。

発達期のラットの記憶・学習機能への PCB153 の影響を、妊娠あるいは出産後の特定の時期に 2 mg/kg の用量で PCB153 を投与し、仔ラットが成熟後に、レバー付きオペラント箱を使用した学習行動試験により検討した。オペラント学習行動試験では、固定比率(Fixed-Ratio ; FR)強化スケジュールを 15 日間行った。その結果、GD5+GD15+PND3 群、GD15 群、GD5 群で有意な学習低下が認められ、PND3 群では影響が観察されなかった。PCB153 の発達期曝露は学習遂行能力の顕著な低下を

引き起こすこと、またその発達神経毒性は、胎内曝露によって生じること、その作用は甲状腺ホルモン系を介さずに生じる可能性が示唆された。

コプラナー PCB、mono-ortho PCB、non-planar PCB などの異なるタイプの PCB による血清中 T4 濃度の低下は、AhR を介した TCDD 様作用と、それを介さない非 TCDD 様作用が複雑に絡み合って起こることを明らかにした。本研究結果により、PCB による血中甲状腺ホルモン濃度低下作用には AhR を介さない機構が大きく関与していることが示唆された。PCB118 を曝露したマウス肝臓中で変動が観察された遺伝子のうち、AhR を介さない甲状腺ホルモン代謝へ及ぼす影響の指標として CYP2B10 および CYP2C55 が候補となることが分かった。さらに、PCB153 の投与量に依存して血流中 T4 の低下、ならびに肝臓中 CYP2B10 および CYP2C55 遺伝子の顕著な発現上昇が認められた。コプラナー PCB を含む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、さらに AhR を介さない甲状腺ホルモン系への影響の指標として CYP2B10 および CYP2C55 が有力候補となることが示唆された。

さらに、脳内における PCB の毒性発現機構を TCDD 類似毒性と非 TCDD 毒性に分類する評価法を確立するために、まず TCDD の周産期曝露の胎仔脳における遺伝子発現への作用を検討し、炎症性反応に関与するケモカイン遺伝子 2 種の発現量が増加することを明らかにした。

G. 研究発表

1. 論文発表

Nishimura N., Yonemoto J., Nishimura H., Ikushiro S.I., **Tohyama C.**: Disruption of Thyroid Hormone Homeostasis at Weaning of Holtzman Rats by Lactational But Not in Utero Exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin. *Toxicol Sci.* (2005) in press.

Haraguchi K., **Kato Y.**, Koga N. and Degawa M.: Species differences in tissue distribution of catechol and methylsulphonyl metabolites of polychlorinated biphenyls in rats, mice, hamsters, and guinea pigs. *Xenobiotica*, (2005) in press.

Ohta C, Haraguchi K, **Kato Y.** and Koga N.: In vitro metabolism of 2,2',3,4',5,5',6-heptachlorobiphenyl (CB 187) with liver microsomes from rats, hamsters and guinea pigs. *Xenobiotica*, (2005) in press.

Nishimura N., Yonemoto J., Miyabara Y., Fujii-Kuriyama Y., **Tohyama C.**: Altered thyroxin and retinoid metabolic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- p-dioxin in aryl hydrocarbon receptor-null mice. *Arch Toxicol.* (2005) in press.

Nohara K., Pan X., Tsukumo S., Hida A., Ito T., Nagai H., Inouye K., Motohashi H., Yamamoto M., Fujii-Kuriyama Y.,

- Tohyama C.:** Constitutively active aryl hydrocarbon receptor expressed specifically in T-lineage cells causes thymus involution and suppresses the immunization-induced increase in splenocytes. *J Immunol.*, 174, 2770-7 (2005)
- Nagai H., Takei T., **Tohyama C.**, Kubo M., Abe R., Nohara K.: Search for the target genes involved in the suppression of antibody production by TCDD in C57BL/6 mice. *Int Immunopharmacol.*, 5, 331-43 (2005)
- Haraguchi K., Koga N. and **Kato Y.:** Comparative metabolism of polychlorinated biphenyls and tissue distribution of persistent metabolites in rats, hamsters and guinea pigs. *Drug Metab. Dispos.*, 33, 373-380 (2005)
- Mizutani T., Yoshino M., Satake T., Nakagawa M., Ishimura R., **Tohyama C.**, Kokame K., Kangawa K., Miyamoto K.: Identification of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-inducible and -suppressive genes in the rat placenta: induction of interferon-regulated genes with possible inhibitory roles for angiogenesis in the placenta. *Endocr J.*, 51, 569-77 (2004)
- Watanabe H., Suzuki A., Goto M., Ohsako S., **Tohyama C.**, Handa H., Iguchi T.: Comparative uterine gene expression analysis after dioxin and estradiol administration. *J Mol Endocrinol.*, 33, 763-71 (2004)
- Pan X., Inouye K., Ito T., Nagai H., Takeuchi Y., Miyabara Y., **Tohyama C.**, Nohara K.: Evaluation of relative potencies of PCB126 and PCB169 for the immunotoxicities in ovalbumin (OVA)-immunized mice. *Toxicology.*, 204, 51-60 (2004)
- Fukuzawa NH., Ohsako S., Wu Q., Sakaue M., Fujii-Kuriyama Y., Baba T., **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.*, 221, 87-96 (2004)
- Ito T., Tsukumo S., Suzuki N., Motohashi H., Yamamoto M., Fujii-Kuriyama Y., Mimura J., Lin TM., Peterson R.E., **Tohyama C.**, Nohara K.: A constitutively active arylhydrocarbon receptor induces growth inhibition of jurkat T cells through changes in the expression of genes related to apoptosis and cell cycle arrest. *J Biol Chem.*, 279, 25204-10 (2004)
- Haraguchi K., **Kato Y.**, Koga N. and Degawa M.: Metabolism of polychlorinated biphenyls by Gunn rats: Identification and serum retention of catechol metabolites. *Chem. Res. Toxicol.*, 17, 1684-1691

- (2004)
- Kato Y.**, Ikushiro S., Haraguchi K., Yamazaki T., Ito Y., Suzuki H., Kimura R., Yamada S., Inoue T. and Degawa M.: A possible mechanism for decrease in serum thyroxine level by polychlorinated biphenyls in Wistar and Gunn rats. *Toxicol. Sci.*, 81, 309-315 (2004)
- Gauger K.J., **Kato Y.**, Haraguchi K., Lehmler H.J., Robertson L.W., Bansal R. and Zoeller R.T.: Polychlorinated biphenyls (PCBs) exert thyroid hormone-like effects in the fetal rat brain but do not bind to thyroid hormone receptors. *Environ. Health Perspect.*, 112, 516-523 (2004)
- 加藤善久**, 木村良平, 山田静雄, 出川雅邦: PCB 類による甲状腺ホルモンかく乱作用とその作用機構: 動物種差. *環境変異原研究*, 26, 101-106 (2004)
- 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*, 70: 1790-1797, (2004)
2. 学会発表
- Nohara K., Ito T., **Tohyama C.** Activation of arylhydrocarbon receptor(AhR) in T lineage cells inhibits cellular growth. 24th Int.Symp.Halogenated Environ.Org.Pollut.POPs; DIOXIN 2004, Berlin, (2004)
- 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. 活性化 AhR による T 細胞への影響の分子メカニズム. フォーラム 2004: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 千葉. (2004)
- 伊藤智彦, 遠山千春, 野原恵子. 活性化 AhR による T 細胞増殖抑制への XRE の関与. 第 4 回分子予防環境医学研究会, 東京, (2004)
- 長井治子, 遠山千春, 久保允人, 安部良, 野原恵子. TCDD による抗体産生抑制の原因遺伝子の探索. 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸, (2004)
- Sato C, Nohara K, Matsuda T, Kitajima K. Involvement of the disialic acid-containing glycoprotein in mouse T cell activation. 第 77 回日本生化学会大会, 横浜, (2004)
- 野原恵子, 宮本芳美, 栗生佳奈, 伊藤智彦, 遠山千春. 血液リンパ球における Ah レセプター依存性遺伝子発現誘導の動物種差の検討. 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸. (2004)
- 西村典子. 非ダイオキシン様 PCB のリスク評価. 日本リスク研究学会 第 17 回春期講演シンポジウム, 東京. (2004)
- Nishimura N., Yonemoto J, Takeuchi Y, Yokoi

- C, Nishimura H, **Tohyama C.** Effects on thyroid hormone and retinoid metabolism in transthyretin-null mice by polychlorinated biphenyl isomers 118 and 114. 24th Int.Symp.Halogenated Environ.Org.Pollut.POPs; DIOXIN 2004 Berlin. (2004)
- 米元純三, 椎崎一宏, 上地博人, 曾根秀子, 増崎優子, 小泉敦子, 松村徹, 森田昌敏. 母乳中の細胞における CYP1A1 の発現とダイオキシン類濃度. 日本内分泌攪乱化学物質学会 第7回研究発表会, 名古屋. (2004)
- Yonemoto J., Shiizaki K., Uechi H, Sone H, Masuzaki Y., Koizumi A, Matsumura T.(*2), Morita M. (*1Uechi Obstet.Gynecol.Clin,*2Metocean Environ.Inc.). CYP1A1 expression in breast milk cells of Japanese population. 24th Int.Symp.Halogenat.Environ.Org.Pollut.P OPs, Berlin. (2004)
- 掛山正心. 脳の性的発達のための神経毒性試験法. (社)日本化学工業協会第3回 LRI 研究報告会, 東京. (2004)
- 掛山正心, 曾根秀子, 遠山千春. ダイオキシンが脳の性的発達に及ぼす影響. 第3回分子予防環境医学研究会, 東京. (2003)
- Kekeyama M, Sone H, **Tohyama C.** Maternal exposure to dioxin causes central precocious puberty in female rats. 21st International Neurotoxicology Conference, Honolulu. (2004)
- Hojo M, Kekeyama M, Yonemoto J, **Tohyama C.** Perinatal Exposure to Dioxins Perturbs Learning Performance of the Rat in a Dose-specific Fashion. 24th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutant and POPs; DIOXIN2004, Berlin. (2004)
- 川上隆茂, 石村隆太, 椎崎一宏, 遠山千春, 武田健, 大迫誠一郎. C57BL/6J x DBA/2J F2 インタークロスマウスを用いた TCDD 毒性の感受性差に対する AhR 以外の原因遺伝子の探索. 第7回日本外因性内分泌攪乱化学物質学会, 名古屋. (2004)
- 椎崎一宏, 大迫誠一郎, 遠山千春. アリルハイドロカーボン受容体 (AhR) のリガンド非依存的な核移行と転写活性化の動物種差. 第27回日本分子生物学会, 神戸. (2004)
- Ohsako S. Wu Q. Suzuki JS. and **Tohyama C.** Comparison of gene expression by TCDD exposure in the liver of three different mouse strains having an identical AhR genotype. Toxicogenomics International Forum 2004, Kyoto, Japan (2004)
- Ohsako S. Suzuki JS. Wu Q. Takei T. Lin TM. Peterson RE. and **Tohyama C.** Screening by microarray analysis for genes that alter

prostate development in C57BL/6J mice exposed in utero	特に無し
2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. DIOXIN2004, Berlin, Germany (2004)	2.実用新案登録 特に無し
Wu Q. Suzuki JS. Tohyama C. Takei T. Lin TM. Peterson RE. and Ohsako S. TCDD-induced transcriptional profiles in different mouse strains that have an identical AhR genotype. DIOXIN2004, Berlin, Germany (2004)	3.その他 特に無し
Ohsako S. Kubota K. and Tohyama C. Cloning of rat 5 -reductase type 2 gene promoter region and an evidence of no relationship between its transactivation regulation and aryhydrocarbon receptor. 43rdAnn Meeting of Society of Toxicology, Baltimore, USA. (2004)	
Ohsako S. Effects of in utero 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) exposure on the reproductive endpoints of male offspring. Annual Meeting of KSFS, Seoul, Korea .(2004)	
大迫誠一郎, ダイオキシンと生殖発生, 第10回「性と生殖」公開シンポジウム(生殖機能と環境)、東京。(2004)	

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

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

胎仔期前立腺発育異常におけるダイオキシン類曝露と
PCB 曝露の違いに関するマイクロアレイ解析による検討

主任研究者 遠山千春
東京大学大学院医学系研究科 疾患生命工学センター 教授
(前職： 国立環境研究所環境健康研究領域 領域長)

研究要旨

本実験では、この PCB の持つ非ダイオキシン活性の有無を標的器官である泌尿生殖洞に対する影響として、泌尿生殖洞における曝露直後の遺伝子発現変動をマイクロアレイにより解析した。妊娠マウスに TCDD または PCB153 を投与し、曝露 6 または 24 時間後に雄胎仔の泌尿生殖洞における遺伝子発現変動をマイクロアレイ解析した。TCDD 曝露では CYP1A ファミリーや AhRR 等の既知の AhR 依存性誘導遺伝子が多数発現上昇することがわかり、この胎児器官がダイオキシンに高感受性であることが改めてわかった。それ以外に Connexin30, Involucrin, SPRR2A などの表皮系発現タンパクが著しく発現上昇することが見いだされ、未分化の雄性生殖器官の TCDD 曝露による組織分化の早期化現象が示唆された。また、PCB153 特異的に発現抑制される遺伝子として Ret proto-oncogene が検出され、PCB 特異的反応が泌尿生殖洞においても発生することが示された。

研究協力者：

大迫誠一郎、鈴木純子 国立環境研究所環境健康研究領域 主任研究員

A. 研究目的

実験動物において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うち、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) による雄性生殖器官発育への影響は、極めて低用量で起こることから、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 (1)。この現象は確かに胎仔の AhR 遺伝子に完全に依存

しており (2)、その胎仔標的器官である泌尿生殖洞 (Urogenital sinus) は、他組織よりダイオキシン曝露のバイオマーカーである薬物代謝酵素 CYP1A1 や CYP1B1 の誘導が著しい (3)。

このような子宮内曝露実験で、他のダイオキシン類の同族体の影響を調べたところ、ダイオキシン様 PCB であるコプラ

ナーPCB の 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (PCB77) と 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) とでは発育抑制のかかるターゲットの副生殖腺が異なることが報告されている (4)。具体的には、妊娠 15 日目のウイスターラットに TEF を考慮に入れた等価用量として PCB77 (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) および PCB126 (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を単回経口投与した。雄産仔を解析したところ、PCB126 では TCDD 同様、重量減少は前立腺腹葉で有意であり、精囊腺では有意ではなかった。一方、PCB77 では逆に、精囊腺で有意であり、前立腺腹葉では有意ではなかった。この時に同時に測定した一日精子産成量では PCB126 では TCDD 同様対照群との有意差は認められなかったが、PCB77 では対照群に比べると有意な増加が認められた。この観察結果は、生後 65 日目 (PND65) と PND140 とともに統計的有意差を示していることから信頼性の高い結果と考えられる。PCB126 による影響は TCDD と同じく、AhR に完全に依存した影響と判断して良いと考えられるが、PCB77 による影響は、この PCB の AhR 非依存的影響、いわゆる非 TCDD 毒性による可能性が高いと考えられる。この非 TCDD 毒性を特定するためには、TCDD 毒性を有していない、すなわち AhR に対する親和性がない PCB である PCB153 を用いることによる実験結果が有用なデータを提供する可能性がある。

本実験では、この PCB の持つ非ダイオキシン活性の有無を標的器官である泌尿生殖洞に対する影響として、泌尿生殖洞における曝露直後の遺伝子発現変動をマイクロアレイにより解析した。使用した

PCB は 2,2',4,4',5,5' -hexachlorobiphenyl (PCB153) で同時に TCDD 曝露群も設けることで比較対象とした。

B. 研究方法

妊娠 14 日目 (GD14) および 17 日目 (GD17) の C57B/6J マウス (日本クレア) に TCDD (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、PCB153 (10 mg/kg) または溶媒対照としてコーン油を投与した。投与 6 時間後と 24 時間目に頸椎脱臼により致死させ、出血しないよう注意して胸腹部を観察後、卵巣と子宮動静脈および子宮頸部で胎仔の入った子宮角を剖出し、子宮壁と羊膜を切開、臍帯を切除し胎仔を傷つけないように素早く摘出した。リン酸緩衝生理食塩水中にて、下腹部を切開し、壁側および鼠径部に位置する生殖腺の形状から雌雄を判別、雄のみを以下のような手順でさらに解剖して泌尿生殖洞を分離した。識別された雄胎仔下腹部の膀胱原器を固定し、尿道の走行する位置を正中として、その恥骨の左右部位を切断、この状態で、固定された膀胱原器を遊離した骨盤を弾性に剥離すると、膀胱サイドには前立腺原器、精囊腺原器、ウォルフ管を分枝し、かつ尿道へとつながる泌尿生殖洞が存在する。この前立腺原器、精囊腺原器、ウォルフ管および尿道を切除し、さらに膀胱原器との接合部を分断することにより雄胎仔泌尿生殖洞サンプルとした。

上記の泌尿生殖洞組織から RNeasy Micro Kit (QIAGEN 社, Germany) を用いてトータル RNA を回収した。この RNA 量をすべて統一し、オリゴ dT プライマーで逆転写した後、T7 プロモーター配列を

有したプライマーでセンス鎖を合成、ds-cDNA とした。このサンプルからピオチン標識化 RNA を合成、これを GeneChip Murine Genome U74Av.2 Array とハイブリダイズし、蛍光標識を行った。この遺伝子発現パターンを示す蛍光強度を Affymetrix GeneChip オペレーションシステムにより数値化して得たデータ（シグナル値）を用い、遺伝子発現解析を行った。

使用したマイクロアレイは合計 12 枚であり、各ステージおよび各化合物ごとに対照群と曝露群 2 種（6 時間と 24 時間）で 8 種の比較解析を施した。

C. 研究結果

使用したマイクロアレイ（Murine Genome U74v2 GeneChip, Affymetrix）は、12,488 の遺伝子を搭載している。化合物投与により有意に変動した遺伝子（ $-1 \times \text{Signal Log Ratio} > 1$ ）を選別した（表 1）。その中で、TCDD 曝露により変動したもののとしては、CYP1A1, Tiparp, AhRR, Fmo5, PPAR 等の既知のダイオキシン誘導性遺伝子が含まれていた（表 2）。また、興味深い遺伝子としては、Connexin30, 17 β -HSDII, Involcurin, SPRR2A などの発現誘導が検出された。

一方、PCB153 の投与により変動した遺伝子は TCDD に比べると少なかったが、CYP1B1 は TCDD 投与と同様に PCB153 でも有意な誘導が観察され、また、PCB153 特異的に発現抑制される遺伝子として Ret proto-oncogene が見いだされた（表 3）。

D. 考察

TCDD 投与により有意に変動した遺伝子として、CYP1A1, Tiparp, AhRR, Fmo5, PPAR 等の既知のダイオキシン誘導性遺伝子が含まれていたが、これら遺伝子の誘導レベルは、ともに Signal Log Ratio で極めて高値を示しており、泌尿生殖洞が経胎盤曝露においても、極めて感受性の高い組織であることが初めて示された。また、泌尿生殖洞で誘導のかかる遺伝子として、Connexin30, Involcurin, SPRR2A などが検出されが、これら遺伝子は、ギャップ Junction 構成タンパクならびに表皮の角質層において多量に発現するタンパクである。Connexin ファミリーは皮膚組織に高発現し、細胞間コミュニケーションに必須なチャンネル構成タンパクであり、特に Connexin30 の欠損は難聴などの疾患と関連していることが知られている (5)。したがって、このタンパクは高度に分化した組織の細胞の正常な機能に必須と考えられ、このような分子が未分化の雄性生殖器官のに異常に高発現することは、TCDD 曝露による組織分化の早期化現象と言えるかもしれない。また、Involcurin, SPRR2A なども同様に皮膚組織、特に角質層に高度に発現し、ハウスダストの主要構成成分である (6)。このような表皮系組織に特異的な遺伝子が、泌尿生殖洞において誘導されることは興味深い。また、このような遺伝子が発現誘導されると言うことは未分化な泌尿生殖洞の分化レベルの上昇を示しているのかもしれない。

一方、PCB153 の投与により変動した遺伝子は TCDD に比べると少なかったが、

CYP1B1 は TCDD 投与と同様に PCB153 でも有意な誘導が観察された。また、PCB153 特異的に発現抑制される遺伝子として Ret proto-oncogene が見いだされ、PCB 特異的反応が泌尿生殖洞においても発生することが示された。

1998 年 Faqi らはコプラナー PCB の 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (PCB77) と 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) を用い、ラットの胎仔曝露実験を行い、雄産仔の生殖機能をエンドポイントに両者の影響を比較した (4)。その結果、PCB126 では TCDD で報告されている前立腺における重量減少が最も有意な影響であったが (1)、PCB77 では精嚢腺のみで有意な重量減少が観察された。同一 TEQ を使用したにもかかわらず、この精嚢腺重量減少のマグニチュードは PCB126 のそれより大きかった。この結果は PCB77 の持つ非 TCDD として精嚢腺発生が一つの指標であることを示している。精嚢腺も今回我々が用いた泌尿生殖洞より出芽し分化していくため、今回我々の検出したい変動遺伝子の中にはこの現象を説明するものが含まれているかもしれない。

今回用いた PCB153 の用量は生体反応を引き起こすには不十分であったかもしれないが、TCDD とは異なるこのような変動遺伝子は PCB の非ダイオキシン影響の指標として有用となろう。PCB153 の胎仔期投与が産仔の雄性生殖機能にどのように影響するか定かでないが、今回のアレイによる観察結果から TCDD と同様に形態レベルでの観察が必要と考えられた。

E. 結論

マウス胎仔の泌尿生殖洞における TCDD ならびに PCB153 曝露による遺伝子発現変動をマイクロアレイ解析した。TCDD 曝露では CYP1A ファミリーや AhRR 等の既知の AhR 依存性誘導遺伝子が多数発現上昇することがわかり、この胎児器官がダイオキシンに高感受性であることが改めてわかった。それ以外に Connexin30, Involcurin, SPRR2A などが検出され未分化の雄性生殖器官の TCDD 曝露による組織分化の早期化現象が示唆された。また、PCB153 特異的に発現抑制される遺伝子として Ret proto-oncogene が見いだされ、PCB 特異的反応が泌尿生殖洞においても発生することが示された。

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-Para-Dioxin .1. Effects on Androgenic Status. *Toxicol Appl Pharm* 114, 97-107.
- Lin, T. M., Ko, K., Moore, R. W., Simanainen, U., Oberley, T. D., and Peterson, R. E. (2002). 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, 479-487.
- Ohsako S., Suzuki JS., Wu Q., Takei T., Lin TM., Peterson RE., and Tohyama C.