

200401253B

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14年度～16年度 総合研究報告書

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. 総合研究報告

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 (主任研究者 遠山千春)	1
(資料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)	30
(資料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)	48
(資料3) 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)	54
(資料4) 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)	67
(資料5) 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 (主任研究者 遠山千春)	75
(資料6) ダイオキシン類/ポリ塩素化ビフェニル類(PCB77, PCB126, PCB153)の甲状腺ホルモンへの作用メカニズム (主任研究者 遠山千春)	84
(資料7) ダイオキシン類/ポリ塩素化ビフェニル類(PCB77, PCB126, PCB153)のレチノイド代謝への作用メカニズム (主任研究者 遠山千春)	99
(資料8) 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)	117
(資料9) 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(主任研究者 遠山千春)	127
(資料10) 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 (分担研究者 加藤善久)	140

(資料11) コプラナーPCBの免疫系への作用 (主任研究者 遠山千春)	-----151
(資料12) コプラナーPCBとTCDDの毒性発現機構の比較解析(1) (分担研究者:前田秀一郎)	-----164
(資料13) コプラナーPCBとTCDDの毒性発現機構の比較解析(2) (分担研究者:前田秀一郎)	-----170
(資料14) コプラナーPCBとTCDDの毒性発現機構の比較解析(3) (分担研究者:前田秀一郎)	-----180
(資料15) ヒト型AhRノックインマウスの作成とこれを用いたTCDD毒性の解析 (分担研究者:山本雅之)	-----186
(資料16) ダイオキシン/PCBの毒性に関わる遺伝子の網羅的解析法の確立と応用 (分担研究者:宮本 薫)	-----189
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----192
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----197

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

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、ダイオキシン類に対する感受性が異なると想定される様々な系統のマウスやラットに、TCDD、コプラナーPCB(PCB77, PCB114, PCB118, PCB126, PCB169)及び非コプラナーPCB(PCB153)を曝露することによって、生殖機能、記憶学習機能、甲状腺ホルモン・レチノイド代謝、免疫系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。その結果、コプラナーPCBには、非TCDD毒性として取り上げるべき影響が存在すること、AhRを介さないメカニズムによること、これらの影響の発現との間に関係がある遺伝子候補が明らかとなった。

分担研究者

加藤善久	静岡県立大学薬学部	講師
前田秀一郎	山梨大学大学院医工学総合研究部	教授
宮本 薫	福井医科大学	教授
山本雅之	筑波大学TARAセンター	教授

A はじめに

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。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、このダイオキシン類による影響は 2,3,7,8-TCDD (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特異的な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。

H14年度は、ヒト型AhRをノックインしたマウスを作成して、AhRの亜型による感受性の違いを検討した。次に、各種PCB化合物を投与した動物を用いて非2,3,7,8-四塩素化ジベンゾ-p-ジオキシン(TCDD)毒性のうち、甲状腺とレチノイド代謝、ならびに免疫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、脳における特定の遺伝子発現とその局在性、ならびに自家製マイクロアレイをの確立を行った。

H15年度は、TCDD、ならびにコプラナーPCBのうち、3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 126, 1998 WHO TEF=0.1)、2,3,4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 114, TEF=0.0005)

及び 2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 118, TEF=0.0001)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。

H16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

B-1. 雄性生殖系への影響

ダイオキシンおよびその関連化合物の安全基準を決める際の根拠となる動物実験における鋭敏な影響判定指標(endpoint)のひとつは、雄性生殖器の機能への影響である。具体的には、妊娠中に曝露を受けた母親から生まれた仔動物における、精子産生機能低下、前立腺発達遅延、ペニスなど雄性生殖器の発達遅延である。この3年間におけるテーマとして、雄性生殖系については、もともとTCDDに類似の作用を有するコプラナーPCBであるPCB126の Maus 生殖細胞やステロイド合成系への作用メカニズム、前立腺発育の源基である泌尿生殖洞に対する、TCDDならびにPCB153の作用とそれに伴う遺伝子の網羅的解析ならびに特定遺伝子のリアルタイムRT-PCRによる解析を行った。

B-1-1. 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)(資料1)

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 µg/kg 体重の用量で 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 を用いては乳類の精子発生、ステロイド合成に及ぼす影響を検討した。

B-1-2. 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)(資料2)

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

ブ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-1-3. 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) (資料3)

前立腺発育遅延に対する TCDD の作用は、胎仔の AhR 遺伝子に完全に依存しており、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。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 PCB77 と 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。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

PCB153 で同時に TCDD 曝露群も設けることで比較対象とした。

B-2. 高次脳機能への影響

発達期の TCDD 曝露が出生後のラットの学習機能に影響することが報告され、疫学調査でもダイオキシン、同時に曝露を受ける PCB 類がヒトの高次脳機能に影響することも示唆されている。1997年には、それまで考えられていたよりも大量の AhR が脳において発現していることも報告され、TCDD による発達神経毒性が懸念され、近年の PCB に関する研究では、五塩素化及び六塩素化 PCB が急性的に神経情報伝達をかく乱することから、PCB 独自の非ダイオキシン様作用が存在する可能性も指摘されるようになってきた。

しかしながら、脳機能そのものに未知の部分が多いため、ダイオキシン類による発達神経毒性の検証も困難を極めている。1998年 (平成10年) の WHO、翌年の我が国の TDI 算定における動物実験の LOAEL は、サルにおける学習テスト成績低下 (生体負荷量: 28-39 ng TEQ/kg) であったが、実験の信頼性の面からこの数値は使用されていない。その後、低用量曝露による影響を示す報告が発表されており、毒性メカニズムの解明が待たれるところである。

本研究においては、ラットのオペラント学習行動試験を用い、TCDD、ダイオキシン様 PCB である PCB126、非ダイオキシン様 PCB である PCB153 の発達神経毒性を比較検討することで、高次脳機能における TCDD、PCB の低用量曝露によるダイオキシン様作用と非ダイオキシン様作用の有無と特性を明らかにすることを試みた。

B-2-1. 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) (資料4)

TCDD だけでなく、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。

B-2-2. 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 (主任研究者 遠山千春)(資料5)

本実験では、TEFを付与されていない非コプラナーPCBであるPCB153を用いることでPCB独自の発達神経毒性について検証し、PCBによる非TCDD様毒性の存在を明らかにすることを試みた。PCB153を母体曝露し、生まれた仔ラットに対してオペラント学習行動試験法を用いて記憶・学習機能を調べた。同時に、曝露高感受性時期の特定も行った。

B-3. 甲状腺ホルモン・レチノイド代謝への影響

PCBには、甲状腺ホルモンを低下させ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。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り、本研究を行った。

B-3-1. ダイオキシン類/ポリ塩素化ビフェニル類(PCB77, PCB126, PCB153)の甲状腺ホルモンへの作用メカニズム (主任研究者 遠山千春)(資料6)

ここでは、TCDDの甲状腺ホルモン抑制作用のメカニズムを確認するために Ah レセプターノックアウトマウスを、ダイオキシン類の甲状腺ホルモン抑制作用におけるトランスサイレチン(TTR)の関与を TTR ノックアウトマ

ウスを用いて検討した。

B-3-2. ダイオキシン類/ポリ塩素化ビフェニル類(PCB77, PCB126, PCB153)のレチノイド代謝への作用メカニズム (主任研究者 遠山千春)(資料7)

PCB 中毒の皮膚症状がレチノイドの欠乏症のそれと類似しており、PCBが肝臓中のレチノイド濃度を低下させることが報告されている。レチノイド濃度の低下に、血清中レチノールの輸送蛋白質である Transthyretin (TTR) に対して、PCB およびその代謝産物が競合的に結合することが推定されている。また、TCDD はレチノイド代謝を攪乱する作用があり、また AhR 欠損マウスでは肝臓内にレチノイドが貯留する事が報告されている。本実験では TCDD のレチノイドに対する作用機構を解明するために AhR および TTR 欠損マウスを用いて TCDD 投与実験を行った。さらに、PCB77、PCB126、PCB153 を投与した TTR 欠損マウスにおけるレチノイド代謝に及ぼす影響と、TCDD 投与による毒性作用とそのメカニズムについて比較検討した。

B-3-3. 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)(資料8)

本研究では、B-3-2 に引き続き、コプラナーPCB である PCB118 または PCB114 を投与した野生型マウスおよび 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-3-4. コプラナーPCB(PCB118, PCB114)の、ならびに遺伝子発現に及ぼす影響の比較検討 (主任研究者 遠山千春)(資料9)

本実験では、B-3-3 の実験に引き続き、網羅的遺伝子解析のデータに基づき、特定の遺伝子発現レベルを解析して毒性指標の可能性を探索した。さらに PCB153 投与マウスにおける甲状腺ホルモンへの影響と肝臓における発現遺伝子の変化を調べて比較検討した。

B-3-5. 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 (分担研究者 加藤善久) (資料10)

PCB77, PCB118, PCB153 を成獣マウスに投与することにより、これらの PCB 異性体による血中 T₄ 濃度低下作用メカニズムを、AhR を介した TCDD 様作用と、それを介さない非 TCDD とに分けて解明することを目的とした。その際に、血中 T₄ の肝臓への移行量、移行量の増加に関係する血中 T₄ とトランスサイレチン(TTR)との結合、T₄ トランスポーターであるモノカルボン酸トランスポーター(MCT8)などに着目して検討した。

B-4. 免疫機能への影響

B-4-1. コプラナーPCBの免疫系への作用 (主任研究者 遠山千春) (資料11)

PCB 類の免疫系への作用はその AhR 活性化能と正の相関を示し、TCDD の毒性を 1 とした場合の TEF が高いほど免疫系に対する作用が強いことが報告されている。コプラナー PCB の PCB126 (TEF=0.1) と 3,3',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB169, TEF=0.01) は PCB 類の中で高い相対毒性強度 (REP) を付与され、免疫系への作用が強いことが報告されている。特に PCB169 については、T 細胞非依存性抗原である TNP 抗原に対する抗体産生能を指標とした場合には、その REP が数十倍大きい。我々は、T 細胞依存性抗原であるタンパク (卵白アルブミン、OVA) に対する抗体反応において、TCDD が抗体産生において重要な働きをする T 細胞由来のサイトカイン産生を顕著に抑制することを明らかにした。しかし、PCB169 をはじめとするコプラナー PCB の T 細胞依存性抗原に対する IgG 抗体産生反応については十分な検討が行われていない。そこで、PCB169 の T 細胞依存性抗原に対する抗体産生反応への影響について TCDD の影響と比較し、その TEF の検討、および PCB169 の非ダイオキシン様の作用について検討した。

B-5. 脳における TCDD と PCB の毒性評価実験モデルの検討 (分担研究者: 前田秀一郎)

ダイオキシン類と PCB 類への胎児期およ

び小児期における曝露は、小児の学習記憶機能に影響する可能性が示唆されており、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。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。本研究においては、脳における TCDD と PCB の毒性機構を評価するためのモデル実験系を作成することを目的として、検討を行った。

B-5-1. コプラナーPCBとTCDDの毒性発現機構の比較解析(1) (資料12)

本研究では、TCDD の脳への毒性メカニズムを検討し、それが PCB の脳への影響と、どのような異同を示すかを明らかにする。まず、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、非投与妊娠マウス体内の胎仔脳の mRNA 量や種類とディファレンシャルディスプレイ (DD) 法で比較解析し、差異のある cDNA クローンを単離し、その構造や発現を解析した。

B-5-2. コプラナーPCBとTCDDの毒性発現機構の比較解析(2) (資料13)

本研究では、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、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。また、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。

B-5-3 PCBとTCDDの毒性発現機構の比較解析(3) (資料14)

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、昨年度に引き続き、DNA マイクロアレイ法で網羅的に解析し、発現量が増加、あるいは減少する遺伝子群につき解析を進め、Real-time RT-PCR 法、および in situ hybridization により解析した。

B-6. ダイオキシン及び PCB の毒性評価手法の開発

B-6-1. ヒト型 AhR ノックインマウスの作成とこれを用いた TCDD 毒性の解析 (分担研究者: 山本雅之) (資料15)

ダイオキシン受容体 (AhR) は細胞質に存在しており、ダイオキシン類は芳香族炭化水素をリガンドとして結合すると核へ移行し、CYP1A1 や CYP1A2 などの標的遺伝子の転写を活性化する。AhR のダイオキシンに対する親和性は、動物種や系統により異なっていることが知られており、ヒト型 AhR はマウス DBA/2 の AhR と同様にリガンドに対する親和性が低い。このことから、ヒトにおけるダイオキシン類の毒性発現の閾値は高いことが予想されているが、実際にヒトに対して曝露実験を行うことは不可能なので適切な動物モデルの確立が望まれている。本課題においては、AhR の親和性が個体の反応性をどのように規定するか、また、ヒト AhR の反応特異性が低親和性型のマウス DBA/2 型 AhR のそれとどのように異なるのかを明らかにし、ヒトの反応性を検討するための適切な動物モデルを確立するために、ヒト型 AhR をマウス AhR 遺伝子座にノックインしたマウスを作製し化学物質に対するその反応性を検討した。

B-6-2. ダイオキシン/PCB の毒性に関わる遺伝子の網羅的解析法の確立と応用 (分担研究者: 宮本 薫) (資料16)

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を行うためには、まずフォワードトキシコロジーの観点から、個体レベルの実験をもとにダイオキシン毒性の詳細を明らかにし、次にこの毒性メカニズムの分子基盤を解明する手段として、リバーストキシコロジーの観点から、遺伝子の網羅的解析を試みる。そのため、今年度は、インハウスのマイクロアレイを確立し、TCDD 投与のラット胎盤における遺伝子発現の変化を明らかにすることを目的としている。

C. 研究方法

C-1. 雄性生殖系への影響

C-1-1. 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。この精巣中の BrdU-陽性の生殖細胞とセルトリ細胞数を免疫組織化学的に検出し計測した。アポトーシスを In-Situ 細胞死検出キットおよび TUNEL 試薬で検出した。

培養精巣由来の全 RNA を調製し、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-1-2. 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 μ g/kg の用量で経口投与し、24 時間後に胎仔を摘出した。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。SRY 遺伝子の PCR 解析により性判定を行った。各群 5 個体分の一定量の RNA サンプルを混合し、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 サンプルから Cy3 ラベル標識 cDNA プローブを作成し、マイクロアレイ (Atlas Glass Array Mouse 3.8 I, CLONTECH) を用いて

解析した。

C-1-3. 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 µg/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对照群と曝露群 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

C-2-1 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、体重を制御した。

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 種類を組み合わせた、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。

C-2-2. 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 (主任研究者 遠山千春)

妊娠 Long-Evans ラットに、妊娠 5、15 日目あるいは出産後 3 日目 (妊娠 25 日目に相当) の時点で 2 mg/kg の PCB153 を (GD5, GD 15, PND 3 群) を、また各日 1 回の計 3 回にわたり、合計 6 mg/kg を (GD5+GD15+PND3 群)、そしてコントロール群として各日 3 回コーンオイルを経口投与した。仔動物に対し、生後 7 または 8 週目から実験終了まで給餌制限を行い、体重を制御した。

各腹の雄仔動物 1 匹を用い、オペラント行動試験を行った。学習課題として、FR20 (Fixed Ratio, 定率強化 20 回) 課題を選択した (20 回目のレバー押し反応に対してエサを提示する)。1 日 1 セッションを連続して 15 日間行った。

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。FR20 課題における影響は、各セッション毎に学習基準 (30 分以内に 43 個以上の報酬を獲得) に達した動物数 (%)、全 15 日間における報酬獲得数 (%) を算出して解析した。

C-3. 甲状腺ホルモン・レチノイド代謝への影響

C-3-1. ダイオキシン類/ポリ塩素化ビフェニル類の甲状腺ホルモンへの作用メカニズム (主任研究者 遠山千春)

TTR 欠損マウスを用いて TCDD および PCB 同族体の曝露にともなう T4 低下へ

の TTR の関与について検討した。13 週齢の雌の野生型マウス、および TTR 欠損マウスに、PCB77 (50, 75 mg/kg 体重)、PCB126 (1 mg/kg 体重)、PCB153 (200 mg/kg) および TCDD (10, 20 µg/kg 体重) を単回経口投与して、7 日後に血清および肝臓・胸腺を採取し、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-3-2. ダイオキシン類/ポリ塩素化ビフェニル類のレチノイド代謝への影響 (主任研究者: 遠山千春)

今年度は、13 週齢の雌の野生型マウス、および TTR 欠損マウスに、PCB77 (50, 75 mg/kg 体重)、PCB126 (1 mg/kg 体重)、PCB153 (200 mg/kg) および TCDD (10, 20 µg/kg 体重) を単回経口投与して、7 日後に血清および肝臓・胸腺を採取し、TCDD および PCB 同族体の retinoid 代謝への影響に対する TTR の関与について検討した。さらに、同マウスを用いてレチノイド代謝への影響を調べた。体内の vitamin A の 80% 以上が肝臓に存在し、主として脂肪酸エステル (retinyl esters) の形で貯蔵されていて、retinyl esters はパルミチン酸エステル (retinyl palmitate) が最も多いことが分かった。本研究では retinol、retinyl palmitate とその他の retinyl esters のうち主要な 7 種を測定し、これらの合計を total retinoid とした。

C-3-3. 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 体重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-3-4. 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-3-4. 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)、PCB118 (50 mg/kg)、PCB153 (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. 免疫機能への機能

C-4-1. コプラナーPCB の免疫系への作用 (主任研究者 遠山千春)

PCB169 または TCDD を、6 週齢の

C57BL/6J 雌性マウスに単回経口投与し、直後に OVA/alum (100 µg/マウス)を腹腔内注射した。投与後、4 日および 10 日後にエーテル麻酔下でマウスを解剖し、脾臓と胸腺を摘出した。調製した細胞浮遊液中リンパ球サブpopulationをフローサイトメーターにより解析した。血漿中の抗 OVA 特異的抗体価を ELISA 法により測定した。肝臓及び脾臓から RNA を精製し、DNA を合成した。CYP1A1 及び GAPDH の発現レベルは、リアルタイム PCR により定量した。

C-5. 脳における毒性影響メカニズムの検討

C-5-1. PCBとTCDDの脳の発達への影響の比較解析 (分担研究者:前田秀一郎)

TCDD (5 µg/kg体重)を妊娠 12.5 日目の C57BL/6J マウスに投与し、18.5日後の胎仔脳の mRNA の量や種類を、対照の胎生 18.5 日目の胎仔脳の mRNA の量や種類とディフュージョンディスプレイ(DD)法で比較解析した。胎仔と新生仔の脳の切片を作成し、Sfrp2 の mRNA の組織局在性を *in situ* hybridizationにより検討した。

C-5-2. 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-5-3. 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。

C-6. ダイオキシン及びPCBの毒性評価手法の開発

C-6-1. ヒト型AhRノックインマウスの作成とこれを用いたTCDD毒性の解析 (分担研究者:山本雅之)

マウス AhR 遺伝子座に、hAhR cDNA を挿入することにより、マウス AhR 遺伝子を破壊すると同時に、マウス AhR 遺伝子のプロモーターの制御下で hAhR cDNA が転写されるように、ターゲティングベクターをデザインした。得られたマウスは、野生型 C57BL6 マウスへ戻し交配し、コンジェニック化を図った。C57BL6 に純系化された hAhR ノックインマウス(hAhR マウス)、野生型 C57BL6 マウス(AhR^{b1}マウス)、C57BL6 の遺伝的背景に AhR^d を有するコンジェニックマウス(AhR^d マウス) の 3 系統を用いた。3-メチルコラントレン (3-MC) と 2,3,7,8-TCDD 投与に対する肝臓での CYP1A1, CYP1A2 の発現誘導を RNA プロット解析により調べた。次に胎齢 12.5 日の時点で母体に TCDD を投与し、胎齢 18.5 日で胎児を解析し、口蓋裂の発生頻度と水腎症の発生頻度と重症度を形態学的に調べた。

C-6-2. ダイオキシン/PCBの毒性に関わる

遺伝子の網羅的解析法の確立と応用 (分担研究者:宮本 薫)

妊娠15日目にTCDD 1600ng/kgを投与したホルツマン系雌ラットとコントロールラットの胎盤を妊娠20日目に採取し、mRNAを抽出後、cDNAに変換した。TCDD投与とコントロールのcDNA同士の差し引きを行い、サブトラクション cDNA ライブラリーを作製した。このライブラリーから誘導性および抑制性遺伝子クローンをそれぞれ単離し、塩基配列を解析することで同定を行った。また、サブトラクションクローニングにより作製したcDNAを蛍光色素 Cy3、Cy5 で標識したものをプローブとして用い、市販のcDNA マイクロアレイとハイブリザイズさせることで、高感度のマイクロアレイスクリーニングシステムを開発した。このシステムを用いて、誘導性および抑制性遺伝子クローンの網羅的解析を行った。

D. 研究結果

D-1. 雄性生殖系への影響

D-1-1. 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-1-1. 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-1-1. 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. 学習記憶機能への影響（主任研究者：遠山千春）

D-2-1. 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）

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。

D-2-1. 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（主任研究者 遠山千春）

胎仔期における PCB153 の曝露により、成熟後の仔動物におけるオペラント行動試験の成績に影響が観察された。すなわち、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、後半のうち3日間、観察された（10, 11 および 13 日目） ($p < 0.05$)。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 ($p < 0.05$)。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、後半のうち9日間（7-14 日目）でコントロール群よりも有意な低下がみられた ($p < 0.05$)。

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 ($p < 0.01$)、PND3 群はコントロール群と変わらなかった ($p = 0.886$)。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 ($p < 0.01$)。

D-3. 甲状腺ホルモン・レチノイド代謝への影響

D-3-1. ダイオキシン類/ポリ塩素化ビフェニル類の甲状腺ホルモンへの作用メカニズム（主任研究者 遠山千春）

TCDD や PCB126 投与群では TTR 野生型マウス、TTR 欠損マウスともに肝臓の CYP1A1、CYP1A2、UGT1A6 mRNA の誘導が見られたが、PCB77 と PCB153 投与群ではこれら AhR 応答遺伝子の誘導が見られなかった。CYP1A1 免疫染色の結果は RT-PCR の結果と一致した。すなわち、AhR が TTR 欠損マウスにおいて野生型と同様に働いていることを確認した。

Vehicle 対照群では TTR 欠損マウスの血清 total T4 (TT4) レベルは、野生型マウスの約 50%であった。血清 TT4 濃度は野生型マウスでは TCDD、および いずれの PCB 投与群においても、対照群に比べて有意に低

下し、特に PCB77 投与群の低下は他の投与群に比べて大きかった。TTR 欠損マウスの血清 TT4 濃度が TCDD 投与群で対照群の約 10%まで低下していたのに対し、PCB77 と PCB153 投与群は約 70%までしか低下しなかった。

D-3-2. ダイオキシン類/ポリ塩素化ビフェニル類のレチノイド代謝への作用メカニズム (主任研究者:遠山千春)

TCDD のレチノイド代謝攪乱作用が、AhR を介するか否かを調べるために、周産期に TCDD に曝露した AhR 遺伝子欠損マウス (AhR^{-/-})、AhR ヘテロ型マウス (+/-) およびその野生型マウス (AhR^{+/+}) を用いて検討した結果、TCDD は AhR を介して肝臓レチノイド量を低下させることが明らかになった。

TCDD のレチノイド代謝攪乱作用に対して、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 TCDD 投与実験を行った結果、TCDD のレチノイド代謝攪乱作用に対する TTR の関与は認められなかった。

PCB77、PCB126 および PCB153 は肝臓レチノイド代謝に対して影響を及ぼすか、また、影響がある場合はその攪乱作用に 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、PCB77、PCB126 および PCB153 の投与実験を行った。その結果、PCB77 は血清中 Retinol 量を低下させ、その作用について TTR の関与が認められた。PCB126 は肝臓中レチノイド量を著しく低下したが、その作用に TTR の関与は見られなかった。

D-3-3. 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。PBC114 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 T4 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-3-4. 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-3-5. 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、PCB118 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 (CB118 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. 免疫機能への影響

D-4-1. コプラナー PCB の免疫系への作用 (主任研究者 遠山千春)

TCDD 20 μ g/kg の一回経口投与で IgG1 産生の抑制や、T 細胞からの IL-5 産生の抑制が見られるのに対して、2 mg/kg または 5 mg/kg の PCB169 一回経口投与ではどちらも抑制されなかった。AhR 依存的に誘導される CYP1A1 mRNA の発現量を調べると、TCDD (20 μ g/kg) と PCB169 (5 mg/kg) の投与で、肝臓では同程度の CYP1A1 の誘導が見られるものの、脾臓では PCB169 による誘導は TCDD に比べてかなり弱いことが明らかとなった。

D-5. 脳における作用メカニズム

D-5-1. PCB と TCDD の脳の発達への影響の比較解析 (分担研究者: 前田秀一郎)

TCDD (5 µg/kg 体重)を妊娠 12.5 日目の C57BL/6J マウスに投与し、18.5 日後の胎仔脳の mRNA の量や種類を、対照の胎生 18.5 日目の胎仔脳の mRNA の量や種類とディファレンシャルディスプレイ(DD)法で比較解析したところ、Wnt シグナル伝達系の調節に関与する secreted frizzled-related protein 2(SFRP2)mRNA 量が、TCDD 投与により脳で約2倍に増加することを見出した。そこで胎仔脳を、*in situ* ハイブリダイゼーション法により解析した。その結果、第三脳室周辺の SFRP2 mRNA が、投与群では非投与群と異なり、非対称的に局在することを見出した。さらに、SFRP1とSFRP3 mRNA 量が約3倍に増加していた。そこで、Wnt シグナル伝達系の標的遺伝子の発現変化を調べたところ、c-MYC mRNA 量が非投与群に比べ投与群において増加していた。

D-5-2. 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 Hepalclc7 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、Hepalclc7 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トティング、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-5-3. 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 投与により雄雌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。雄雌共に発現量の増加が認められたケモカインα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。

D-6. ダイオキシン及び、PCB の毒性評価手法の開発

D-6-1. ヒト型AhRノックインマウスの作成と

これを用いたTCDD毒性の解析（分担研究者：山本雅之）

ヒト型ノックインマウスホモ接合体は、3-メチルコラントレンに対して、著しい反応の減弱を示した。肝臓で AhR の標的遺伝子である CYP1A1 や CYP1A2 の誘導を調べたところ、ヒト型 AhR ノックインマウスでは、低親和性 AhR を有するマウス DBA/2 と同程度の弱い誘導しか観察されなかった。また、TCDD による催奇形性について検討するために、妊娠マウスにダイオキシン投与を行った。ヒト型 AhR ノックインマウスでは、高感受性のマウス C57BL6 に比べて、奇形の発生が著明に抑制されていた。口蓋裂は、C57BL6 では全例に観察されたのに対して、ヒト型 AhR ノックインマウスでは、全く観察されなかった。水腎症については、重症度も発生頻度もヒト型 AhR ノックインマウスの方が低下していた。

D-6-1. ダイオキシン/PCBの毒性に関わる遺伝子の網羅的解析法の確立と応用（分担研究者：宮本 薫）

TCDD 誘導性候補遺伝子として約 50 種類、抑制性候補遺伝子として約 10 種類の遺伝子を同定した。これらの中には、グルコーストランスポーターやアポリポプロテイン、トランスフェリンなどが含まれ、グルコース代謝や脂質、鉄分の輸送など幅広い範囲でダイオキシンの影響が生じていることが確認された。

E. 考察

E-1. 雄性生殖系への影響

E-1-1. 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必要がある。

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 P450sc 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-1-2. 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-1-3. 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、これら遺伝子は、ギャップジュンクショ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。

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. 学習記憶機能への影響

E-2-1. 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。

E-2-2. 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 (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。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・レチノイド代謝への影

響

E-3-1. ダイオキシン類/ポリ塩素化ビフェニル類の甲状腺ホルモンへの作用メカニズム (主任研究者 遠山千春)

TCDD、PCB126投与による血清TT4の低下はAhRを介した影響であると考えられた。PCB77投与によるT4の低下は、TTR野生型マウスで血清TT4が他の投与群に比べてより低下したのに対し、TTR(-/-)マウスでは低下する割合が小さく、AhR応答遺伝子の誘導も見られなかったことから、TTRの一部関与が考えられた。PCB153投与によるT4の低下はPCB77に比べて小さく、PCB77とは異なるメカニズムが示唆された。

ダイオキシン類およびポリ塩素化ビフェニル類の毒性は、AhRとの親和性やAhRを介した酵素の誘導能などに主に基づくTEFを指標として評価がなされてきた。本実験結果によりコプラナーPCBの中でも、甲状腺への影響に対する毒性機構がAhRを介する場合と、AhRには関係なくTTRが関与する場合があることが明らかになった。ダイオキシン類およびポリ塩素化ビフェニル類の甲状腺機能に関する毒性評価に今後はTEF以外の新たな指標が必要と考えられた。

E-3-2. ダイオキシン類/ポリ塩素化ビフェニル類のレチノイド代謝への作用メカニズム (主任研究者:遠山千春)

TTR欠損マウスの血清中retinol量は、野生型マウスに比べて有意に低かった。これはTTRに結合していないretinolとRBP(retinol binding protein)の結合体の分子量が小さい(およそ2万ドルトン)のために腎臓で糸球体から濾過されることによるものと考えられた。TCDDおよびPCB126投与群ではTTRの有無に関わらず、肝臓retinoid量は対照群に比べて有意に低下したが、これは主としてAhRを介した影響であると考えられた。PCB77およびPCB153投与群の肝臓retinoid量においてはTTRの有無に関わらず減少の傾向が見られ、野生型よりもTTR欠損マウスの方が、減少量が大きかったことから、肝臓retinoid量の減少に関してはTTRとAhR以外の要因が示唆された。またPCB77投与群の野生型マウスで血清中retinolの有意な低下が認められたのに対し、TTR欠損マウスでは有意差が認められなかったことから、PCB77による血清中retinolの