

低下には TTR が関与していることが分かった。

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 を介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 PCB 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る。

E-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)

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

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

TTR の血中および肝臓中レチノイド代謝への関与について調べたところ、PCB118 投与群にのみ野生型マウス血清中のレチノール量の有意な減少を認めたことから、PCB118 による血清中レチノール量の減少には、TTR が関与することが明らかとなった。PCB118 は生体内で比較的水酸化されやすいことが報告されていることから、おそらくその水酸化代謝物が血中 TTR と結合してレチノールの尿中排泄増加につながり、血中レチノール量の減少が起こることが考えられ

た。

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

E-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。

E-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)

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、フェノバルビタール(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. 免疫機能への影響

E-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)

胸腺はT細胞が分化、成熟する重要な器官であり、20 µg/kg TCDDの投与でC57BL/6J雌性マウスに胸腺重量と細胞数の減少が認められた。胸腺内の未熟なCD4+CD8+細胞の減少と成熟したCD8+ T細胞の増加が認められた。それに対してPCB169曝露群は、対照群と有意な変化を認めず、PCB169の胸腺に対する毒性はTEF0.01より低いと考えられた。

脾臓では曝露10日目に対照群と比べて、TCDD曝露マウスで脾臓重量と細胞数の減少、脾臓中のT細胞とB細胞の減少を認めた。一方、PCB169 2.0 mg/kg、5.0 mg/kgい

ずれの曝露群においても、脾臓重量の減少を認めたが、細胞数の減少やT細胞、B細胞の有意な変化は認められなかったため、PCB169はTCDDより脾臓細胞に対する影響が弱いと考えられた。

TCDDによるAhR活性化の指標として用いられるCYP1A1の誘導に関して、肝臓では、PCB169曝露群でもTCDDと同様のメッセンジャーRNAの発現が認められたのに対して、脾臓でのCYP1A1発現の誘導はTCDDよりかなり弱いことが明らかとなった。このことは、上記のPCB169群の脾臓細胞や抗体産生能への影響がTEF0.01より弱いことの原因が、脾臓でのAhR依存的な遺伝子発現能が弱いことによるものであることを示唆した。これらの差は、TCDDとPCB169の代謝や組織分布の違いに起因する可能性が考えられ、今後検討が必要である。また今回の研究では、PCB169曝露によって、胸腺細胞や脾臓細胞のポピュレーションの変化等にもPCB169曝露により特有の変化は認められず、非ダイオキシン様の作用については明らかにならなかった。

E-5. 脳における作用メカニズム

E-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)

妊娠12.5日目のC57BL/6JマウスにTCDDを投与すると、胎生18.5日目の胎仔脳の第三脳室周辺において、Wntシグナル伝達系の調節に関与するSFRP2 mRNAの局在が、非曝露群と異なり、非対称的に局在することを見出した。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。しかし、TCDD投与により、特定遺伝子のmRNAの量と局在が変化することは、これまでに見出されていない。本知見は、TCDDによる脳神経毒性惹起機構を分子レベルで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。

E-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)

海馬が関与する学習行動であるcontextual fear conditioningには著明な雌雄

差があり、周産期の TCDD への曝露により、この雌雄差が消失することを見出した。さらに、学習後の海馬 CA1 領域の p-CREB-ir cell の割合が、雄では雌に対して増加していた。雄の TCDD 投与群では非投与群に対して海馬 CA1 領域の p-CREB-ir cell の割合が有意に減少しており、この結果から contextual fear conditioning の行動上の変化と、海馬 CA1 領域の CREB の活性化の変化が相関することが示された。既に、妊娠ラットへの TCDD 投与が胎仔脳の形態や成長後の行動に影響することが報告されているが、本研究では、TCDD 投与による成長後の学習行動の変化と、海馬 CA1 領域の CREB の活性化の変化が相関することが示された点で、TCDD による脳神経毒性惹起の分子機構を理解するための重要な手がかりとなるかもしれない。

TCDDへの周産期曝露による胎仔の脳内遺伝子発現変化を、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などに役立つだけでなく、バイオマーカーとして、根拠のあるTCDDのリスクアセスメントにも貢献し得ると考えられる。今後、PCB曝露影響との比較をすることにより、PCBの脳毒性発現機構をTCDD類似毒性発現機構と非TCDD毒性発現機構に分類し得るだろう。

E-5-2. 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。

E-6. ダイオキシン及び PCB の毒性評価手法の開発

E-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 AhR ノックインマウスは、C57BL6 に比べて反応性が低いということが示され、AhR の親和性が個体の反応性を規定していることが明らかになった。反応特異性については、今後、様々な化学物質の曝露実験を行うことにより、ヒト型 AhR とマウス低親和性 DBA/2 との比較を中心に、検討していく予定である。これにより、ヒト型 AhR ノックインマウスのモニター動物としての有用性の評価も可能になるものと期待される。

E-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)

今回報告したサブトラクションクローニングによる遺伝子の網羅的解析法により、ラット胎盤で TCDD によって誘導もしくは抑制される遺伝子群を多数同定した。この方法の特色は、比較的発現量の少ない遺伝子群でも同定することが可能である点と、未知の遺伝子群をピックアップできる点である。本研究でも数種類の未知遺伝子があることが判明した。これまでの解析により、グルコーストランスポーター2を同定した。

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 を比較検討群として用いて、PCB77、PCB114、PCB118 を用いて動物実験を行った。コプラナーPCB 異性体の用量は、TEQ 値としてほぼ TCDD と同等の用量を用いた。

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。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, myosinlight 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。

記憶学習機能及び甲状腺ホルモン代謝のうち、甲状腺ホルモンの代謝に対して、PCB118やPCB77がAhRを介さずに働いていることを示唆するデータが得られた。また、非コプラナーPCBのPCB153は、泌尿器複合体の発育、記憶学習機能、甲状腺ホルモン代謝に特有の作用を示すことが示唆された。PCB126にも、非コプラナー毒性がある可能性が、精巣培養系や記憶学習機能への作用から推測された。

学習行動影響についての検証では、TCDDあるいはPCB126それぞれの発達期曝露が、成熟後の記憶・学習機能に影響を及ぼすことを確認した。TCDDのオペラント行動に対する毒性は曝露用量依存性ではなく、逆U字パターンの用量特異的な影響としてあらわれた。PCB126の毒性にも用量依存関係は見られず、TEFと同様か若干低めの値を示唆するTCDD様毒性を示した。さらに最高用量曝露群では、PCB126はTCDDよりも強い毒性も示したことから、PCB126の非TCDD毒性の存在も示唆された。

非コプラナーPCBであるPCB153の発達期曝露が、成熟後の記憶・学習機能に影響を及ぼすことを確認した。出生後の経母乳曝露は影響がないか極めて弱く、特に妊娠後期における経胎盤曝露が発達神経毒性を示すことが明らかとなった。記憶・学習機能の発達に対して、PCBは非TCDD様毒性を持つ可能性が強く示唆された。

コプラナーPCB異性体のPCB118とPCB114、ならびに非コプラナーPCB異性体のPCB153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、AhRを介さない甲状腺ホルモン代謝へ及ぼす影響としての指標

としてCYP2B10およびCYP2C55が候補となること、PCB153曝露の影響として、CYP2B10のCARを介した誘導メカニズムによるが考えられた。コプラナーPCBを含むダイオキシン類の毒性評価には、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判明した。

また、コプラナーPCBの脳への毒性をTCDD様毒性と非TCDD毒性に識別するための基礎研究の過程で、TCDDによりSFRP1, 2及び3遺伝子発現量の変化と組織局在性変化、海馬依存性学習行動の低下と海馬CA1領域のcyclic AMP response element binding proteinの活性低下との関連性、さらには、TCDDに曝露した胎仔脳におけるケモカイン遺伝子の発現量変化などを観察した。

新たな毒性評価手法の確立として、DNAマイクロアレイのプロープにサブトラクションライブラリーを用いることによって、従来の方法では検出感度以下と考えられるクローンも単離できることが明らかとなり、マイクロアレイの応用範囲が大きく広がった。本研究により、ダイオキシン誘導性及び抑制性の新規遺伝子も単離することに成功した。さらに、ニヒトAhRの反応性を調べるためのin vivoモデル動物として、hAhRノックインマウスを作製し、3-MCとTCDDに対する反応性を調べたところ、後者に対する反応が弱いことが明らかになった。

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

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.

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.
- 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)
- Nishimura N., Yonemoto J., Miyabara Y., Fujii-Kuriyama Y., **Tohyama C.**: Altered thyroxine and retinoid metabolic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in aryl hydrocarbon receptor-null mice. *Arch Toxicol.* (2005) in press.
- 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 P450scc 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)
- Fukuzawa N. H., Ohsako S., Wu Q., Sakaue M., Fujii-Kuriyama Y., Baba T., and Tohyama C. Testicular cytochrome P450scc and LHR as possible targets of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in the mouse. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 221: 87-96, (2004)
- Ishizuka M., Yonemoto J., Zaha H., **Tohyama C.**, and Sone H.: Perinatal exposure to low dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin alters sex-dependent expression of hepatic CYP2C11. *J. Biochem. Toxicol.* 17:, 278-2, (2003)
- Ohsako S., Kubota K., Kurosawa S., Takeda K., Wu Q., Ishimura R., and **Tohyama C.** :Alterations of gene expression in adult male rat testis and pituitary shortly after subacute administration of the antiandrogen flutamide. *J Reprod Dev*, 49: 275-290, (2003)
- Kubota K., Ohsako S., Kurosawa S., Takeda K., Wu Q., Sakaue M., Kawakami T., Ishimura R., and **Tohyama C.**: Effects of vinclozolin administration on sperm production and testosterone biosynthetic pathway in adult male rat. *J Reprod Dev*, 49: 403-412, (2003)
- Inouye K., Ito T., Fujimaki H., Takahashi Y., Takemori T., Pan X., **Tohyama C.**, and Nohara K. : Suppressive effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on the high-affinity antibody response in C57BL/6 mice. *Toxicol. Sci*, 74: 315-324, (2003)
- Doi H., Baba T., **Tohyama C.**, and Nohara K. : Functional activation of arylhydrocarbon receptor (AhR) in primary T cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Chemosphere*, 52: 655-662, (2003)
- Arisawa K., Matsumura T., **Tohyama C.**, Saito H., Satoh H., Nagai M., Morita M., and Suzuki T.: Fish intake, plasma omega-3 polyunsaturated fatty acids, and polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins/polychlorinated dibenzo-furans and co-planar polychlorinated biphenyls in the blood of the Japanese population. *Int Arch Occ Env Hea*, 76: 205-21, (2003)
- Moriguchi T., Motohashi H., Hosoya T., Nakajima O., Takahashi S., Ohsako S., Aoki Y., Nishimura N., **Tohyama C.**, Fujii-Kuriyama Y., and Yamamoto M. : Distinct response to dioxin in an arylhydrocarbon receptor (AHR)-humanized mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 5652-5657, (2003)
- Nishimura N., Yonemoto J., Miyabara Y., Sato M., and **Tohyama C.** :Rat thyroid hyperplasia induced by gestational and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Endocrinology*, 144: 2075-2083, (2003)
- Fukuzawa H. N., Ohsako S., Nagano R., Sakaue M., Baba T., Aoki Y., and **Tohyama C.** :Effects of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl, a coplanar polychlorinated biphenyl congener, on cultured neonatal mouse testis. *Toxicology In Vitro*, 17: 259-269, (2003)
- Takeyama M, **Tohyama C.** : Developmental neurotoxicity of dioxin and its related compounds. *Industrial Health* 41:215-230, (2003)
- Takeyama M., Sone H., Miyabara Y. and **Tohyama C.**: Perinatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin alters activity-dependent expression of BDNF mRNA in the neocortex and male rat sexual behavior in adulthood. *Neurotoxicology*, 24: 207-217.(2003)

2.学会発表

- 鈴木 寛, 滝口理恵, 大西真央, 生城真一, 山田静雄, 加藤善久: フェノバルビタールによる血清中サイロキシン濃度低下作用機構: 動物種差. 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)
- 大西真央, 鈴木 寛, 生城真一, 原口浩一, 山田静雄, 加藤善久: 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. 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)
- Mao Onishi, Yoshihisa Kato, Koichi Haraguchi, Shinichi Ikushiro, Hiroshi Suzuki, Ryohei Kimura and Shizuo Yamada: Mechanistic study for the decrease in serum thyroxine level in PCB-treated mice. 第19回日本薬物動態学会年会, 金沢.(2004)
- Hiroshi Suzuki, Yoshihisa Kato, Rie Takiguchi, Mao Onishi, Shinichi Ikushiro, Ryohei Kimura and Shizuo Yamada: Species difference among mice, hamsters, rats, and guinea pigs in phenobarbital-induced alteration of serum thyroxine level. 第19回日本薬物動態学会年会, 金沢.(2004)
- 太田千穂, 原口浩一, 金丸知代, 加藤善久, 山田静雄, 古賀信幸: 2,2',3,4',5,5',6-七塩素化ビフェニル(PCB187)の in vitro 代謝の動物種差. フォーラム 2004: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 千葉.(2004)
- 大西真央, 加藤善久, 鈴木 寛, 生城真一, 木村良平: PCBによる血清中甲状腺ホルモン濃度低下の作用機構. 第31回日本トキシコロジー学会学術年会, 大阪.(2004)
- 鈴木 寛, 加藤善久, 滝口理恵, 大西真央, 生城真一, 木村良平: Phenobarbitalによる血清中サイロキシン濃度低下作用機構とその動物種差. 第31回日本トキシコロジー学会学術年会, 大阪.(2004)
- 古賀信幸, 原口浩一, 金丸知代, 加藤善久, 木村良平: 2,2',3,4',5,5',6-七塩素化ビフェニル(PCB187)の動物肝ミクロゾームによる代謝. 日本薬学会第124年会, 大阪.(2004)
- 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, 粟生佳奈, 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,^{*}2Metoccean 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. アリルヒ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 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. DIOXIN2004, Berlin, Germany (2004)
- 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)
- Ohsako S. Kubota K. and **Tohyama C.** Cloning of rat 5 α -reductase type 2 gene promoter region and an evidence of no relationship between its transactivation regulation and arylhydrocarbon receptor. 43rd Ann 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)
- Kekeyama M, Sone H, **Tohyama C.** Maternal exposure to dioxin-induced central precocious puberty in the female rat. The 9th Meeting of the International Neurotoxicology Association, Dresden. (2003)
- 野原恵子, 伊藤智彦, 遠山千春. ダイオキシンの免疫系に対する作用メカニズム. フォーラム 2003: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 仙台. (2003)
- 井上薫, 潘小青, 今井統隆, 遠山千春, 野

- 原恵子. 低用量ダイオキシン曝露による免疫系への影響. 第10回日本免疫毒性学会学術大会, 相模原. (2003)
- 伊藤智彦, 九十九伸一, 山本雅之, 本橋ほづみ, 鈴木教郎, 藤井義明, 三村純正, 遠山千春, 野原恵子. 恒常的活性化型 arylhydrocarbon receptor 変異体を用いた T細胞へのダイオキシンの影響の解明. 第10回日本免疫毒性学会学術大会, 相模原. (2003)
- 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, Tien-Min Lin, Peterson R.E., 遠山千春, 野原恵子. アリール炭化水素受容体の活性化による T細胞の増殖抑制とその標的遺伝子の検索. 第3回分子予防環境医学研究会, 東京 (2003)
- Ishimura R., Kawakami T., Ohsako S. and **Tohyama C.** Immature angiogenesis in the rat placental labyrinth after exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 23rd International Symposium on Halogenated Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants, Boston. (2003)
- Kawakami T., Ishimura R., Ohsako S., Takeda K and **Tohyama C.** Strain difference in placental dysfunction and fetal death in rats exposed to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 23rd International Symposium on Halogenated Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants, Boston. (2003)
- Maeda S., Kakeyama M. and **Tohyama C.** Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on brain development and function. 23rd International Symposium on Halogenated Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants, Boston. (2003)
- Nishimura N., Yonemoto J., Yokoi C. and **Tohyama C.** Hydronephrosis at weaning not during gestation, is caused by lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in holtzman rats. 23rd International Symposium on Halogenated Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants, Boston. (2003)
- Pollutants, Boston. (2003)
- 野原恵子, 藤巻秀和, 遠山千春. ダイオキシン曝露がアレルギー疾患に及ぼす影響. アレルギー学会春季臨床大会, 横浜 (2003)
- 西村典子, 米元純三, 横井千沙子, 竹内陽子, 遠山千春. 母乳からのダイオキシン曝露による甲状腺機能への影響とそのメカニズム: クロスフォスタリング実験. 第73回衛生学会, 大分 (2003)
- 遠山千春, 米元純三, 竹内陽子, 横井千沙子, 宮原裕一, 西村典子. ダイオキシンおよびポリ塩素化ビフェニルのレチノイド代謝への作用メカニズム. 第73回衛生学会, 大分 (2003)
- 米元純三, 西村典子, 横井千沙子, 竹内陽子, 遠山千春. ダイオキシン及びポリ塩素化ビフェニルの甲状腺ホルモンへの影響とそのメカニズム. 第73回衛生学会, 大分 (2003)
- Nishimura N., Yonemoto J., Yokoi C., Takeuchi Y., Ikushiro S. and **Tohyama C.** Lactational not in utero exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin disrupts thyroid hormone homeostasis in holtzman rats. Society of Toxicology 42nd Annual Meeting, Salt Lake City. (2003)
- Ito T., Tsukumo S., **Yamamoto M.**, Motohashi H., Suzuki N., Fujii-Kuriyama, Y., Mimura J., **Tohyama C.** and Nohara K. A constitutively active aryl hydrocarbon receptor induces growth inhibition by cell cycle arrest and apoptosis in jurkat T cells. Society of Toxicology: 42 nd annual meeting, Salt Lake City. (2003)
- Nohara K., Tsukumo S., Ito T., **Yamamoto M.**, Motohashi H., Hida A., Fujii-Kuriyama Y., Inouye K., Nagai H. and **Tohyama C.** Thymocyte alterations in CD2-driven constitutively active arylhydrocarbon receptor(AhR) transgenic mice. Society of Toxicology: 42 nd annual meeting, Salt Lake City. (2003)
- 中田明子, 西村典子, 竹内陽子, 横井千沙

- 子, 遠山千春, グウエン・ヴァン・チュエン. 第 57 回日本栄養・食糧学会大会, 福岡.(2003)
- 池田雅彦, 鈴木千夏, 山下純子, 遠山千春, 富田多嘉子. ダイオキシンのラット脳の性分化に対する経胎盤, 経母乳曝露の影響-ダイオキシン用量依存症. 内分泌攪乱物質特別シンポジウム -性腺軸(視床下部-下垂体-性腺)の発育と異常-, 葉山.(2003)
- 野原恵子, 遠山千春. ダイオキシンによる免疫毒性の標的細胞. 第 2 回分子予防環境医学研究会, 東京 (2002)
- 石村隆太, 川上隆茂, 大迫誠一郎, 遠山千春. TCDD による胎仔死亡および胎盤の血管収縮の系統差メカニズム. 第 2 回分子予防環境医学研究会, 東京 (2002)
- 遠山千春, 米元純三, 西村典子. 齧歯類の甲状腺組織と機能に及ぼすダイオキシンの攪乱作用. 第 25 回日本分子生物学会年会, 横浜 (2002)
- 野原恵子, 九十九伸一, 伊藤智彦, 山本雅之, 本橋ほづみ, 日田安寿美, 藤井義明, 井上薫, 長井治子, 遠山千春. T 細胞特異的 constitutive active arylhydrocarbon receptor トランスジェニックマウスの免疫系の解析. 第 25 回日本分子生物学会年会, 横浜 (2002)
- 野原恵子, 九十九伸一, 伊藤智彦, 井上薫, 長井治子. T 細胞特異的 Constitutive Active Arylhydrocarbon Receptor トランスジェニックマウスの作製. 第 32 回日本免疫学会, 東京 (2002)
- 伊藤智彦, 井上薫, 藤巻秀和, 野原恵子. マウス一次免疫反応での T 細胞由来サイトカイン産生に対するダイオキシン曝露の影響. 第 32 回日本免疫学会, 東京 (2002)
- 石村隆太, 川上隆茂, 大迫誠一郎, 青木康展, 遠山千春. TCDD 曝露によるホルツマンラット胎盤の低酸素状態マーカータンパクの誘導. 環境ホルモン学会第 5 回研究発表会, 広島(2002)
- 川上隆茂, 石村隆太, 遠山千春, 武田健, 大迫誠一郎. TCDD 曝露による胎仔死亡および胎盤の機能低下の系統差. 環境ホルモン学会第 5 回研究発表会, 広島 (2002)
- 呉慶, 大迫誠一郎, 石村隆太, 川上隆一, 鈴木純子, 遠山千春. マウス着床前胚の in vitro TCDD 曝露による胎児の発育と DNA メチル化のパターンの変化. 環境ホルモン学会第 5 回研究発表会, 広島(2002)
- 座波ひろ子, 曾根秀子, 米元純三, 久野節二, 前田秀一郎, 遠山千春. マウス胎児脳における 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin の sfrp-2 発現と局在に及ぼす影響. 環境ホルモン学会第 5 回研究発表会, 広島 (2002)
- 竹内陽子, 遠山千春, 宮原裕一, 横井千紗子, 米元純三, 前田秀一郎, 西村典子. トランスサイレチン欠損マウスを用いたダイオキシン/ポリ塩素化ビフェニルの作用メカニズム 1. 血清および肝臓レチノイド量への影響. 環境ホルモン学会第 5 回研究発表会, 広島 (2002)
- 中田明子, 竹内陽子, 横井千紗子, グウエン・ヴァン・チュエン, 遠山千春, 西村典子. ダイオキシン類の酸化的ストレスに対するビタミン E の抑制効果. 環境ホルモン学会第 5 回研究発表会, 広島 (2002)
- 西村典子, 米元純三, 横井千紗子, 竹内陽子, 遠山千春. ダイオキシン類およびポリ塩素化ビフェニールの甲状腺機能への影響とそのメカニズム. 環境ホルモン学会第 5 回研究発表会, 広島 (2002)
- 横井千紗子, 遠山千春, 竹内陽子, 米元純三, 前田秀一郎, 西村典子. トランスサイレチン欠損マウスを用いた

- ダイオキシン/ポリ塩素化ビフェニルの作用メカニズム 2. 甲状腺ホルモンへの影響. 環境ホルモン学会第5回研究発表会, 広島 (2002)
- Yonemoto J., Nishimura N., Yokoi C., Takeuchi Y. and **Tohyama C.** Lactational rather than in utero exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin caused hypothyroxinemia at weaning of Holtzman rats. 環境ホルモン学会第5回研究発表会, 広島(2002)
- Tohyama C.** Low-dose exposure to dioxin and characterization of the toxicity profile. 第75回日本生化学会大会, 京都 (2002)
- 石村隆太, 大迫誠一郎, 川上隆茂, 青木康展, 遠山千春. TCDDに曝露した胎盤における低酸素状態マーカータンパク質の誘導. 第75回日本生化学会大会, 京都 (2002)
- Ohsako S., Yonemoto J. and **Tohyama C.** Low-dose exposure to dioxin, its male reproductive toxicity and health risk assessment. 5th FAOPS CONGRESS KUALA LUMPUR, Kuala Lumpur. (2002)
- Nishimura N., Yonemoto J. and **Tohyama C.** Perinatal exposure to low dose dioxin disrupts thyroid hormone homeostasis and causes thyroid hyperplasia in the rat. 5th FAOPS CONGRESS KUALA LUMPUR, Kuala Lumpur. (2002)
- 野原恵子, 遠山千春. ダイオキシン曝露による免疫毒性. 第9回日本免疫毒性学会, 静岡 (2002)
- 井上薫, 伊藤智彦, 藤巻秀和, 遠山千春, 野原恵子. 体液性免疫における長寿命抗体産生細胞に対する2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD)の影響. 第9回日本免疫毒性学会, 静岡 (2002)
- 伊藤智彦, 井上薫, 藤巻秀和, 遠山千春, 野原恵子. T細胞活性化および分化に対するダイオキシンの抑制効果. 第9回日本免疫毒性学会, 静岡 (2002)
- Ishimura R., Ohsako S., Kawakami T., Aoki Y. and **Tohyama C.** Proteomics analysis of placentas after exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in rats. 22nd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants & POPs (Dioxin 2002), Barcelona. (2002)
- Nishimura N., Yonemoto J., Miyabara Y., Yokoi C., Takeuchi Y., Fujii-Kuriyama Y., **Maeda S., Tohyama C.** Lack of thyroxine and retinoid metabolic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in arylhydrocarbon receptor-null mice but not in transthyretin-null mice. 22nd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants & POPs (Dioxin 2002), Barcelona. (2002)
- Yonemoto J., Nishimura N., Yokoi C., Takeuchi Y. and **Tohyama C.** Hypothyroxinemia at weaning of holtzman rats is caused by lactational but not in utero exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 22nd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants & POPs (Dioxin 2002), Barcelona. (2002)
- Wu Q., Ohsako S., Ishimura R. and **Tohyama C.** Exposure of preimplantation embryos to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) affected fetal development. 22nd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants & POPs (Dioxin 2002), Barcelona. (2002)
- Ohsako S., Fukuzawa H N., Ishimura R., Sone H., Fujii-Kuriyama Y. and **Tohyama C.** Alterations in the reproductive system of male mice by perinatal TCDD exposure are dependent on AhR gene. 14th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, Sapporo. (2002)
- Fukuzawa H. N., Sakaue M., Baba T., Fujii-Kuriyama Y., **Tohyama C.** and Ohsako S. AhR-dependent down-regulation of cytochrome P450 side chain cleavage (P450_{scc}) enzyme expression in adult mouse testis by TCDD. 14th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, Sapporo. (2002)

Nishimura N., Yonemoto J., Miyabara Y., Yokoi C., Takeuchi Y., Fujii-Kuriyama Y., **Maeda S., Tohyama C.** Alteration in metabolism of thyroxine and vitamin a in AhR-Null mice and TTR-Null mice following 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure. 14th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, Sapporo. (2002)

西村典子, 米元純三, 遠山千春. ダイオキシン類の甲状腺機能への影響とそのメカニズムの検討. 第29回日本トキシコロジー学会, 名古屋 (2002)

Miyamoto K.: Comprehensive analysis of genes in reproductive organs affected by low concentrations of endocrine disruptors. 5th Scientific Congress of the Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies "Endocrine disruptors symposium", Malaysia, (2002)

宮本 薫: 低濃度ダイオキシン (TCDD) の生殖系への影響解析—遺伝子発現を中心として—. 第75回日本生化学会大会. シンポジウム 内分泌攪乱作用研究の進展. 京都, (2002)

水谷哲也, 矢澤隆志, 中川幸, 吉田和世, 吉野美紀, 関口俊男, 梶谷宇, 川田広子, 井上佳子, 山田一哉, 宮本薫: ラット卵巣顆粒膜細胞の遺伝子発現に及ぼす低濃度ダイオキシンの影響. 第7回日本生殖内分泌学会, 大阪, (2002)

Moriguchi T., Motohashi H., Aoki Y., Ohsako S., Nakajima O., Fujii-Kuriyama., Y., **Tohyama., C., and Yamamoto, M.** Decreased sensitivity to xenobiotics in a humanized mouse model. 14th International Symposium on Microsomes and Drug oxidations (MDO2002), Sapporo, (2002).

森口尚, 本橋ほづみ, 細谷朋方, 中島修, 高橋智, 大迫誠一郎, 青木康展, 遠山千春, 藤井義明, 山本雅之. ヒト型ダイオキシン受容体ノックインマウスの表現型解析. 第25回日本分子生物学会

年会, パシフィコ横浜. (2002)

Ikeda M., Tamura M., Suzuki C., Yamashita J., Setani K., **Tohyama C.** and Tomita T. Effects of repeated in utero and lactational TCDD exposure on sexual behavior and sex ratio of offspring. 22nd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants & POPs (Dioxin 2002), Barcelona .(2002)

田村昌士, 池田雅彦, 瀬谷薫, 鈴木千夏, 山下純子, 遠山千春, 富田多嘉子. ダイオキシン (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin:TCDD) の経胎盤, 経母乳曝露による仔の性分化, 生殖腺に対する影響. 日本薬学会第122回年会, 幕張.(2002)

H. 健康危険情報

特に無し

I. 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

(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 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

コプラナーポリ塩素化ビフェニル類 (co-PCB) はダイオキシン類の一種でアリール炭化水素レセプター (AhR) を介して TCDD 様の毒性を示すだけでなく、PCB 様の毒性も有する。子宮内および授乳期のダイオキシン曝露により引き起こされる雄性生殖系への影響は、精子数の減少や雄性ホルモンであるテストステロンの減少などが知られている。しかしながら、その詳細は依然不明なままである。本研究では、co-PCB (PCB126) 単体の非 TCDD 毒性に着目して雄性生殖系に及ぼす TCDD 毒性との違いを検討した。また、新生仔マウス精巣の器官培養系を用いて PCB126 が精子形成やステロイド合成系に及ぼす直接影響についても検討した。その結果、PCB126 は新生仔マウス精巣における生殖細胞およびセルトリ細胞の増殖能には直接的影響を与えないことが示された。しかしながら、精巣におけるテストステロン合成酵素の P450scc の mRNA 発現を減少させ、P450c17 の mRNA の発現は増加を示した。P450c17 の mRNA の発現増加は PCB 代謝物によるエストロゲン様作用を示したものと考えられる。

研究協力者

福澤徳穂、大迫 誠一郎 国立環境研究所環境健康研究領域

A 研究目的

ダイオキシン類の異性体の中で、毒性等価係数が付与されているダイオキシン類は、ポリ塩素化ジベンゾ-*p*-ダイオキシン類 (PCDD)、ポリ塩素化ジベンゾフラン類 (PCDF)、コプラナーポリ塩素化ビフェニル類 (co-PCB) の各々の異性体 29 種類から構成される。ダイオキシン特別措置法が制定され、燃焼に伴う環境への放出量は激減しているが、食品に蓄積するダイオキシン類の削減は容易ではなく、食事を介して取り込まれるダイオキシン量は当面、横ばいと予想される。日本人が一日に食品から摂取するダイオキシンのうち、2,3,7,8-TCDD、1,2,3,7,8-PeCDD、2,3,7,8-PeCDF、3,3',4,4',5-PenCB (PCB126) の 4 種類のみで全ダイオキシン摂取量の約 70% を占め、そのうちコプラナー PCB 異性体の中で最強の毒性を示す PCB126 が、約 35% を占める (Maruyama *et al.*, 2002)。日本人が全食品から摂取するダイ

オキシンのうち、約 50% を魚から摂取しており (Maruyama *et al.*, 2002)、欧米諸国と比べて PCB 摂取率が非常に高い。1998 年以降、ダイオキシン類として分類されるようになった 12 種類のコプラナー PCB 異性体には、TCDD の毒性を 1 としたときに相対毒性として 0.1 から 0.00001 までの毒性等価係数が付与されており、言い換えれば、これら PCB は、TCDD 毒性に加えて、非 TCDD としての毒性を併せもっていることになる。PCB は TCDD 同様に脂肪親油性の化合物で人の母乳、血漿、組織から検出されているほか、多くの野生動物組織にも高濃度で蓄積されている。特にコプラナー PCB はリガンドに依存した転写因子アリール炭化水素レセプター (AhR) を介したシグナル伝達経路を介して TCDD に類似した様々な有害な毒性を示す一方で、PCB の毒性やホルモン様作用があり、胎盤を通過して発生中の胎児に移行する。しかし

ながら、コプラナーPCB単体の非TCDD毒性に着目した研究は乏しい。

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

我々はコプラナーPCB(PCB126)のもつTCDD毒性とPCB特有の非TCDD毒性の現れ方の違いをより明確に検討す

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

B 研究方法

1. 試薬と材料

3,3',4,4',5-ペンタクロロビフェニル (IUPAC名, PCB126) は森田昌敏博士 (NIES, Tsukuba, Japan) より贈与いただいた。ヌクレオポアフィルターはワットマン社 (Clifton, NJ, USA) から購入した。Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、仔牛血清 (Lot #1027934)、Amplification Grade Deoxyribonuclease I (DNase I)、SuperScript™ II RNaseH-逆転写酵素、Oligo (dT) 12-18 プライマー、Urtla PURE™ アガロースはライフ・テクノロジ社 (Rockville, MD, USA) から購入した。抗生物質 (ペニシリン・ストレプトマイシン) と5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) はシグマ社 (St. Louis, MO, USA) から購入した。ペルオキシダーゼ標識抗-BrdU マウスモノクローナル抗体はBecton Dickinson 社 (San Jose, CA, USA) から購入した。In-Situ 細胞死検出キット-AP は ロッシュ・モレキュラー・バイオケミカルズ社 (Mannheim, Germany) から購入した。QIA prep RNA 精製キット (RNeasy) はキアゲン・GmbH 社 (Hilden, Germany) から購入した。TaKaRa Ex Taq™ ポリメラーゼ、10 x Ex Taq™ バッファー、TaKaRa LA Taq™ ポリメラーゼ、2 x GC バッファーI、II、10 mM dNTP 混合液は

TaKaRa バイオケミカルズ社 (Otsu, Japan) から購入した。

2. 器官培養系

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

3. BrdU-ラベリング と TUNEL 法

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

個数で割ることで相対値化した。

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

4. 半定量 RT-PCR 法

RT-PCR 法は以前の報告で述べた (Ohsako *et al.*, 2001)。培養精巣 (n=4) 由来の全 RNA は QIA prep RNA 精製キットを用いて調製した。溶出した全 RNA サンプルは 1 μg の全 RNA に対し 1 unit の DNase I でゲノム除去処理を行った。全 RNA (20 μg) を 200 unit の SuperScript™ II 逆転写酵素と 0.5 μg の oligo (dT) 12-18 プライマーを用いて 20 μl の反応系で添付の標準プロトコールに従って逆転写した。逆転写した cDNA サンプルは hsp86, calnexin-t, protamine-2, androgen binding protein (ABP), cytochrome P450 1A1 (CYP1A1), cytochrome P450 side chain cleavage (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 mRNA レベルを測定するために使用した。プライマー配列と PCR 産物の長さは表 1 に示した。hsp86, calnexin-t, protamine-2, ABP, cyclophilin, G3PDH, P450scc, 3 β -HSD の mRNA を増幅させる場合には 0.5 μl の合成 cDNA を 25 μl の反応系 (0.625 unit TaKaRa Ex Taq™ ポリメラーゼ, 1 x EX Taq™ バッファー, 0.2 mM dNTP 混合液, 2 μM 特異プライマー) を使用した。CYP1A1 mRNA の増幅には、0.5 μl の合成 cDNA を 25 μl の反応系 (1.25 unit TaKaRa La Taq™ ポリメラーゼ, 1 x GC バッファー-I, 0.4 mM dNTP 混合液, 4 μM 特異プライマー) を使用した。P450c17 と 17 β -HSD mRNA の増幅には、0.5 μl の合成 cDNA を 25 μl の反応系 (1.25 unit TaKaRa La Taq™ ポリメラーゼ, 1 x GC バッファー-II, 0.4 mM dNTP 混合液, 4 μM

特異プライマー)を使用した。RT-PCRのサイクル数は cyclophilin, G3PDH は 20 cycle, hsp86 と 3 β -HSD は 25 cycle, calnexin-t, protamine-2, ABP, P450scc, P450c17, 17 β -HSD は 35 cycle を使用した。RT-PCR の増幅条件 (T_m 値) は hsp86, calnexin-t, protamine-2, ABP, CYP1A1, cyclophilin, G3PDH では 95°C, 30 sec; 60°C, 30 sec; 70°C, 45 sec で、また P450scc, P450c17, 3 β -HSD, 17 β HSD は 95°C, 30 sec; 57°C, 30 sec; 70°C, 1 min で増幅した。PCR 産物は 2% のアガロースゲルで分離した。標的 mRNA 産物は、Scion Images software (Scion Corporation, Frederick, USA) を用いて内部標準に cyclophilin または G3PDH を使用して相対化した。PCR 産物は pGEM-T Easy ベクターに導入してサブクローニングを行い、ABI Prism Big Dye terminator cycle シークエンシングキット (PE-Biosystems, Foster City, USA) を用いた dideoxy 法でシークエンスした。

5. 統計学的解析

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

C 研究結果

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

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

hsp86, calnexin-t, protamine-2 の 3 種

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

calnexin-t は減数分裂初期の生殖細胞 (early meiotic phase germ cell) マーカー (Ohsako *et al.*, 1994) であり、*in vivo* のマウス精巣では PND 12 から検出された。また protamine-2 はハプロイドの生殖細胞マーカー (Johnson *et al.*, 1988) であり、PND 24 以降で検出された。しかしながらこれらの mRNA は器官培養した精巣では全く検出されなかった (図. 1A)。セルトリ細胞の細胞数を分子レベルで示すためのマーカーとして使用したアンドロゲン結合タンパク質 (ABP) (Wang *et al.*, 1989) は、*in vivo* のマウス精巣で PND12 まで mRNA の発現増加が認められたが、その後減少した (図. 1A)。培養精巣における ABP mRNA は 6 時間 から 192 時間まで一定レベルでの発現が観察された。ハウスキーピング遺伝子である cyclophilin と G3PDH はこの培養系で一様に発現を維持した。

ライディッチ細胞におけるテストステロン合成にはステロイド合成酵素群の P450scc, P450c17, 3 β -HSD, 17 β -HSD が重要な役割を担う。そこでこれらの酵素の mRNA レベルを半定量 RT-PCR 法を用いて測定した。P450scc, P450c17, 3 β -HSD, 17 β -HSD の mRNA レベルは出生時

(PND 0) の *in vivo* の新生仔マウス精巣と器官培養開始時の精巣では同一の発現を示すが *in vivo* の PND 4 のマウス精巣では P450scc と P450c17 mRNA の発現はほとんど検出されず、その後 PND 70 に至るまで発現が徐々に増加した (図 1A)。一方、培養精巣では 0 時間から 192 時間までの培養時系列すべてにおいて P450scc mRNA の発現が *in vivo* の PND 4 と PND 8 の精巣よりも高く維持された

(図. 1A, B)。また、培養精巣での P450c17 mRNA の発現は 6 時間から 96 時間まで明瞭に検出され、192 時間の培養ではわずかに増加した (図. 1B)。3 β -HSD mRNA の *in vivo* マウス精巣における発現は PND 0 から PND 24 まで安定に発現し、PND 70 ではわずかに増加した (図. 1A)。培養精巣においても 3 β HSD mRNA の発現は培養期間中を通して安定に維持された (図. 1B)。 *in vivo* のマウス精巣における 17 α -HSD mRNA の発現は PND 24 までは減少したが、その間 PND 8 ではわずかに増加を示し、PND 70 では増加した (図. 1A)。一方、培養精巣における 17 β -HSD mRNA の発現は培養 192 時間 まで徐々に減少した (図. 1B)。

2. CYP1A1 mRNA の誘導

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

3. PCB126 の生殖細胞とセルトリ細胞の増殖に及ぼす影響

PCB126 が新生仔マウス精巣の精粗細胞 (gonocytes) とセルトリ細胞の体細胞分裂活性に与える影響を検討するために、新生仔マウス精巣 ($n=12$) を様々な濃度の PCB126 存在下で個別に培養し、培養最終時に BrdU でラベルした。PCB126 の存在下では生殖細胞のラベリングインデックスは、本研究に使用したどの PCB126 濃度においてもほとんど一定に

維持された。一方、セルトリ細胞のラベリングインデックスは PCB126 の存在下でわずかに減少傾向を示したが、統計学的に有意な差は認められなかった (図 3)。我々はまた、器官培養した精巣で PCB126 によりアポトーシスが誘導されたかどうかを同一試料を用いて TUNEL 法で検討した。しかしながら、TUNEL 陽性を示す生殖細胞やセルトリ細胞は、対照群と PCB126 曝露群のどちらの培養精巣においても認められなかった (データ未掲載)。

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

4. PCB126 のステロイド合成酵素の mRNA 発現におよぼす影響

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

D 考察

1. 本研究に用いた新生仔マウス精巣の器官培養系の特徴

本研究では、出生時から成熟期に至る各ステージのマウス精巣と器官培養した精巣とを比較するために、これらの精巣における精子形成とステロイド合成に関

わる遺伝子について、その発現プロフィールを提示した (図. 1)。マウス精巣では、hsp86 mRNA が生殖細胞でのみ発現している (Lee, 1990)。新生仔ラット精巣では hsp86 タンパク質が精粗細胞 (gonocyte) と増殖段階にある精原細胞 (spermatogonia) に高く発現している (Ohsako *et al.*, 1995)。本研究では、PND0 のマウス精巣に比べて PND4 と PND8 の精巣における hsp86 mRNA の発現が減少した (図. 1A)。このことは体細胞、特にセルトリ細胞の数が生殖細胞数に比べて増加したことを示した可能性がある。その結果、生後 8 日目までの生殖細胞の割合が減少する (Nagano *et al.*, 2000)。またセルトリ細胞が生産する分泌タンパク質の ABP (Wang *et al.*, 1989) は新生仔マウス精巣において生後 12 日まで増加し、その後減少する。この減少は、セルトリ細胞の数が生殖細胞数に比べ増加したことを示唆している (図. 1A)。新生仔精巣の器官培養系では hsp86 mRNA の発現は培養期間すべてを通して明瞭に検出された。このことは体細胞に対する生殖細胞の割合が変化しないことを示している。他の生殖細胞マーカーとして、calnexin-t はパキテン期精母細胞またはそれ以降の精母細胞 (spermatocytes) で発現し (Ohsako *et al.*, 1994)、protamine-2 はハプロイドの精細胞に発現する (Johnson *et al.*, 1988) ことが知られている。しかしながら本研究においては protamine-2 の発現は、培養系で 8 日間培養した場合にも検出できなかった。このことは生殖細胞が減数分裂に入らなかったことを示している。in vivo の新生仔マウス精巣では精粗細胞は PND 1.5 に増殖を再開し (Nagano *et al.*, 2000)、増殖した精原細胞は PND8 から最初の減数分裂を始め (図. 1A)、calnexin-t が検出される。そのためこの器官培養系では精粗細胞の減数分裂への突入までは再現できなかったと考えられる。また、培養 4 日目における生殖細胞の増殖活性は in vivo における PND4 の精巣のものと同様な値を示している。

4 種類のステロイド合成酵素 (P450_{scc}, P450_{c17}, 3 β -HSD, 17 β -HSD) の mRNA 発現は、ライディッヒ細胞によるテストステロン合成に必須でありステロイド合成

における酵素的過程の律速段階となる (Stocco *et al.*, 1996)。本研究で 3 β -HSD と 17 β -HSD の増幅に用いたプライマー配列は、精巣でもっとも優位な 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 α -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。

母親経路で胎児期に 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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重の用量で 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曝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 P450scc の mRNA 発現が有意に減少し、P450c17 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 アロマトラーゼ

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 アロマトラーゼの遺伝子の 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 アロマトラ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 アロマトラ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 アロマトラ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 P450scc 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 P450scc の活性減少とコレステロール輸送系の調節障害によって精巣内テストステロン濃度が減少し、プレグネロン合成への変換障害を引き起こす (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 P450scc 活性を強く障害する (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 P450scc 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 P450scc 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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重の用量で 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。手短かに述べると、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、