

P450c17 mRNA の発現を用量依存的に増加させることが明らかになった。PCB126 による P450c17 mRNA の発現増加作用は非 TCDD 毒性である可能性が示された。

## F 参考文献

- Andric, S.A., Kostic, T.A., Dragisic, S.M., Andric, N.L., Stojilkovic, S.S., Kovacevic, R.Z. (2000). Acute effects of polychlorinated biphenyl-containing and -free transformer fluids on rat testicular steroidogenesis. *Environmental Health Perspectives* 108, 955-959.
- Baker, P.J., Sha, J.A., McBride, M.W., Peng, L., Payne, A.H., O'Shaughnessy, P.J. (1999). Expression of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase type I and type VI isoforms in the mouse testis during development. *European Journal of Biochemistry / FEBS* 260, 911-917.
- Baker, P.J., Sha, J.H., O'Shaughnessy, P.J. (1997). Localisation and regulation of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 3 mRNA during development in the mouse testis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 133, 127-133.
- Corbier, P., Kerdelhue, B., Picon, R., Roffi, J. (1978). Changes in testicular weight and serum gonadotropin and testosterone levels before, during, and after birth in the perinatal rat. *Endocrinology* 103, 1985-1991.
- Dasmahapatra, A.K., Wimpee, B.A., Trewin, A.L., Wimpee, C.F., Ghorai, J.K., Hutz, R.J. (2000). Demonstration of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin attenuation of P450 steroidogenic enzyme mRNAs in rat granulosa cell in vitro by competitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Molecular and Cellular Endocrinology* 164, 5-18.
- Denison, M.S. (1991). The molecular mechanism of action of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons. *Chemosphere* 23, 1825-1830.
- DeVito, M.J., Menache, M.G., Diliberto, J.J., Ross, D.G., Birnbaum, L.S. (2000). Dose-response relationships for induction of CYP1A1 and CYP1A2 enzyme activity in liver, lung, and skin in female mice following subchronic exposure to polychlorinated biphenyls. *Toxicology and Applied Pharmacology* 15, 157-172.
- Faqi, A.S., Dalsenter, P.R., Merker, H.J., Chahoud, I. (1998a). Reproductive toxicity and tissue concentration of low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in male offspring rats exposed throughout pregnancy and lactation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 150, 383-92.
- Faqi, A.S., Dalsenter, P.R., Merker, H.J., Chahoud, I. (1998b). Effects on developmental landmarks and reproductive capability of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl in offspring of rats exposed during pregnancy. *Human & Experimental Toxicology* 17, 365-372.
- Gray, L.E., Ostby, J.S., Kelce, W.R. (1997). A dose-response analysis of the reproductive effects of a single gestational dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in male Long Evans Hooded rat offspring. *Toxicology and Applied Pharmacology* 146, 11-20.
- Hickey, G.J., Krasnow, J.S., Beattie, G., Richards, J.S. (1990). Aromatase cytochrome P450 ovarian granulosa cells before and after luteinization: adenosine 3',5'-monophosphate-dependent and independent regulation. Cloning and sequencing of rat aromatase cDNA and 5' genomic DNA. *Molecular Endocrinology* 4, 3-12.
- Hooper, K., Clark, G.C. (1995). Workshop on perinatal exposure to dioxin-like compounds. VI. Role of biomarkers. *Environmental Health Perspectives* 103, 161-167.
- Johnson, P.A., Peschon, J.J., Yelick, P.C., Palmiter, R.D., Hecht, N.B. (1988). Sequence homologies in the mouse protamine 1 and 2 genes. *Biochimica et Biophysica Acta* 950, 45-53.
- Kleeman, J.M., Moore, R.W., Peterson, R.E. (1990). Inhibition of testicular steroidogenesis in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-treated rats: evidence that the key lesion occurs prior to or during pregnenolone formation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 106, 112-125.
- Lee, S-J. (1990). Expression of HSP86 in

- male germ cells. *Molecular and Cellular Biology* 10, 3239-3242.
- Mably, T.A., Bjerke, D.L., Moore, R.W., Gendron-Fitzpatrick, A., Peterson, R.E. (1992a). *In utero* and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 3. Effects on spermatogenesis and reproductive capability. *Toxicology and Applied Pharmacology* 114, 118-126.
- Mably, T.A., Moore, R.W., Peterson, R.E. (1992b). *In utero* and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 1. Effects on androgenic status. *Toxicology and Applied Pharmacology* 114, 97-106.
- Machala, M., Neca, J., Drabek, P., Ulrich, R., Sabatova, V., Nezveda, K., Raszyk, J., Gajduskova, V. (1998). Effects of chronic exposure to PCBs on cytochrome P450 systems and steroidogenesis in liver and testis of bulls (*Bos Taurus*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* 120, 65-70.
- Maruyama, W., Yoshida, K., Tanaka, T., Nakanishi, J. (2002). Possible range of dioxin concentration in human tissues: simulation with a physiologically based model. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 65:2053-2073.
- Miyachi, Y., Nieschlag, E., Lipsett, M.B. (1973). The secretion of gonadotropins and testosterone by the neonatal male rat. *Endocrinology* 92, 1-5.
- Moore, R.W., Jefcoate, C.R., Peterson, R.E. (1991). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin inhibits steroidogenesis in the rat testis by inhibiting the mobilization of cholesterol to cytochrome P450<sub>17</sub>. *Toxicology and Applied Pharmacology* 109, 85-97.
- Nagano, R., Tabata, S., Nakanishi, Y., Ohsako, S., Kurohmaru, M., Hayashi, Y. (2000). Reproliferation and relocation of mouse male germ cells (gonocytes) during prespermatogenesis. *The Anatomical Records* 258, 210-220.
- Ohsako, S., Bunick, D., Hayashi, Y. (1995). Immunocytochemical observation of the 90-kDa heat shock protein (HSP90): high expression in primordial and premeiotic germ cells of male and female rat gonads. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 43, 67-76.
- Ohsako, S., Hayashi Y., Bunick D. (1994). Molecular cloning and sequencing of calnexin-t: an abundant male germ cell-specific calcium-binding protein of the endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry* 269, 14140-14148.
- Ohsako, S., Miyabara, Y., Nishimura, N., Kurosawa, S., Sakaue, M., Ishimura, R., Sato, M., Aoki, Y., Sone, H., Tohyama, C., Yonemoto, J. (2001). Maternal exposure to a low dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) suppressed the development of reproductive organs of male rats: dose-dependent increase of mRNA levels of 5  $\alpha$  - reductase type 2 in contrast to decrease of androgen receptor in the pubertal ventral prostate. *Toxicological Sciences* 60, 132-143.
- Poland, A. and Knutson, L.C. (1982). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 22, 517-554.
- Rhoda, J., Corbier, P., Roffi, J. (1984). Gonadal steroid concentrations in serum and hypothalamus of the rat at birth: aromatization of testosterone to 17 $\beta$ -estradiol. *Endocrinology* 114, 1754-1760.
- Roman, B.L., Timms, B.G., Prins, G.S., Peterson, R.E. (1998a). *In utero* and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin impairs prostate development. 2. Effects on growth and cytodifferentiation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 150, 254-270.
- Roman, B.L., Pollenz, R.S., Peterson, R.E. (1998b). Responsiveness of the adult male rat reproductive tract to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin exposure: Ah receptor and ARNT expression, CYP1A1 induction, and Ah receptor down-regulation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 150, 228-239.
- Safe, S. (1986). Comparative toxicology and mechanism of action of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and divenzofurans. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 26, 371-399.

- Safe, S.H. (1994). Polychlorinated biphenyls (PCBs), environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Critical Reviews of Toxicology* 24, 87-149.
- Stocco, D.M., Clark, B.J. (1996). Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis. *Biochemical Pharmacology* 51, 197-205.
- Van den Berg, M., Birnbaum, L., Bosveld, A.T., Brunstrom, B., Cook, P., Feeley, M., Giesy, J.P., Hanberg, A., Hasegawa, R., Kennedy, S.W., Kubiak, T., Larsen, J.C., van Leeuwen, F.X., Liem, A.K., Nolt, C., Peterson, R.E., Poellinger, L., Safe, S., Schrenk, D., Tillitt, D., Tysklind, M., Younes, M., Waern, F., Zacharewski, T. (1998). Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environmental Health Perspectives* 106, 775-792.
- Wang, R.A., Nakane, P.K., Koji, T. (1998). Autonomous cell death of mouse male germ cells during fetal and postnatal period. *Biology of Reproduction* 58, 1250-1256.
- Wang, Y.M., Sullivan, P.M., Petrusz, P., Yarbrough, W., Joseph, D.R. (1989). The androgen-binding protein gene is expressed in CD1 mouse testis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 63, 85-92.
- Whilock J.P.Jr. (1990). Genetic and molecular aspects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 30, 251-277.
- Wilker, C., Johnson, L., Safe, S. (1996). Effects of developmental exposure to indole-3-carbinol or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on reproductive potential of male rat offspring. *Toxicology and Applied Pharmacology* 141, 68-75.

G. 健康危険情報 特に無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

## I. 図の説明

図 1. マウス精巣の発生段階とマウス精巣の器官培養系における時系列変化における遺伝子発現変化のプロフィール  
PND 0 (新生仔期) から PND 70 (成熟期) までのマウス精巣と 0 時間から 192 時間まで培養した新生仔マウス精巣に対し、10 種類の遺伝子 (hsp86, calnexin-t, protamine-2, ABP, P450scc, P450c17, 3 $\beta$ -HSD, 17 $\beta$ -HSD, cyclophilin, G3PDH) について半定量的 RT-PCR 法を行った。詳細は材料と方法に示した。A, *in vivo* (左図) 精巣と *in vitro* (右図) 精巣での mRNA プロフィールの比較。注目すべき点は新生仔マウス精巣 (*in vivo*) での P450scc の遺伝子発現量であり PND 4 で急激に減少し PND 70 まで徐々に上昇している。一方、培養した精巣での mRNA 量は培養期間中を通してほとんど一様に維持されている。B, 内部標準として cyclophilin で標準化した培養精巣におけるステロイド合成酵素 mRNA 発現量の相対値。数値はそれぞれ 3 個体から得られた値を平均化して標準誤差で表示した。培養精巣における P450scc と 3 $\beta$ -HSD の mRNA 量は培養 8 日間を通して、新生仔マウス精巣の 8 日目での発現量と同程度であった。培養精巣における P450c17 の mRNA 量は培養開始後 6 時間で急激に減少した。

図 2. PCB126 による新生仔マウス器官培養精巣での CYP1A1 mRNA の誘導  
仔牛血清を添加した基本培養液に最終濃度 0-1000 nM になるように PCB126 を添加した後、48 時間の曝露を行った新生仔精巣から全 RNA を抽出した。A, CYP1A1 と cyclophilin の PCR の電気泳動パターン B, 内部標準 cyclophilin に対する CYP1A1 mRNA の発現量。数値は 4 個体それぞれから得られた値を平均化して標準誤差で表示した。\*印は Fisher's PLSD テストによる ANOVA 解析により 対照群に対して有意な差が検出されたことを示す (\*\* p < 0.01)。

図 3. PCB126 による新生仔マウス器官培養精巣での生殖細胞とセルトリ細胞の

## 増殖

仔牛血清を添加した基本培養液に最終濃度 0-1000 nM になるように PCB126 を添加した後、48 時間の曝露を行った新生仔精巣から全 RNA を抽出した。詳細は材料と方法に示した。A, 器官培養した精巣における生殖細胞とセルトリ細胞の BrdU ラベリングインデックス。数値は 12 個体それぞれから検出された値を平均化して標準誤差で表した。どちらの細胞においても細胞増殖率に対して PCB126 の用量依存的な変化は認められなかった。B, 抗 BrdU 抗体を使用した培養精巣での免疫組織化学。100 nM の PCB126 を曝露した培養精巣と対照群の培養精巣の光学顕微鏡像。茶色に染色される核は BrdU-陽性細胞。すべての切片はヘマトキシリン染色を行った。倍率 X200。

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

仔牛血清を添加した基本培養液に PCB126 を最終濃度 0-1000 nM で添加した後、48 時間の曝露を行った新生仔精巣から全 RNA を抽出した。A, hsp86, ABP と cyclophilin の PCR の電気泳動パターン B, 内部標準 cyclophilin に対する hsp86, ABP mRNA 量。数値はそれぞれ 4 個体か

らの値を平均化して標準誤差で表した。hsp86 と ABP の mRNA 量には PCB126 の用量依存的な変化は認められなかった。

図 5. 半定量的 RT-PCR による PCB126 による新生仔マウス精巣のステロイド合成酵素 mRNA 量  
仔牛血清を添加した基本培養液に PCB126 を最終濃度 0-1000 nM で添加した後、48 時間の曝露を行った新生仔精巣から全 RNA を抽出した。A P450scc, P450c17, 3 $\beta$ -HSD, 17 $\beta$ -HSD, cyclophilin の PCR の電気泳動パターン B, 内部標準 cyclophilin に対するステロイド合成酵素の mRNA 量。数値はそれぞれ 4 個体からの値を平均化して標準誤差で表した。\*印は Fisher's PLSD テストによる ANOVA 解析により 対照群に対して有意な差が検出されたことを示す(\*\* p < 0.01)。注目すべき点は、P450scc mRNA 発現量が PCB126 の用量依存的に増加したこと、また P450c17 mRNA 発現量は 1000 nM の PCB126 で有意に増加したこと、3 $\beta$ -HSD, 17 $\beta$ -HSD の mRNA 発現量には用量依存的な変化が認められなかったことである。

表 1. 半定量 RT-PCR 法に使用したプライマー

Genes	Primer sequence (5'-3')		Product size (bp)	GenBank accession No.
	Forward primer	Reverse primer		
Hsp86	AACCAATGGGTCGTG GAACAAAG	ACAGATCAAAGGAGC GCGTCTT	512	M36830
Calnexin-t	TGCTAGCAGACACTG GTGATTTG	TGACTCTAGATGCCCG ATCTCTC	1418	U08373
Protamine-2	GGTTCGCTACCGAAT	CTTCGGGATCTTCTGC	422	X07626
ABP	GA CTATGCCTGAGACAA	A ATAGAAAGGACTTCCA	660	NM011367
P450sec	ATCTCTGC CGCTCAGTGCTGGTC	TCTTTGC GGTTGAGCATGGGGA	714	AF195119
P450c17	AAAG	CACT TCTTCAACCACGGGAA	655	M64863
3 $\beta$ -HSD	CTTGTGGGTCTCTTG CTGCTCAT	TATGTCC TGGAGAATTGCCAGT	595	M58567
17 $\beta$ -HSD	ATGTTGGTGCAGGA GAAAGAACT	AACACAC GGAATCGTTGAGCGGT	492	U66827
CYP1A1	ACAACGTTGGAATGC TCCCCAGC	GCTGCTA TGGTCTGGTGAGCATC	734	NM009992
Cyclophilin	CTCATTGAGCATTGT CAGGACAG	CTGGACA TAGCACATCCATGCCC	382	M60456
G3PDH	TGGAGATGAATCTGT AGGACGAG AGTGGAGATTGTTGC CATCAACGA	TCTAGAA GGGAGTTGCTGTTGAA GTCGCAGGA	791	NM008084

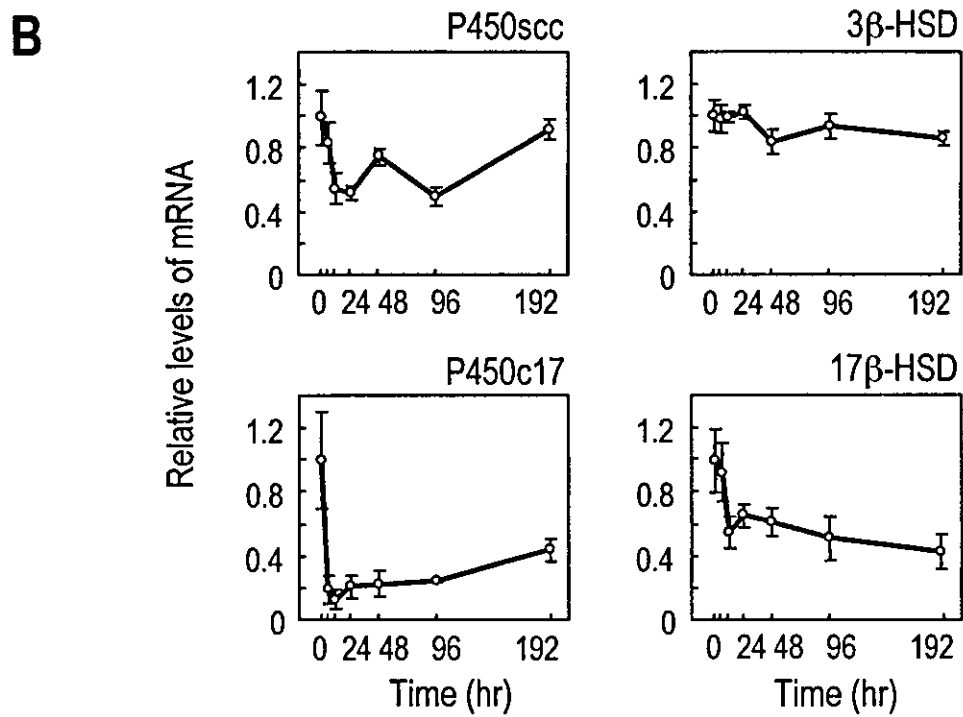
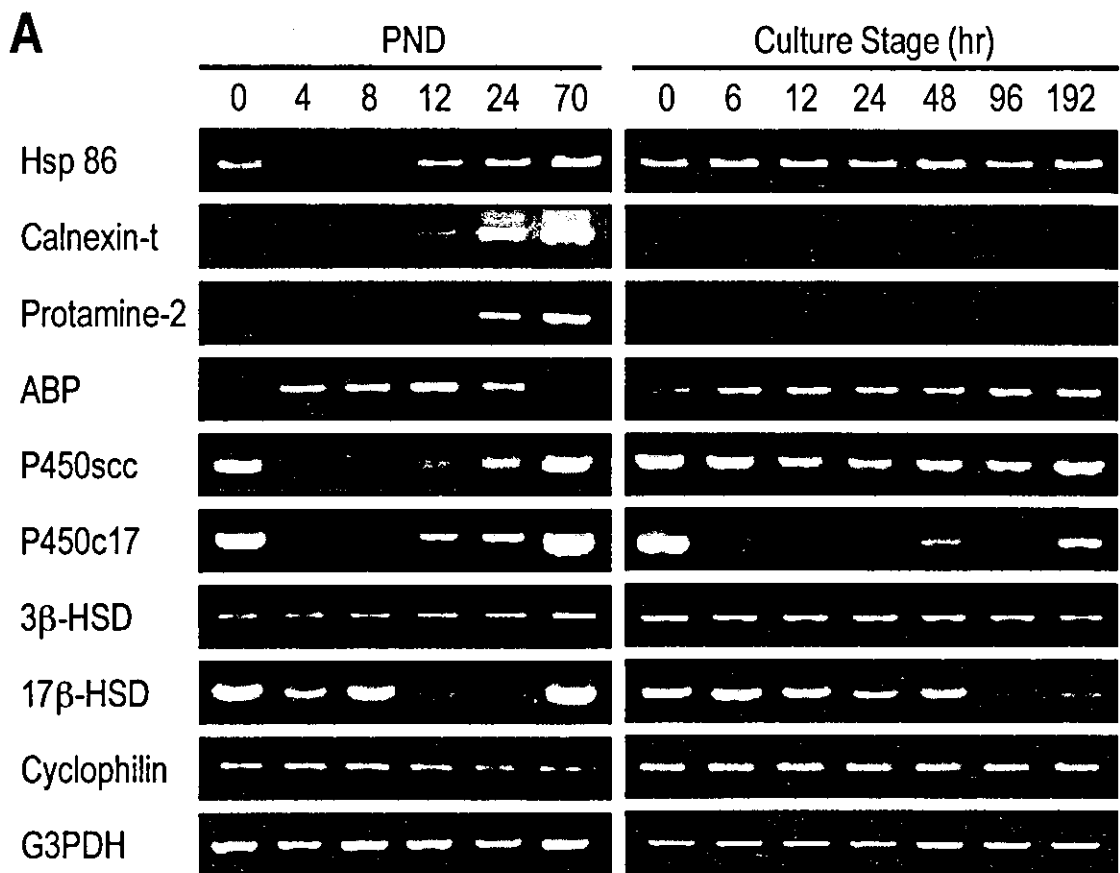
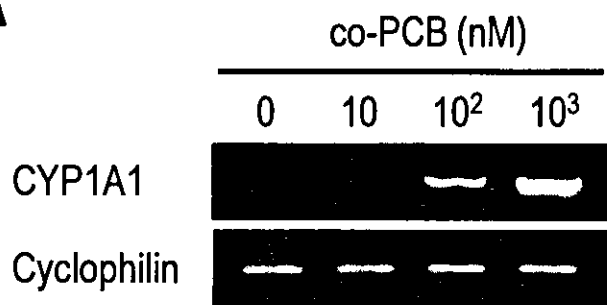
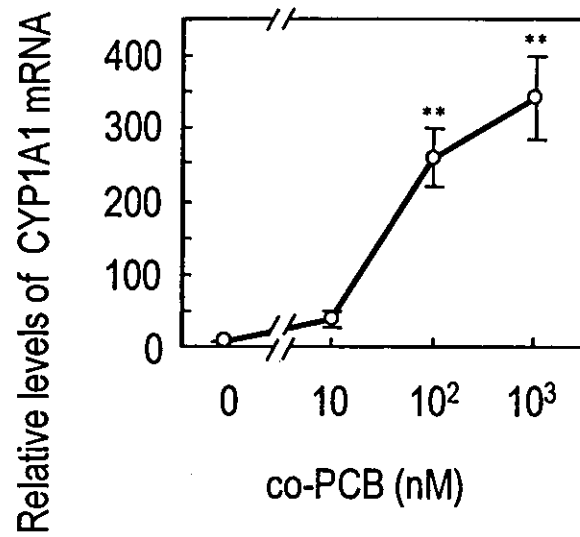
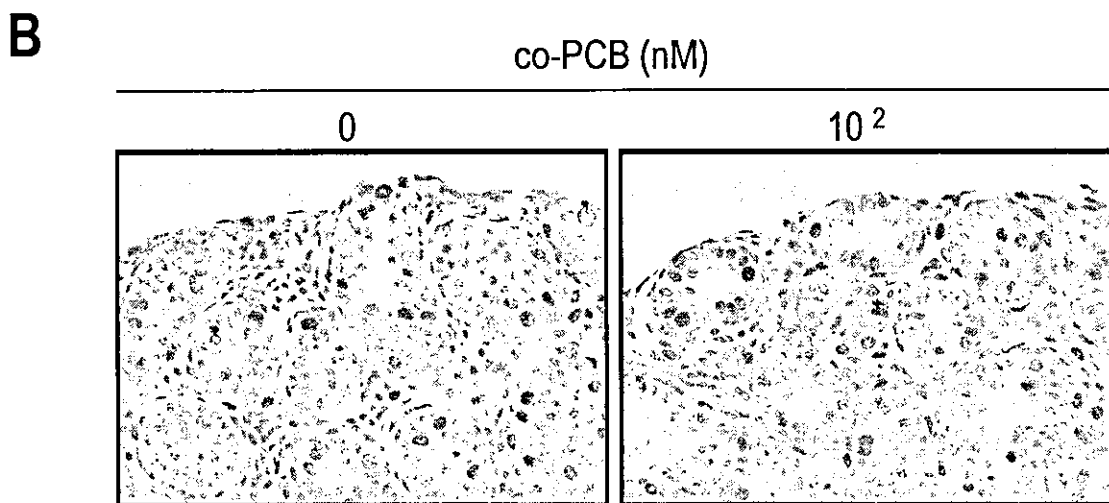
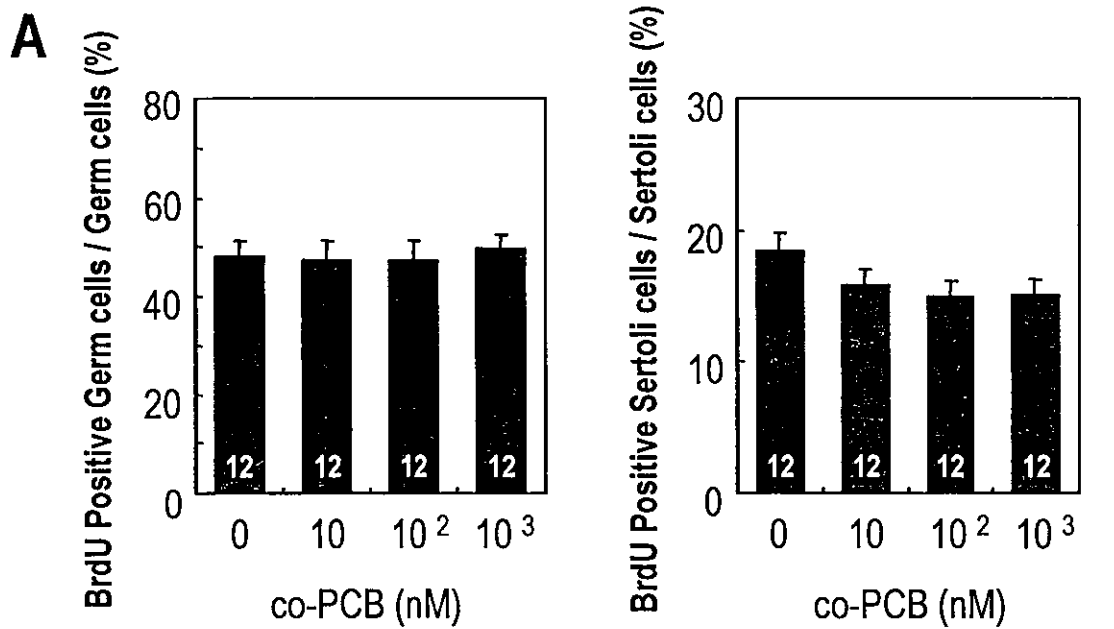


图 1

**A****B**





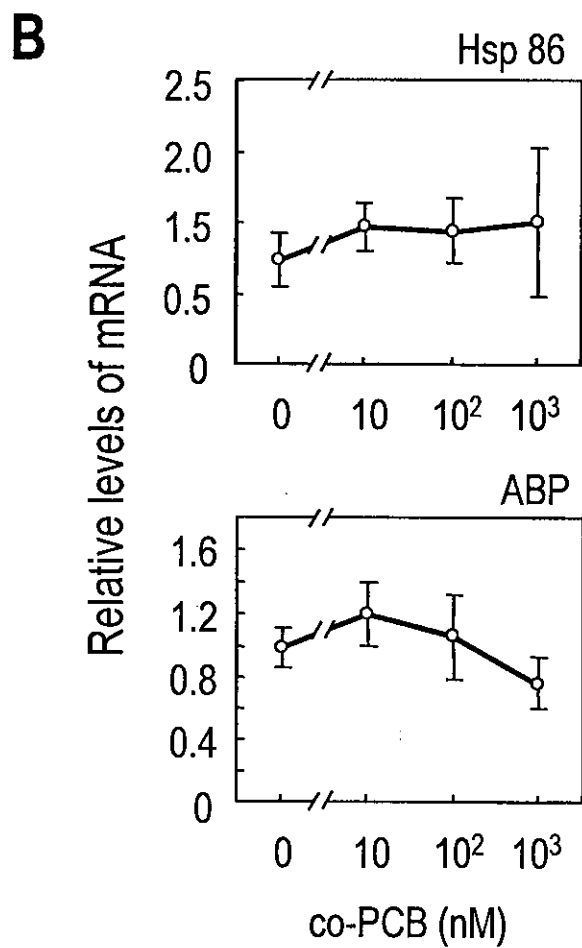
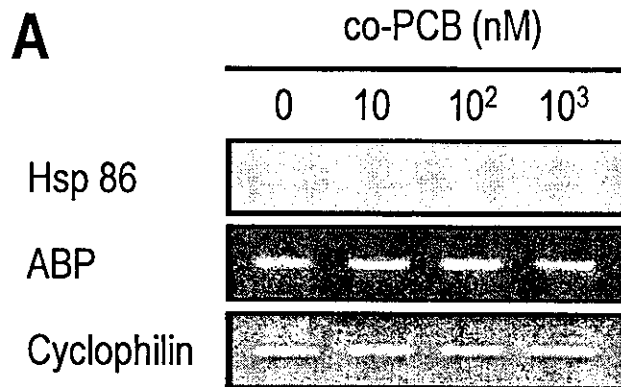


图 4

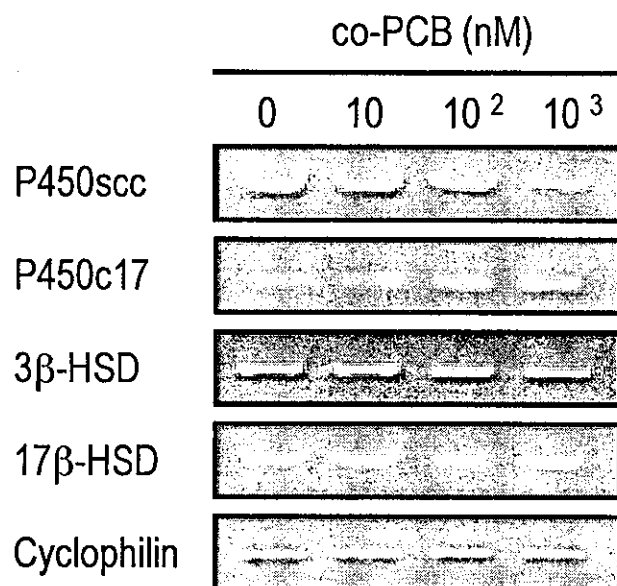
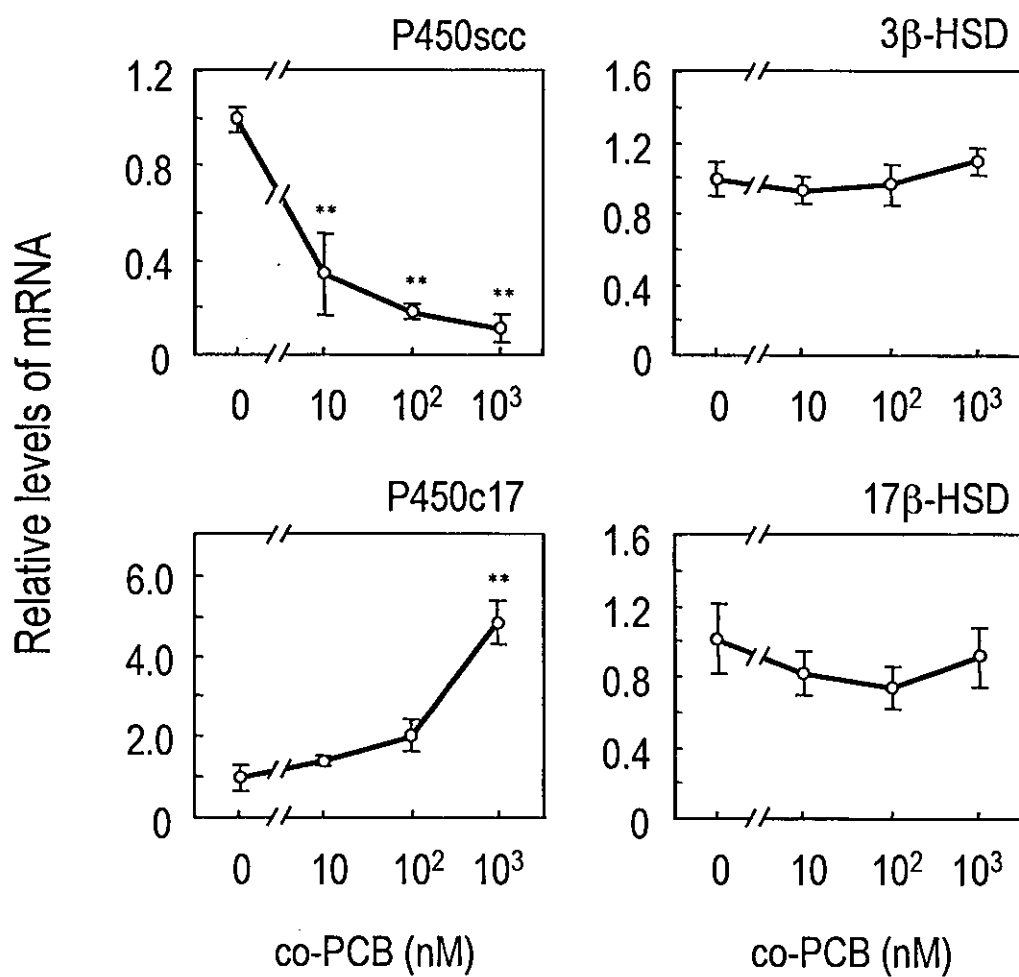
**A****B**

图 5

(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 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

これまで、主にラットを用いた実験系により、妊娠 15 日目に TCDD を単回投与すると生まれてきた雄の前立腺腹葉の重量が対照群に比べて有意に減少すること、またこの現象は、妊娠後期（妊娠 18 日目）や出生後の曝露では起きないことから、臨界時期が存在することを報告した。本研究では、この現象を起こす TCDD と AhR に依存性の遺伝子を探索するため、野生型マウスに同一用量 TCDD (10 µg/kg) を GD13 または GD17 に投与し、24 時間後に雄胎仔の全 RNA を回収し、マイクロアレイ解析を行うことで、その原因遺伝子の探索を試みた。その結果、132 遺伝子が GD13-TCDD 投与群で発現促進（アップレギュレーション）(ratio > 1.5) され、239 遺伝子が発現抑制（ダウンレギュレーション）(ratio < 0.67) されることがわかった。しかしながら、そのうち GD17-TCDD 投与群でもアップレギュレーションあるいはダウンレギュレーションされる遺伝子は、それぞれわずか 14 と 38 遺伝子のみであった。GD13-TCDD 投与群でアップレギュレーションあるいはダウンレギュレーションされ、かつ GD17-TCDD 投与群でアップレギュレーションあるいはダウンレギュレーションされない遺伝子のうち、代謝系酵素遺伝子、細胞内シグナル伝達関連の遺伝子が特に多いことが解った。GD17 胎仔への TCDD 曝露は上記前立腺の発育遅延を起こさないことが報告されており、今回 GD13 で検出した遺伝子の中に AhR-ダイオキシン依存性の原因遺伝子がある可能性がある。

研究協力者

大迫 誠一郎 国立環境研究所環境健康研究領域

A 研究目的

ダイオキシン類の母体曝露により生じる生まれた子への影響の中でも、雄性生殖器官発育への影響は、実験動物を使用した報告で極めて低用量で起こるとされることから、ヒトの健康リスクを考える上でも極めて重要な現象の一つである (Mably *et al.*, 1992, Gray *et al.*, 1997, Roman *et al.*, 1998)。我々もこれまで、主にラットを用いた実験系により、妊娠 15 日目に TCDD を単回で投与すると生まれてきた雄の前立腺腹葉重量が対照群に比べて有意に減少することを確認している (Ohsako *et al.*, 2001)。またこの現象は、妊娠後期（妊娠 18 日目）や出生後の曝露では起きないことから、臨界時期が存在することも示された (Ohsako *et al.*, 2002)。

この胎仔期曝露による前立腺発育遅延という現象は、マウスでも同様に生じ、マウスにおいても臨界時期が存在することが報告されている (Lin *et al.*, 2002a)。さらに、この現象は胎仔の AhR 遺伝子に完全に依存しているが (Lin *et al.*, 2002b)、ダイオキシン曝露の代表的バイオマーカーである薬物代謝酵素 CYP1A1 や CYP1B1 の誘導は、妊娠後期および出生後の TCDD 曝露でも標的器官である泌尿生殖器複合体内部で観察されることから、このような変動遺伝子以外の臨界時期においてのみ感受性をもつ何らかの AhR 応答性遺伝子が原因遺伝子である推測される (Ohsako *et al.*, unpublished data)。

本研究においては、この現象を起こす TCDD と AhR に依存性の遺伝子を探索す

るため、野生型マウスに同一用量 TCDD (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) を GD13 または GD17 に投与し、24 時間後に雄胎仔の全 RNA を回収し、マイクロアレイ解析を行うことで、その原因遺伝子の探索を試みた。

## B 研究方法

2, 3, 7, 8-TCDD (純度は 99.5%、溶媒 n-nonane, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) は Cambridge Isotope Laboratory より購入、コーンオイルに溶解し、1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  にて使用した。したがって、ピークルには 2% n-nonane/corn oil を用いた。妊娠 3 日目の C57B/6J マウス (日本クレア) を購入し、妊娠 13 日目と妊娠 17 日目に TCDD を 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  母体重 (5 ml/kg) にて経口投与した。同一用量 (5 ml/kg) でピークルを対照群に同じく妊娠 13 日目と妊娠 17 日目に投与した。投与 24 時間目にエーテル麻酔下で胎仔を摘出し、液体窒素にて凍結、 $-80^{\circ}\text{C}$  で一次保存した。この胎仔サンプルを TRIZOL で処理し、トータル RNA とゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA を用いた SRY 遺伝子の PCR 解析により性判定を行い、そのうちの雄胎仔のみを選別した。各群 5 個体分の RNA サンプル 100  $\mu\text{g}$  を混合し、妊娠 13 日目 TCDD 投与群 (GD13-TCDD)、妊娠 17 日目 TCDD 投与群 (GD17-TCDD)、妊娠 13 日目ピークル投与群 (GD13-Vehicle)、妊娠 17 日目ピークル投与群 (GD17-Vehicle) とし、以下のマイクロアレイ解析に用いた。RNA サンプルはまず DNase I 処理し、逆転写により Cy3 ラベルした cDNA プロンプを作成した。この蛍光ラベルをマイクロアレイ (Atlas Glass Array Mouse 3.8 I (CLONTECH, CA, USA)) にハイブリダイズし、洗浄後マイクロアレイスキャナー (GenePix, Axon Instrument, CA, USA) にてスキャニングし、スポットインテンシティをソフトウェア (ArrayGauge software) で解析した。

## C 研究結果

妊娠 13 日目は C57B/6J マウスにおいて TCDD 曝露した際、産仔の前立腺発育遅延が最も顕著に見られるける臨界時期であることが報告されている (Lin *et al.*,

2002a)。一方、妊娠 17 日目の投与では前立腺発育遅延は観察されない。本研究では、この 2 つのステージで胎仔の感受性にどのような差があるのかマイクロアレイを用いて解析した。

本マイクロアレイ (Atlas Mouse Glass Array 3.8I, Clontech) は、3756 の遺伝子を搭載しているが (図 1)、822 遺伝子が今回のいずれか 4 つの投与群で有意なスポットとして検出された。そのうち、132 遺伝子が GD13-TCDD 投与群で発現促進 (アップレギュレーション) (ratio > 1.5) され、239 遺伝子が発現抑制 (ダウンレギュレーション) (ratio < 0.67) されることがわかった (図 2)。しかしながら、そのうち GD17-TCDD 投与群でもアップレギュレーションあるいはダウンレギュレーションされる遺伝子は、それぞれわずか 14 と 38 遺伝子のみであった。

## D 考察

GD13-TCDD 投与群でアップレギュレーションあるいはダウンレギュレーションされ、かつ GD17-TCDD 投与群でアップレギュレーションあるいはダウンレギュレーションされない遺伝子のうち、代謝系酵素遺伝子、細胞内シグナル伝達関連の遺伝子が特に多いことが解った。

今回は、TCDD 曝露後の胎仔全体を用いてマイクロアレイの材料に用いている。臨界時期特異的に、泌尿生殖複合体への TCDD 作用が、生後の雄性生殖器官の発達に影響を及ぼすことから、現在、非泌尿生殖複合体を摘出することによる遺伝子の網羅的検討を行っている。胎仔全体の解析結果との比較をすることも、原因遺伝子の特定に役立つことであろう。さらに、PCB の非 TCDD 毒性の同定のための検討も解析中である。

## E 結論

以上の結果は、GD13 のマウス胎仔が GD17 胎仔とは異なる TCDD 応答性遺伝子のセットを発現していることを意味している。GD17 胎仔への TCDD 曝露は上記前立腺の発育遅延を起こさないことが報告されており、今回 GD13 で検出した

遺伝子の中に AhR-ダイオキシン依存性の原因遺伝子がある可能性がある。

## F 参考文献

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

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

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

Faqi, A. S., Dalsenter, P. R., Merker, H. J., and Chahoud, I. (1998). Reproductive toxicity and tissue concentrations of low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in male offspring rats exposed throughout pregnancy and lactation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 150, 383-392.

Ohsako, S., Miyabara, Y., Nishimura, N., Kurosawa, S., Sakaue, M., Ishimura, R., Sato, M., Aoki, Y., Sone, H., Tohyama, C., and Yonemoto, J. (2001). Maternal exposure to a low dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) suppressed the development of reproductive organs of male rats: dose-dependent increase of mRNA levels of 5 $\alpha$ -reductase type 2 in contrast to decrease of androgen receptor in the pubertal ventral prostate. *Toxicol. Sci.* 60, 132-143.

Theobald, H. M., Roman, B. L., Lin, T. M., Ohtani, S., Chen, S. W., and Peterson, R. E. (2000). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin inhibits luminal cell differentiation and androgen responsiveness of the ventral prostate without inhibiting prostatic Salpha-dihydrotestosterone formation or

testicular androgen production in rat offspring. *Toxicol. Sci.* 58, 324-338.

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

Lin TM., Simanainen U., Moore RW., Peterson RE. Critical windows of vulnerability for effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on prostate and seminal vesicle development in C57BL/6 mice. *Toxicol Sci* 69 (1), 202-209, (2002a)

Lin TM., Ko K., Moore RW., Simanainen U., Oberley TD, Peterson RE. Effects of aryl hydrocarbon receptor null mutation and in utero and lactational, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin exposure on prostate and seminal vesicle development in C57BL/6 mice. *Toxicol Sci* 68 (2), 479-487, (2002b)

## G. 健康危険情報 特に無し

## H. 知的財産権の出願・登録状況

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

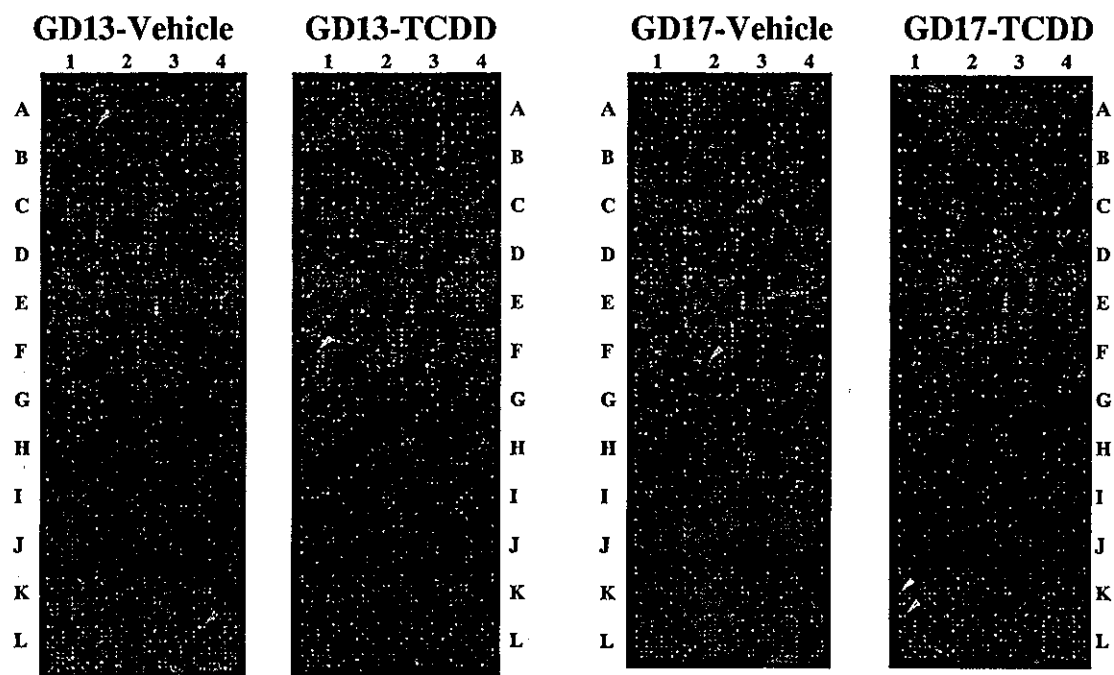
## I. 図の説明

図1 Atlas Mouse Glass Array 3.8I による胎仔期 TCDD 曝露による遺伝子発現変動解析。GD13-Vehicle, 妊娠 13 日目 Vehicle 投与雄胎仔サンプル; GD13-TCDD, 妊娠 13 日目 TCDD 投与雄胎仔サンプル; GD17-Vehicle, 妊娠 17 日目 Vehicle 投与雄胎仔サンプル; GD17-TCDD, 妊娠 17 日目 TCDD 投与雄胎仔サンプル。

図2. Atlas Mouse Glass Array 3.8I による胎仔期 TCDD 曝露による遺伝子発現変動解析結果。UP-GD13-Injected, 妊娠 13 日目 TCDD 投与雄胎仔で発現促進した遺伝群; UP-GD17-Injected, 妊娠 17 日目 TCDD 投与雄胎仔で発現促進した遺伝群;

DOWN-GD13-Injected, 妊娠 13 日目 TCDD  
投与雄胎仔で発現抑制した遺伝群;  
DOWN-GD17-Injected, 妊娠 17 日目 TCDD

投与雄胎仔で発現抑制した遺伝群。GD13  
投与および GD17 投与でともに発現促進  
した遺伝子が極端に少ないことに注意。



←: 変動の見られた典型的遺伝子

図 1

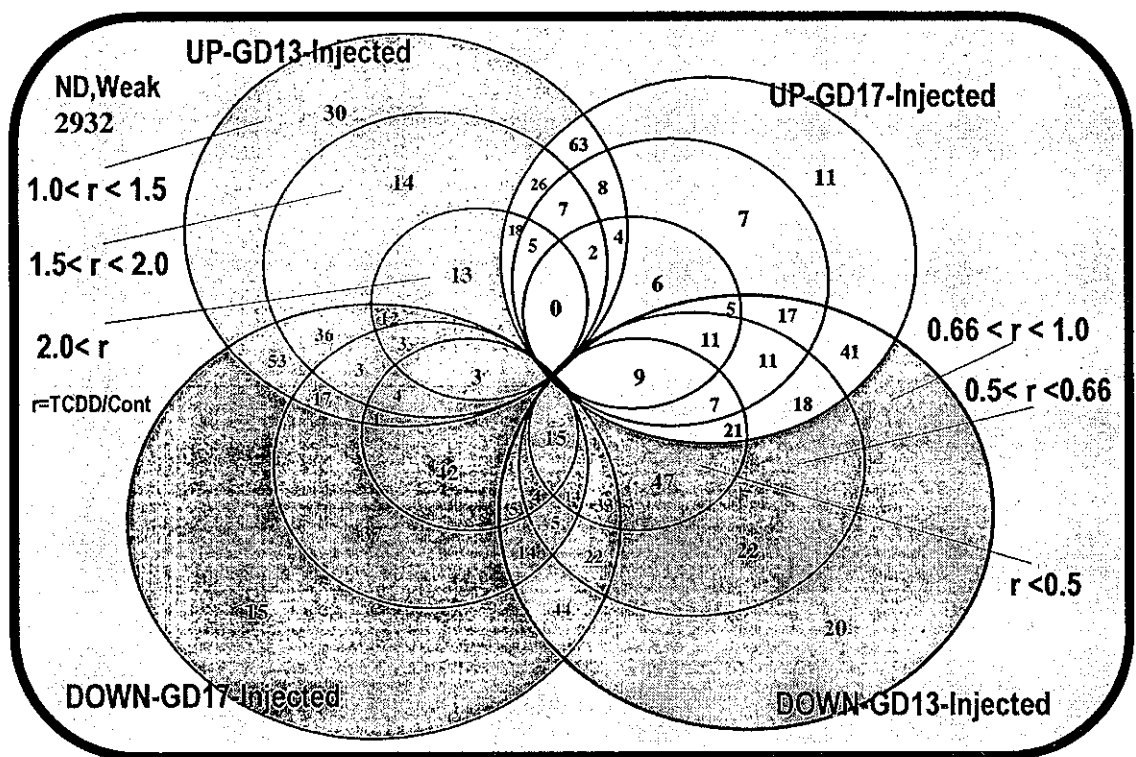


图 2



(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

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、鈴木順子 国立環境研究所環境健康研究領域

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 µg/kg) および PCB126 (10 µg/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 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。このサンプルからビオチン標識化RNAを合成、これをGeneChip Murine Genome U74Av2 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 > 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のものとしては、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(表2)。また、興味深い遺伝子としては、Connexin30, 17β-HSDII, Involucrin, 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). Inutero 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.  
Screening by microarray analysis for genes  
that alter prostate development in  
C57BL/6J mice exposed in utero to  
2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin.  
Organohalogen Compounds. 66,  
3286-3289, (2004)

Faqi, A. S., Dalsenter, P. R., Merker, H. J.,  
and Chahoud, I. (1998). Effects on  
developmental landmarks and reproductive  
capability of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl  
and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl in  
offspring of rats exposed during pregnancy.  
*Human & Experimental Toxicology*  
17, 365-372.

Evans, W. H., and Martin, P. E. (2002). Gap  
junctions: structure and function (Review).  
*Mol Membr Biol* 19, 121-36.

Robinson, N. A., Lopic, S., Welter, J. F., and  
Eckert, R. L. (1997). S100A11, S100A10,  
annexin I, desmosomal proteins, small  
proline-rich proteins, plasminogen  
activator inhibitor-2, and involucrin are  
components of the cornified envelope of  
cultured human epidermal keratinocytes. *J  
Biol Chem* 272, 12035-46.

#### G. 健康危険情報

特に無し

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特に無し

2. 実用新案取得

特に無し

3. その他

特に無し