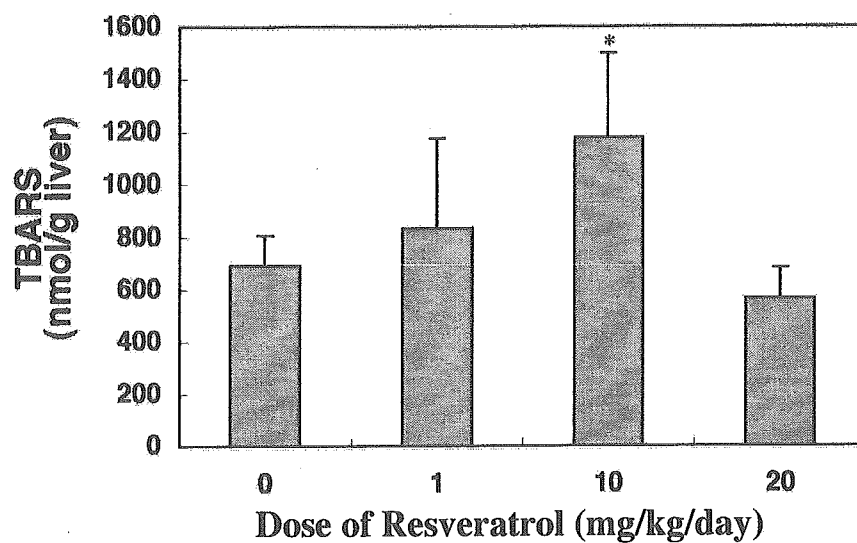


**Fig. 5.** Ethoxyresorufin *O*-deethylation (EROD) activity in liver S9 fraction of C57BL/6J mice after administration of Resveratrol

The values represent the mean  $\pm$  S.D. of 5-6 mice.



**Fig. 6.** Hepatic thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) contents of C57BL/6J mice after administration of Resveratrol

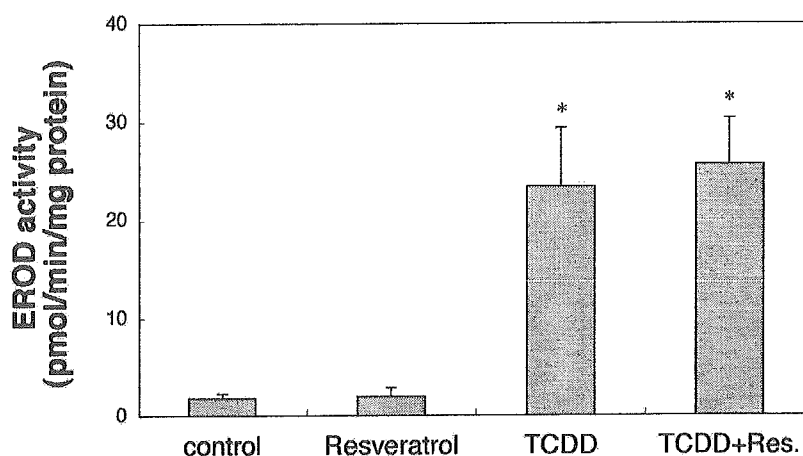
The values represent the mean  $\pm$  S.D. of 5-6 mice. Significantly different from the control group; \*,  $p < 0.05$ .



**Table 2.** Effects of Resveratrol and TCDD on the tissue weight of C57BL/6j mice in Experiment 2.

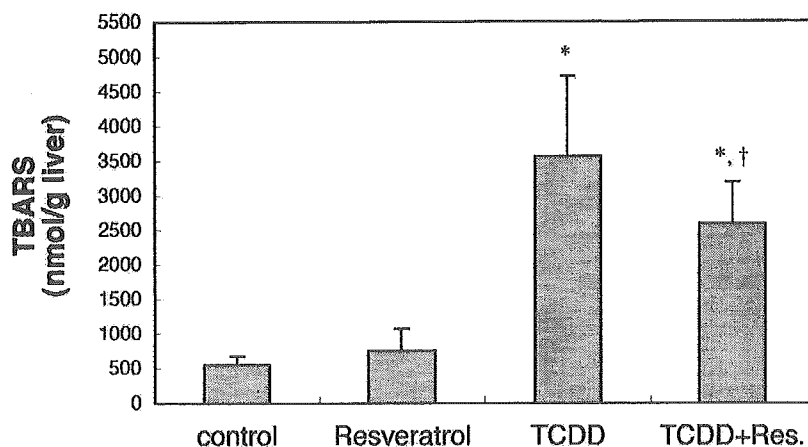
	(% of body weight)		
	Liver	Spleen	Thymus
Control	4.938 ±0.317	0.283 ±0.036	0.135 ±0.007
Resveratrol	4.817 ±0.219	0.258 ±0.014	0.143 ±0.015
TCDD	8.423 ±0.433*	0.199 ±0.063*	0.047 ±0.027*
TCDD+Res.	8.152 ±0.463	0.239 ±0.056	0.068 ±0.033*

The values represent the mean ± S.D. of 4-6 mice. Significantly different from the control group; \*, p<0.05. A mouse in the TCDD group was died on 24th day after TCDD-treatment. That was excluded from the analysis.



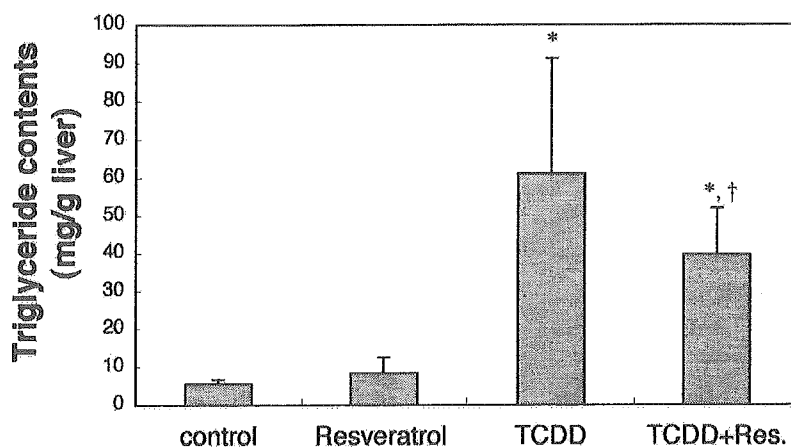
**Fig. 9.** Ethoxyresorufin *O*-deethylation (EROD) activity in liver S9 fraction of C57BL/6J mice after administration of Resveratrol and TCDD in experiment 2

The values represent the mean ± S.D. of 4-6 mice. Significantly different from the control group; \*, p<0.001. A mouse in the TCDD group was died on 24th day after TCDD-treatment. That was excluded from the analysis.



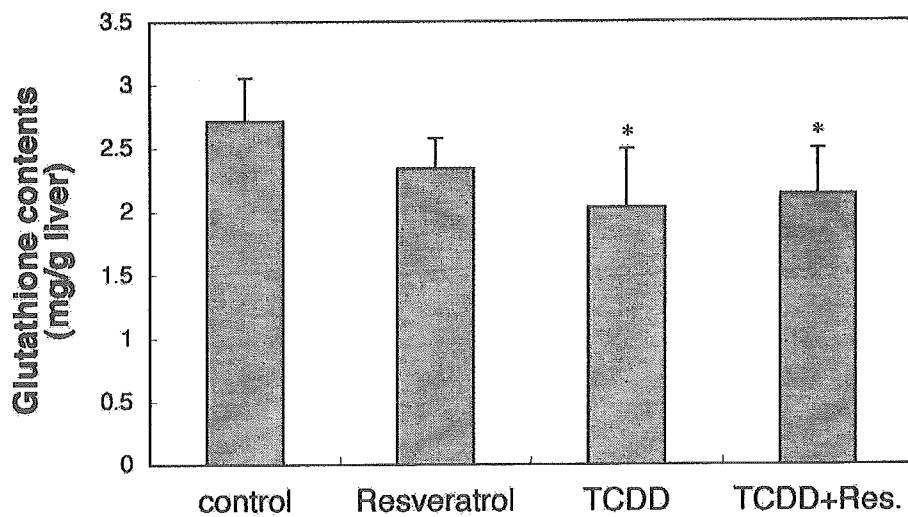
**Fig. 10** Hepatic TBARS contents of C57BL/6j mice after exposure to Resveratrol and TCDD in experiment 2

The values represent the mean  $\pm$  S.D. of 4-6 mice. Significantly different from the control group; \*,  $p < 0.001$ . Significantly different from the TCDD group; †,  $p < 0.05$ . A mouse in the TCDD group was died on 24th day after TCDD-treatment. That was excluded from the analysis.



**Fig. 11** Hepatic triglyceride contents of C57BL/6J mice after exposure to Resveratrol and TCDD in experiment 2

The values represent the mean  $\pm$  S.D. of 4-6 mice. Significantly different from the control group; \*,  $p < 0.001$ . Significantly different from the TCDD group; †,  $p < 0.05$ . A mouse in the TCDD group was died on 24th day after TCDD-treatment. That was excluded from the analysis.



**Fig. 12** Hepatic glutathione contents of C57BL/6J mice after exposure to Resveratrol and TCDD in experiment 2

The values represent the mean  $\pm$  S.D. of 4-6 mice. Significantly different from the control group; \*,  $p < 0.05$ . A mouse in the TCDD group was died on 24th day after TCDD-treatment. That was excluded from the analysis.

## 分担研究報告書

### ダイオキシンの精巣ステロイドに対する影響の解析

分担研究者 山田 英之 九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学専攻分野 教授  
研究協力者 石井 祐次 九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学専攻分野 助教授  
石田 卓巳 九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学専攻分野 助手

**研究要旨** ダイオキシン類は、多岐に亘る毒性を有するが、胎仔期に曝露した個体に観察される性成熟の遅延や性行動不全、および精子数の減少等の生殖に関わる毒性は重要な問題の一つである。本研究では、この機構を明らかにするため、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) 曝露がラット胎仔の性ホルモン合成、並びに脳下垂体ホルモンの生成に及ぼす影響について検討を行った。その結果、TCDD 曝露ラット胎仔の精巣において、steroidogenic acute-regulatory protein (StAR) および Cytochrome P450 (CYP) 17 の mRNA 量の減少が認められた。また、タンパク質量 (StAR) もしくは活性 (CYP17) に関しても、mRNA 量の変動と同様低下することが明らかとなった。この StAR、並びに CYP17 の発現低下は、出生後消失していた。また、培養ラット胎仔精巣細胞における TCDD 曝露では、StAR、並びに CYP17 の発現低下は観察されなかった。一方、TCDD 曝露胎仔の脳下垂体における黄体形成ホルモン (luteinizing hormone : LH)  $\beta$  subunit の mRNA の発現量の低下も観察されたが、その制御因子である視床下部における gonadotropin releasing hormone の mRNA の発現量は変化しなかった。以上の結果から、TCDD による生殖毒性には、ターゲット因子として LH が挙げられ、このシグナルの攪乱による性ホルモンバランスの崩壊、特に精巣におけるステロイドホルモン合成能の低下が主な要因の一つである可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

1968年に発生したカネミ油症事件から37年が経過した現在、当初油症患者にみられた客観的な症状は徐々にではあるが改善される傾向にある。さらに、近年、ダイオキシン類対策特別措置法の施行により環境中への排出規制が行われた結果、我が国のダイオキシン類による汚染状況は

年々改善傾向にある。しかし、油症患者の血中ダイオキシンレベルは健常人に比べ未だ高い値を示しており(1)、様々な自覚症状に悩まされている患者も多い。また、その難分解性および高蓄積性から、環境中のダイオキシンが食物連鎖を介してヒトに曝露され続ける状況は今後も続くであろうと考えられている。このため、ダイオ

キシンの毒性の軽減や予防法の構築は、今でも社会的な注目を集めており、重要な研究課題の一つとなっている。実験動物による研究等から、ダイオキシン類は、内分泌異常、免疫毒性、催奇形性、発ガンプロモーション、胸腺や脾臓の萎縮、酸化ストレスの増加など生体に対して多岐に亘る障害を引き起こすことが知られている(2)。また、ダイオキシンの毒性発現において、細胞の可溶性画分に存在する特異的な受容体 [arylhydrocarbon receptor (AhR)] の関与を示す結果が、多くの研究者より報告されている。しかし、AhR を介さない毒性発現機構の存在も示唆されていることから、その詳細については未だ不明な点も多い。

妊娠中にダイオキシン曝露を受けた場合、その仔において催奇形性、成長障害、並びに生殖器官の発育遅延が惹起されることが報告されている(3,4)。特に性行動異常や精子数の減少などの生殖機能障害は、後世代に影響を及ぼすことから深刻な問題となっている。このダイオキシン曝露による次世代の生殖機能の障害は、発ガン性や体重増加抑制などとは異なり、極低用量の曝露で引き起こされることが報告されている(3)。このため、排出規制が強化された現在であっても発症する可能性はあり、ヒトを含めた生態系への影響が懸念されている。一方、同様の生殖機能障害は、エストロゲン合成酵素 (CYP19; aromatase) や androgen receptor および estrogen receptor のノックアウトマウス等でも報告されている(5-7)。このことから、ダイオキシンによる生殖機能障害

は、ダイオキシンが性ステロイド機能に何らかの影響を及ぼして惹起される可能性が考えられる。また、CYP19 ノックアウトマウスを用いたケースでは、ダイオキシンにより低下した性行動は、成長後にエストロゲンを投与しても回復しないことが報告されている(8)。すなわち、胎仔期、もしくは新生仔期特異的な性ステロイドの障害が、成長後の不可逆的な生殖障害を引き起こす可能性が示唆されている。従って、胎仔や新生仔における性ステロイド機能障害は、ダイオキシン類によって引き起こされる生殖障害発現機構解明に向けて鍵となる可能性が考えられる。

ダイオキシン類曝露による性ステロイド機能障害としては、既に性ホルモン合成酵素の変動等が報告されている。しかし、その多くは成獣における高用量曝露の場合であり実際の生態系を介した曝露を反映していないことが問題視されている。特に、妊娠動物への低用量曝露によって引き起こされる仔での生殖障害は、ほとんどが成長後の評価であり、胎仔や新生仔期でどのような障害が発生しているかを解析している例はほとんどない。そこで本研究では、TCDD 曝露ラットの胎仔における性ステロイド機能の障害性の実証と機構解析を目的に検討を行った。

## B. 研究方法・研究結果

### TCDD 曝露ラット胎仔精巣におけるステロイドホルモン合成系への影響

ステロイドホルモンの合成は、ステロイド産生臓器において、細胞質にあるコレステロールがミトコンドリア内膜へ輸送さ

れることから始まる。その後コレステロールは複数の酵素による反応を受けて、ステロイドホルモンに変換される (Fig. 1)。中でも、Steroidogenic acute-regulatory protein (StAR) はコレステロールをミトコンドリア内膜に輸送するトランスポーターであり、ステロイドホルモン生合成の律速段階を制御していると考えられている。一方、CYP17は $17\alpha$ 位の水酸化とその水酸化物の $17, 20$ 位のリアーゼ反応を行い、糖質コルチコイドと性ホルモン生合成経路の分岐点に位置する重要な酵素である。そこで、本研究では、TCDDの胎仔ステロイドホルモン合成系への影響の解析対象として、StARと共にCYP17にも注目して検討を行った。

妊娠15日目のWistar系ラットにTCDDを $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 単回経口投与し、その後、妊娠20日目に胎仔より臓器を摘出した。コントロール群には、TCDDの溶媒であるcorn oilを体重あたりの投与量が等しくなるように経口投与した。本研究における実験動物の取り扱いは、九州大学大学院薬学研究院、大学院薬学府および薬学部における実験動物に関する指針に従って行った。初めに、TCDDの胎仔への曝露を確認するため、胎仔肝臓におけるCYP1A1のmRNAの発現量を半定量的 reverse transcriptional-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法により検討した (Fig. 2(A))。その結果、妊娠ラットへのTCDD投与により、胎仔の肝臓においてCYP1A1のmRNAが顕著に誘導されていることが確認された。またCYP1A subfamilyの活性の指標である

ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) 活性の測定も行ったが、mRNAの発現量と同様、TCDD曝露群において顕著な活性の上昇が認められた (Fig. 2(B))。以上の結果から、妊娠ラットへのTCDD $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 単回投与により、TCDDが胎仔へ移行し、遺伝子変動を引き起こしていることが確認された。

次に、TCDDによる胎仔へのステロイド合成系への影響を検討するため、胎仔精巣におけるStARおよびCYP17のmRNA発現量を半定量的 RT-PCR 法により解析した。なお、内標準として $\beta$ -actinを使用した。その結果、TCDD曝露により、StARおよびCYP17 mRNAの発現量が有意に低下することが明らかとなった (Fig. 3)。また、このmRNAの変動は、タンパク質の発現量 (StAR, Fig. 4) もしくは $[^{14}\text{C}]$ -progesterone を用いた17-hydroxyprogesterone 生成活性 (CYP17, Fig. 5) と一致するものであった。

さらに、この胎仔期におけるTCDD曝露に伴うStAR、並びにCYP17の発現低下が、出生後も継続するか否か検討するため、妊娠15日目にTCDD $1\mu\text{g}/\text{kg}$ もしくはcorn oilを単回経口投与したのち、新生仔が産まれた日を妊娠後0日目として、そのまま母親ラットとともに飼育した。その後、妊娠後7日目の新生仔より精巣を摘出し、先の実験と同様に半定量的 RT-PCR 法を用いてStAR mRNA発現量を解析した (Fig. 6)。その結果、胎仔で見られたTCDDによるStAR発現量の減少 (Fig. 3) は、新生仔においては観察されなかった。これより、TCDDによるStARの減少は胎仔期に



特異的な現象であることが示唆された。

### 培養細胞系における TCDD による胎仔精巢のステロイド合成関連因子への影響

TCDD による胎仔精巢への影響が直接的な作用であるか否か検討するため、培養組織を用いて同様の検討を行った。TCDD 未処理の妊娠 20 日目のラット胎仔より精巢を摘出し、無血清 MEM 培地中にて 100 nM TCDD を添加して 24 時間培養した。その後、StAR および CYP17 の mRNA の発現量を半定量的 RT-PCR 法にて解析した。また、コントロールには TCDD の溶媒である DMSO のみを添加した。ところで、StAR および CYP17 の発現は protein kinase A (PKA) 活性化を介しており、cyclic AMP (cAMP) により制御されていることが知られている (9, 10)。そこで、cAMP アナログの 8-Br-cAMP による StAR および CYP17 の発現誘導に、TCDD が影響を及ぼすか否かについても検討を行った。初めに、CYP1A1 mRNA の発現量について検討を行ったが、既報の通り TCDD による誘導が観察された (Fig. 7(A))。次に、8-Br-cAMP 非存在下において、TCDD による StAR および CYP17 の発現変動を観察したが、*in vivo* で観察されたような発現減少は確認できなかった (Fig. 7(B))。また、8-Br-cAMP の添加により StAR および CYP17 の mRNA 発現量は著しく上昇したものの、TCDD はこの誘導に影響を与えなかった。さらに、タンパク質レベルにおける発現変動も検討したが、mRNA において観察された結果と同様であった (Fig. 8)。以上の結果から、培養精巢において TCDD

は CYP1A1 誘導などの遺伝子変動を引き起こすにもかかわらず、StAR や CYP17 の発現には影響を与えないことが明らかとなった。従って、TCDD は胎仔の精巢に直接作用しない可能性が強く示唆された。

### TCDD による胎仔精巢のステロイド合成関連因子変動の機構解析

一般に、標的臓器における外的要因による機能性タンパク質の発現変動には、その標的臓器における外的要因の分布が不可欠な要因であると考えられている。しかし、ダイオキシン類の場合、標的臓器に存在しなくても他臓器での影響を通して標的臓器に障害を引き起こす場合もあり得ることが報告されている。先の検討から、胎仔精巢における StAR や CYP17 の発現低下は、精巢に対する TCDD の直接的な作用ではないことが示唆された。このため、TCDD はこれらの発現を制御する上位因子をターゲットとしている可能性が考えられた。一般に、成獣の精巢では、テストステロンの合成は主に性腺刺激ホルモンの一つである luteinizing hormone (LH) による調節を受けていることが知られている。また、胎仔の精巢においても、LH 応答性のテストステロン生合成の存在が報告されている (11)。LH は脳下垂体前葉において合成される糖タンパク質であり、 $\alpha$  subunit と  $\beta$  subunit から構成されるヘテロダイマーである。そこで本研究では、脳下垂体における LH に着目し、TCDD による mRNA 発現量の変動を解析した。先の検討と同様、妊娠 15 日目に TCDD を 1  $\mu$ g/kg 単回経口投与し、その後、妊娠 20 日目に

胎仔から脳下垂体を摘出し、これらの mRNA 発現量を半定量的 RT-PCR 法にて解析した。その結果、LH $\beta$  subunit mRNA の発現量が、TCDD 曝露により有意に低下することが明らかとなった (Fig. 9)。これに対し、LH $\alpha$  subunit の mRNA 量に変化は認められなかった。

ところで、胎仔の脳下垂体における LH  $\beta$  subunit は、さらにその上位因子である Gonadotropin releasing hormone (GnRH または luteinizing hormone releasing hormone) によって調節を受けている。GnRH は、視床下部で合成・分泌され下垂体に作用し、LH 等の性腺刺激ホルモンの合成・分泌を促進するホルモンである。そこで、次に、LH 発現の制御因子である GnRH が TCDD により影響を受けているか否か検討を行った。その結果、TCDD による mRNA 量の変化は観察されなかった (Fig. 10)。以上の結果から、TCDD 曝露マウス胎仔精巣における StAR、並びに CYP17 の発現低下は、脳下垂体における LH  $\beta$  subunit の発現低下が原因であることが示唆された。また、TCDD による LH の発現低下については、LH それ自身が標的である可能性が示唆された。

#### TCDD 曝露胎仔への性腺刺激ホルモン直接投与による影響

これまでの検討から、ラット胎仔における TCDD によるステロイド合成障害は、脳下垂体における LH の生合成障害を起点とする機構である可能性が考えられた。ところで、胎仔の精巣における StAR および CYP17 の低下が TCDD による LH の低

下に起因するのであれば、LH を補給することによりこの低下を回復できる可能性が期待された。そこで TCDD 曝露胎仔に LH 様作用を有するウマ絨毛性性腺刺激ホルモン [equine chorionic gonadotropin (eCG)] を直接投与し、StAR および CYP17 発現に与える影響を解析した。妊娠 15 日目のラットに TCDD 1  $\mu$ g/kg を経口投与し、その後、妊娠 17 日目に母体を麻酔下で開腹し、胎仔に直接 eCG (5.0 I.U.) を投与した。この際、左右の子宮の片側の胎仔に eCG を、もう片腹の胎仔には溶媒である PBS を背部皮下に投与した。その後胎仔を母体に戻し、妊娠 20 日目に胎仔より精巣を摘出した。半定量的 RT-PCR 法を用いて StAR および CYP17 の mRNA 発現量を解析した結果、いずれも TCDD 曝露により減少した発現量が、eCG の胎仔への直接投与により回復することが確認された (Fig. 11)。本検討結果は、TCDD による胎仔精巣での StAR および CYP17 の低下が、LH の低下に起因するという推定をよく支持した。

#### ラット胎仔脳下垂体培養細胞系における TCDD の影響

当研究室において、LH $\beta$  subunit 遺伝子の上流 (GenBank, Accession No. AF020505) における転写制御エレメントに関するコンピューター解析を行ったところ、-580 bp に AhR が結合する特異的配列である Xenobiotic responsive element のコア配列 (-GCGTG-) の存在が確認された。従って、TCDD により活性化された AhR が直接 LH $\beta$  subunit の遺伝子発現に影響

を与えている可能性が考えられた。そこで、これについて検討するため、ラット胎仔脳下垂体培養細胞を用いて検討を行った。TCDD 未処理の妊娠 20 日目ラットより胎仔の脳下垂体を摘出し、TCDD を添加した MEM 培地中にて 24 時間培養を行った後、半定量的 RT-PCR 法にて CYP1A1、LH  $\alpha$  subunit および  $\beta$  subunit の mRNA 発現量を解析した。その結果、TCDD による CYP1A1 の誘導は 1 nM の低濃度から観察されたにもかかわらず、LH  $\beta$  subunit は 100 nM の TCDD 添加においても有意な変動は認められなかった (Fig. 12)。むしろ、TCDD 100 nM の濃度においては誘導される傾向が認められた。一方、 $\alpha$  subunit に関しては、*in vivo* の場合と同様に TCDD による変動は観察されなかった。

### C. 考察

本検討より、TCDD 曝露ラット胎仔精巣において、StAR および CYP17 の発現量もしくは活性が有意に低化することが明らかとなった (Fig. 4)。また、この StAR の発現低下には、脳下垂体における LH レベルの発現量の低下が主な要因である可能性が示唆された (Fig. 9)。また、TCDD による StAR および CYP17 の発現低下は、eCG 直接投与により回復することから (Fig. 11)、TCDD の作用点は、視床下部-脳下垂体系のシグナリングにある可能性が示唆された。StAR は、精巣においてステロイド生合成の場であるミトコンドリアへのコレステロール輸送に関与しており、ステロイド生合成の律速酵素であると考えられている。以上の結果から、TCDD 曝

露ラット胎仔精巣において、ステロイドホルモン生合成能が著しく低下している可能性が強く示された。

LH は、脳下垂体において、視床下部から分泌される GnRH によって発現調節を受けるホルモンである。昨年度の報告において、TCDD 曝露により血漿中の LH レベルが低下することを明らかにしたが、この TCDD による LH レベルの低下は、脳下垂体における LH  $\beta$  subunit の発現低下に起因するものであり、その上位因子である GnRH は関与しないことが示唆された (Fig. 9 および 10)。ところで、LH は脳に貯蔵され、分泌されることが知られている。このことから、TCDD 曝露によって脳内 LH の貯蔵および分泌を制御する因子に影響を与えている可能性も考えられる。従って、今後は、TCDD 曝露胎仔脳における LH 貯蔵や分泌に関わる因子の発現変動にも着目し、研究を展開する必要があるのではないかとと思われる (Fig. 13)。また、胎仔期および新生仔期は分化・発達に極めて重要な時期であり、本研究で見いだされた種々の遺伝子の変動が障害へ繋がる可能性は十分にあると考えられる。しかし、本研究ではその変動によりどのような障害が発現するかは検討していない。この点に関しても、今後の課題として残った。

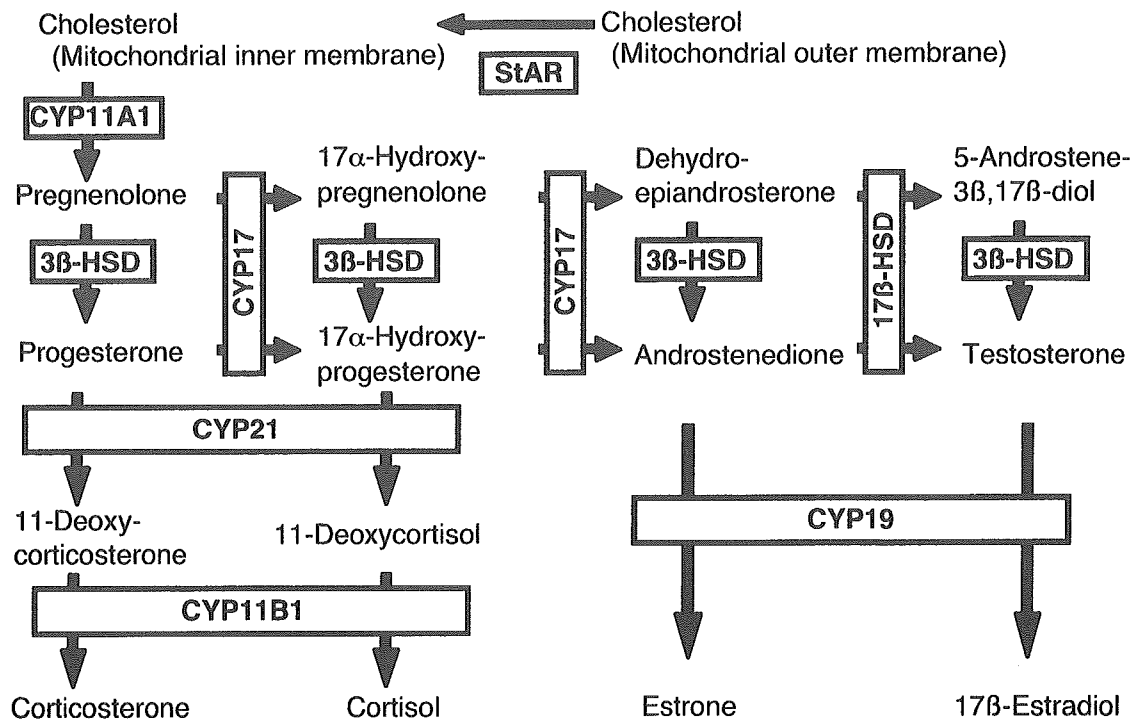
### E. 参考文献

- 1) Masuda, Y., *J. Dermatol. Sci.*, 1, 3-10 (2005)
- 2) Poland, A. and Knutson, J. C., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 22, 517-554 (1982).

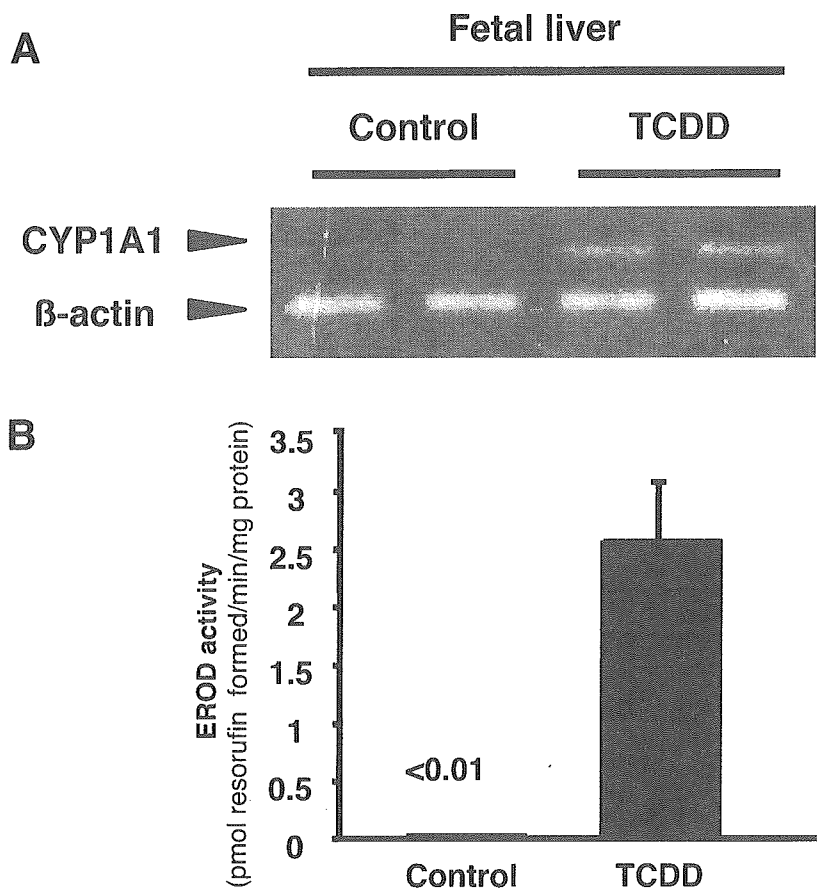
- 3) Peterson, R. E., et al., Crit. Rev. Toxicol., 23, 283-335 (1993).
- 4) Faqi, A. S., et al., Hum. Exp. Toxicol., 17, 365-372 (1998).
- 5) Honda, S., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 252, 445-449 (2003).
- 6) Ogawa, S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 14737-14741 (2000).
- 7) Sato, T., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101, 1673-1678 (2004).
- 8) Toda, K., et al., J. Endocr., 168, 455-463 (2001).
- 9) Jones, P. M., et al., J. Mol. Endocrinol., 24, 233-239 (2000).
- 10) Nason, T. F., et al., Biochim. Biophys. Acta, 1171, 73-80 (1992).
- 11) Migrenne, S., et al., Mol. Cell Endocrinol., 172, 193-202 (2001).

#### F. 研究発表

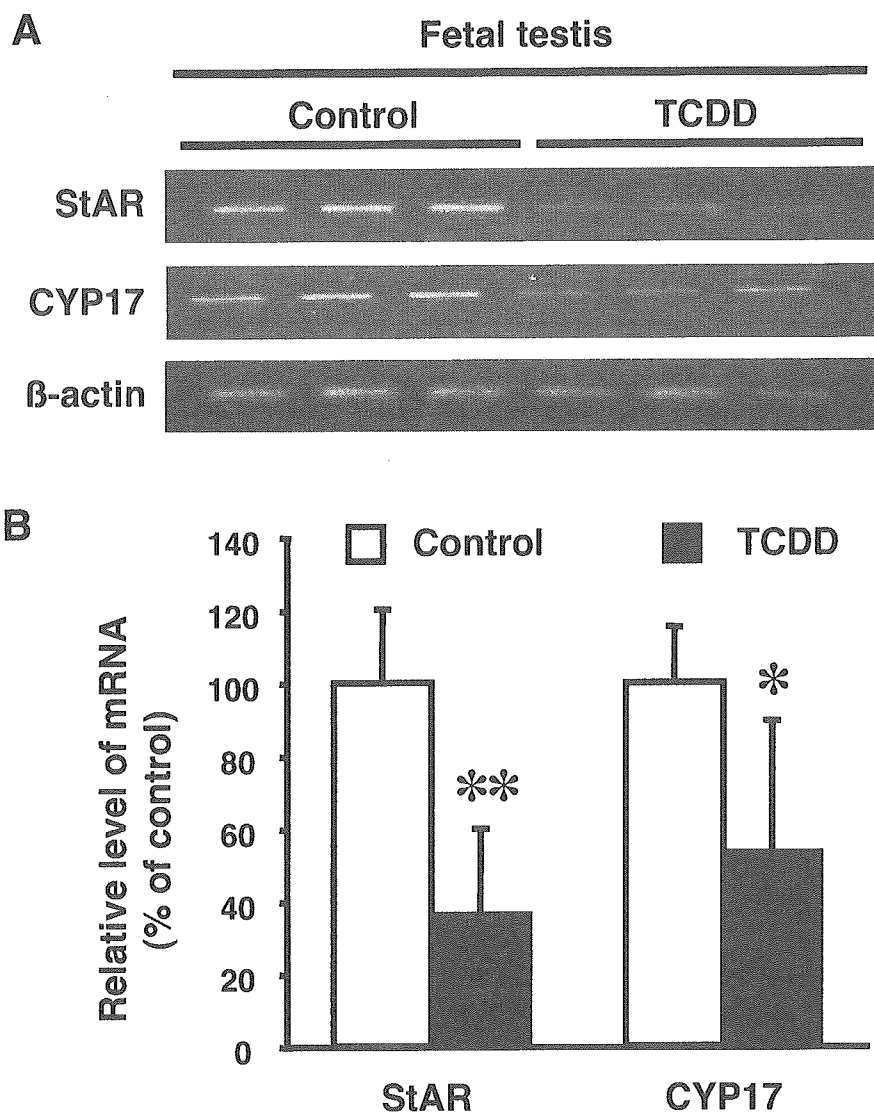
- 1) Mutoh, J., et al., Endocrinology, 147, 927-936 (2006).
- 2) フォーラム 2005 : 衛生薬学・環境トキシコロジー (徳島、2005 年 10 月)
- 3) 第 22 回日本薬学会九州支部大会 (福岡、2005 年 12 月)
- 4) 日本薬学会第 126 年会 (仙台, 2006 年 3 月) 予定



**Fig. 1. The pathways of steroidogenesis.**

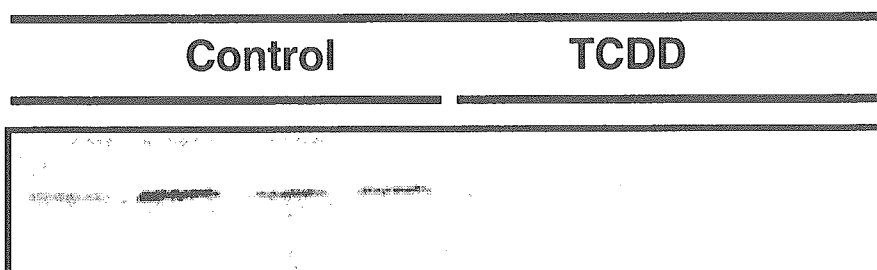


**Fig. 2. Induction of hepatic CYP1A1 in rat fetuses following exposure of the dam to TCDD (1.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  at GD15) (A) Comparison of the mRNA profiles between control and TCDD exposure analyzed by RT-PCR. (B) CYP1A1 enzyme activity was determined measuring ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) activity using 9,000  $\times$  g supernatant of fetal liver. The EROD activity of the control was below the determination limit ( $>0.01$ ). The value expressed is the mean  $\pm$  S.D. of 18 fetuses each 6 of which were removed from 3 different dams.**



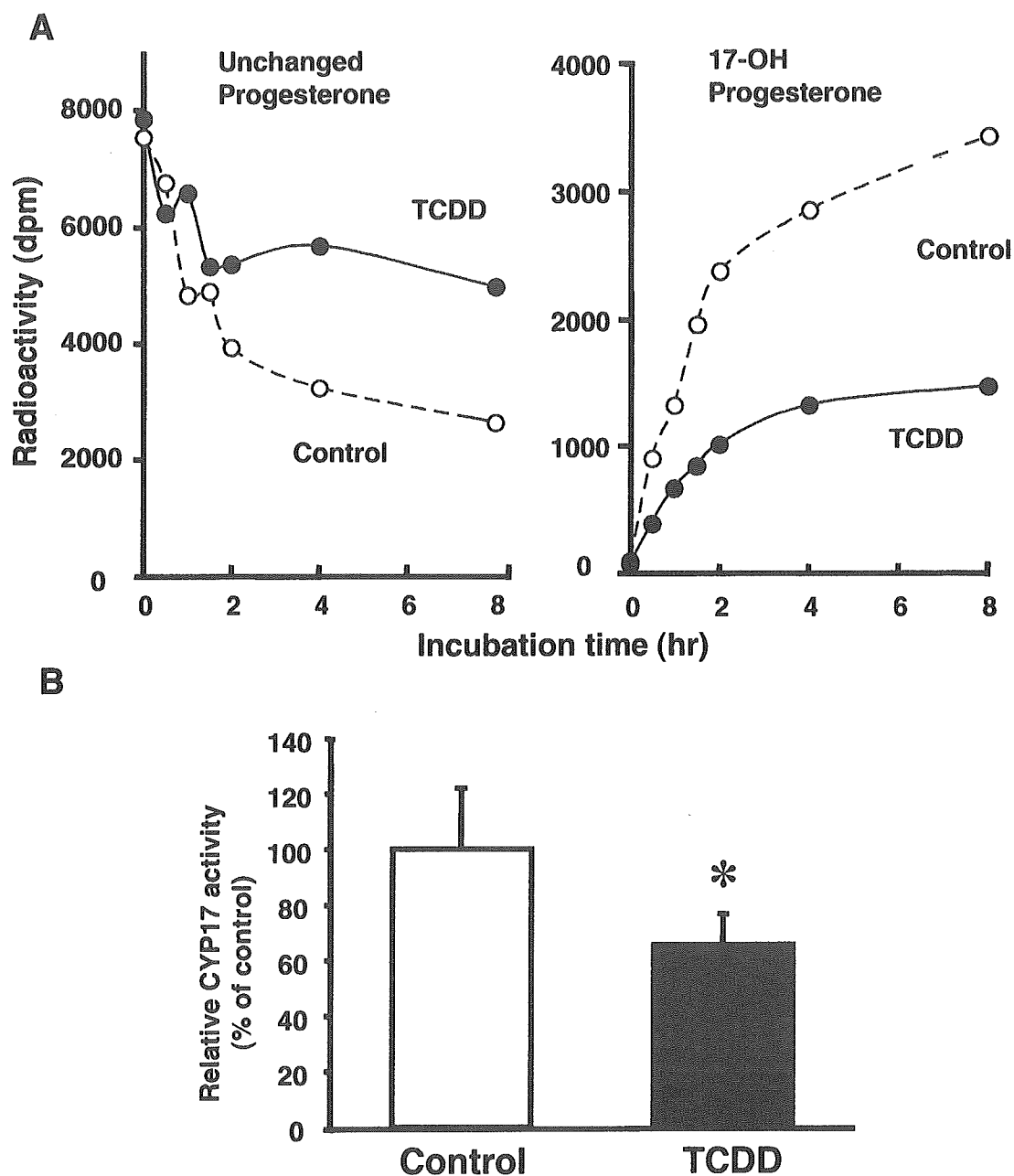
**Fig. 3.** Change in the expression of mRNAs coding StAR and CYP17 in rat fetal testis following exposure of the dams to TCDD (1.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  at GD15). (A) Comparison of the mRNA profiles between control and TCDD exposure. (B) Relative levels of the mRNAs in testis of rat fetus normalized to  $\beta$ -actin. The values expressed are the means  $\pm$  S.D. of 6 fetuses each 2 of which were removed from 3 different dams. Significant difference in mRNA levels between control and TCDD exposure was calculated using Student's *t* test (\*\*:  $p < 0.001$ ; \*:  $p < 0.05$ ).

## Fetal testis

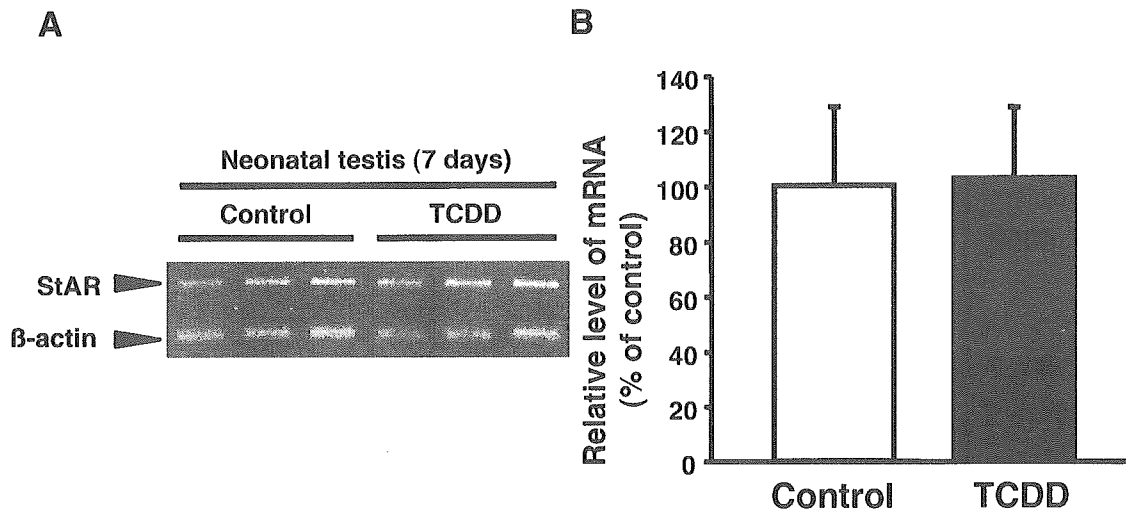


**Fig. 4.** Western blot analysis of StAR expression in rat fetal testis following exposure of the dams to TCDD (1.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  at GD15). Mitochondrial proteins were prepared from fetal pooled testes (4-9 individuals) which were removed from different dams. Mitochondrial fraction (30  $\mu\text{g}$  protein) was subjected to SDS-PAGE (13% gel) and immunoblotted with anti-StAR antibody.

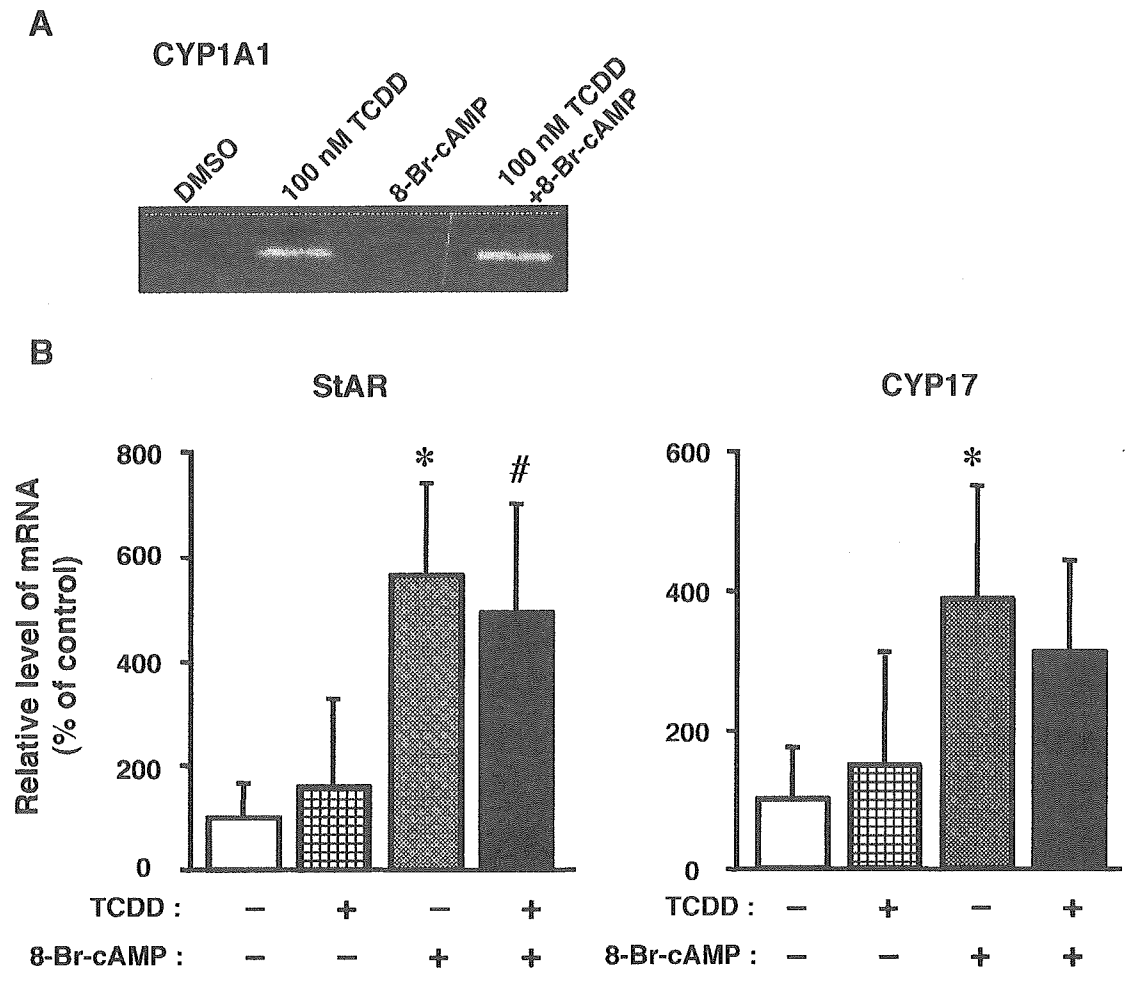




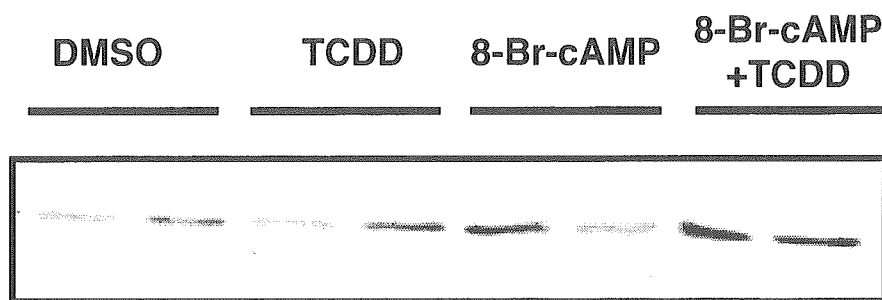
**Fig. 5.** Change in CYP17 activity in rat fetal testis following exposure of the dams to TCDD (1.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  at GD15). (A) Time course of progesterone consumption and 17-OH progesterone production (open circle: Control, closed circle: TCDD). (B) Relative CYP17 activity in fetal testis. CYP17 activity was assayed by measuring conversion of [ $^{14}\text{C}$ ]-progesterone to 17-OH progesterone (reaction time: 1.5 hr). The values expressed are the means  $\pm$  S.D. of 5 samples. Significant difference in CYP17 activity between control and TCDD exposure was calculated using Student's *t* test (\*:  $p < 0.05$ ).



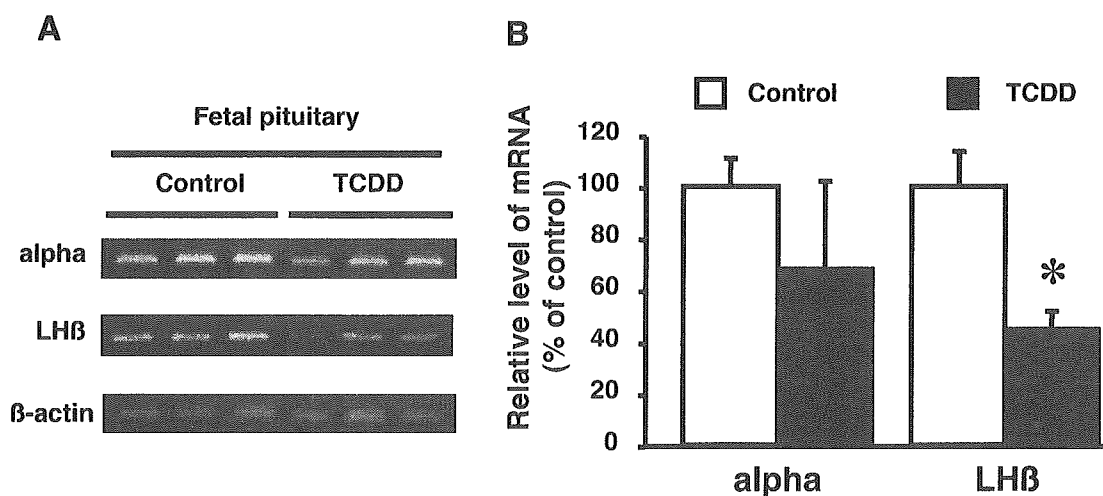
**Fig.6.** Change in the expression of StAR mRNA in rat neonatal testis following exposure of the dams to TCDD (1.0  $\mu$ g/kg at GD15). (A) Comparison of the mRNA profiles between control and TCDD exposure. (B) Relative levels of the mRNAs in testis of neonatal rat normalized to  $\beta$ -actin. The values expressed are the means  $\pm$  S.D. of 6 fetuses each 2 of which were removed from 3 different dams.



**Fig. 7. Effects of TCDD on expression of StAR and CYP17 mRNAs in cultured fetal testis.** Cultured testis was treated for 24 hr with TCDD (0.1  $\mu$ M) and/or 8-Br-cAMP (1 mM). (A) Induction of the CYP1A1 mRNA expression in cultured fetal testis. (B) Relative levels of the StAR and CYP17 mRNAs in cultured fetal testis normalized to  $\beta$ -actin. The value expressed is the mean  $\pm$  S.D. (n=5). Statistically significant different from control: \*,  $p < 0.05$ , from TCDD: #,  $p < 0.05$



**Fig. 8.** Western blot analysis of StAR expression in cultured fetal testis. Mitochondrial proteins were prepared from pooled 4 cultured testes. Mitochondrial fraction (30  $\mu$ g protein) was subjected to SDS-PAGE (13% gel) and immunoblotted with anti-StAR antibody.



**Fig. 9.** Change in the expression of mRNAs coding luteinizing hormone (LH) alpha and  $\beta$  subunits in rat fetal pituitary following exposure of the dams to TCDD (1.0  $\mu$ g/kg at GD15). (A) Comparison of the mRNA profiles between control and TCDD exposure. (B) Relative levels of the mRNAs in the pituitary of rat fetus normalized to  $\beta$ -actin. The values expressed are the means  $\pm$  S.D. of 3 fetuses from different dams. Significant difference in mRNA levels between control and TCDD exposure was calculated using Student's *t* test (\*:  $p < 0.05$ ).