

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

内分泌かく乱化学物質（ダイオキシン類を含む）の胎児・
新生児暴露によるリスク予測に関する総合研究

H16-化学-003

2005～2007（平成16～18年度）

総合研究報告書

主任研究者 江馬 眞
国立医薬品食品衛生研究所

平成19年（2007）3月

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

研究課題名（課題番号） = 内分泌かく乱化学物質（ダイオキシン類を含む）
の胎児・新生児暴露によるリスク予測に関する総合研究（H16-化学-003）

平成 16～18 年度 総合研究報告書

主任研究者 江馬 眞

平成 19 (2007) 年 3 月

目 次

I. 総合研究報告書

内分泌かく乱化学物質（ダイオキシン類を含む）の胎児・新生児暴露による

リスク予測に関する総合研究（H16-化学-003） ----- 1

江馬 眞

【奇形発生】

（資料）奇形の受容体シグナルを介した発生メカニズムの解析

（資料）ダイオキシン胎生期・授乳期暴露のアカゲザル児の生後発育に及ぼす影響

（資料）胚幹細胞（ES細胞）に対する受容体シグナルを介する化学物質の胎児毒性
モデルとしての有用性の検討

【発がん】

（資料）受容体原性シグナルを介したエピジェネティック発がんの分子機能解析

【障害性発現メカニズム解析と毒性等価換算係数(TEF)及び耐容一日摂取量(ADI)の妥当性の検討】

（資料）細胞アレイを指標とした内分泌かく乱化学物質の影響

（資料）ヒト型モデル動物によるAhRの分子基盤解析とAhRの生理的プロセスへの関与

（資料）ヒト型モデル試験系による内分泌かく乱化学物質の影響解析

（資料）齧歯類前立腺を用いた内分泌かく乱化学物質の新生仔暴露の作用

（資料）甲状腺ホルモンかく乱物質の作用機構の解明：ラットからヒトへ

【リスクコミュニケーション・国際動向等調査】

（資料）受容体シグナルを介する毒性評価に関するリスクコミュニケーション

（資料）受容体シグナルを介する毒性物質の有害性評価法及び一般化スクリーニング

試験スキームの国際動向に関する研究

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----37

III. 研究成果の刊行物・別冊 -----47

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

総合研究報告書

内分泌かく乱化学物質(ダイオキシン類を含む)の胎児・新生児暴露による

リスク予測に関する総合研究(H16-化学一般-003)

主任研究者 江馬真

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・総合評価研究室・室長

研究要旨

内分泌かく乱化学物質(EDCs)(ダイオキシン類を含む)の胎児・新生児暴露影響を明らかにし、その作用機序の解析を推進することによりリスクアセスメントの確度の向上に資することを目的として、本研究班を4部構成(【奇形発生】、【発がん】、【障害性発現メカニズム解析と毒性等価換算係数(TEF)及び耐容一日摂取量(ADI)の妥当性の検討】及び【リスクコミュニケーション・国際動向等調査】)として研究を推進した。核内受容体を介した口蓋裂発生に関する標的分子種の同定並びにシグナル伝達への影響を明らかにすることを目的に、マウス胎児口蓋のマイクロアレイ解析の技術基盤を確立し、2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin(TCDD)を胎生12.5日に投与し、13.5、14.5、及び15.5日のマウス胎児口蓋の解析を実施した結果、Cyp1a1、Ahrr、Cyp1b1、TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase(Tiparp)等の、TCDDにより誘導されることが知られている遺伝子が再現性をもって誘導されていた。更に、増殖、シグナル伝達、分化、代謝等に関わる遺伝子の発現変化が再現性をもって検出され、TCDD口蓋裂関連遺伝子群を多数同定することが出来た。アカゲザルの妊娠20日から生後90日まで、0(対照)、30又は300ng/kg相当量のTCDDに母体経由で暴露された児について、生後約6年まで発育を観察した結果、高暴露群に第3大臼歯の欠如等の歯の異常、精子数の有意な低下等を認めた。アカゲザルAhRの塩基配列を検討したところ、5'末端の配列にはバリエーションがある可能性及び、ヒトに比較してTCDDに対する感受性が高いことが示唆された。胎児毒性予測モデルとしてのES細胞培養系、特に胚様体(EB)の有用性を検討した。EBのマイクロアレイ解析法を確立し、ダイオキシンの受容体であるAhR及び関連遺伝子のArntを含む種々の遺伝子の経時的な発現パターンを明らかにした。短期発がんモデルとして、Tg.ACマウス、

或いはこれに C57BL/6 を戻し交配したマウスを用い、TCDD を 3 或いは 6 ヶ月間経口投与した。前胃の乳頭腫及び胸腺腫が C57BL/6 に戻すことにより高頻度で見られる様になったが、TCDD による発がん促進作用は明らかではなかった。TCDD 単回投与マウス肝のマイクロアレイデータ解析により癌関連遺伝子群を抽出した。ヒトがん細胞パネルを用いた薬剤感受性試験と情報処理を合わせたシステム「Cancer Cell Informatics」を用い、核内受容体アゴニスト、アンタゴニストなど約 30 種について取得した Fingerprint のクラスター解析を行った。その結果、標的を同じくする物質同士がクラスターを形成する傾向が見られ、ターゲット既知の EDCs をレファレンスとすることによって、生理作用未知の化合物の分子メカニズム予測に有用であると考えられた。また、パネル中のヒト前立腺癌細胞株 PC-3 を用いて Tributyltin の作用をマイクロアレイ解析し、IL1 下流や MAPK 系の遺伝子群などの発現レベルが時間依存的に上昇することを明らかにした。AhR の卵巣に於ける生理作用、腸に於ける癌抑制因子としての作用、炎症に於ける作用、他の受容体型転写因子との相互作用等を明らかにした。コレステロールのホメオスタシスに深く関与する核内受容体 liver X receptor (LXR) のシグナル伝達経路を、多環芳香族炭化水素類 (PAHs) が AhR を介して抑制することを見出した。また、この抑制機構には、PAHs の代謝的な活性化に関与し、AhR の標的遺伝子である CYP1A1 の活性、更に、活性化 p53 による RXR の発現抑制が関与することを明らかにした。新生児期マウスの前立腺発達に関わるアンドロゲン応答性遺伝子を、プロテオーム及びマイクロアレイ解析により同定した。このアンドロゲン応答は、低用量 TCDD、3 メチルコランスレン、及びエストロゲンにより修飾されることから、EDCs の標的たり得ると考えられた。これらの標的遺伝子はヒトにも存在することからリスク推定に有用な標的遺伝子と考えられた。PCB によりヒトでも観察される血清中サイロキシン(T₄)濃度低下の作用機構を、実験動物を用いて追究した。従来、肝臓の T₄-UDP-グルクロン酸転移酵素(UDP-GT)の誘導、血中トランスサイレチン(TTR)を介した T₄の輸送の攪乱が主因とされてきたが、これは一因に過ぎず、主因は、T₄が血中から肝臓へ移行することによることが示された。EDCs の生体作用及びその作用機構に関する新たな科学的知見を、一般社会にリスク情報として還元してゆくための要件を整理し、ダイオキシン関連研究と行政に関する、適切な危機管理と信頼を醸成する方途を提供するため、リスクの質及び先進科学の普及がこの課題に果たす役割との両面に焦点を当てて考察を行った。ハロゲン化有機環境汚染物質と POPS に関する国際シンポジウムに参加し、ダイオキシンを含む EDCs の国際的評価に関する最新知見の収集と共に、2005 年に WHO/IPCS で行われたダイオキシン類の毒性評価上重要な Toxic Equivalency Factor(TEF)の再評価や、非ダイオキシン様 PCB の健

康影響評価に関する最新の国際動向について情報収集した。

以上、平成 16～18 年度の3年間に亘り、EDCs(ダイオキシン類を含む)の胎児・新生児暴露によるリスク予測についての詳細な研究を遂行した結果、国民の健康に関わる、より確度の高いリスクアセスメントに貢献する重要な知見を数多く得ることが出来た。なお、当班の班員による口蓋裂のデータが WHO/IPCS での TEF 設定の根拠に採用され、国際的なレベルでもリスクアセスメントに貢献することが出来た。

分担研究者

隅田 寛	広島国際大学・保健医療部・教授	鎌滝哲也	高崎健康福祉大学・薬学部・教授
高木篤也	国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部・室長	藤本成明	広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教授
菅野 純	国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部・部長	加藤善久	徳島文理大学・香川薬学部・助教
矢守隆夫	癌研究会癌化学療法センター・分子薬理部・部長	井上 達	国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・センター長
藤井義明	筑波大学・先端学際領域研究センター・客員教授	広瀬明彦	国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・総合評価室・主任研究官

A. 研究目的

【奇形発生】

核内受容体を介した口蓋裂発生に関する様々な標的分子種の同定並びにシグナル伝達への影響を明らかにすることにより、その分子機序を明らかにし、受容体原性物質のリスクアセスメントの信頼性を高める(江馬、高木)。PCB やダイオキシンの胎生期暴露がヒトの歯の形成、発育に悪影響を及ぼしているとの疫学調査報告がある。そこで、ヒトに近い動物種であるアカゲザルを用い、胎生期・授乳期に TCDD 暴露を受けた児の歯の形成と発育、及び生殖機能に与える影響を検討した(隅田)。ES 細胞は胚盤胞の内部

細胞塊に由来し、全分化能を有する細胞である。また、ES 細胞から形成される胚様体(Embryoid body:EB と略す)は胎児の卵筒胚(egg cylinder, マウスで 5～7 日胚)に類似性を有し、発生初期の遺伝子解析に利用されている。そこで、EDCs やダイオキシン類の発生初期への影響を解析するための試験系として ES 細胞の有用性について検討した(高木)。

【発がん】

p53 ヘテロ欠失マウスを用いた検討で見られた TCDD による発がんの非単調用量反応性(逆U字型反応)の再現性を、短期発がんモデルマウスの Tg.AC マウスを用いて

確認すると共に、その発がん用量相関性の分子機構を解析する。これまでの解析で、発がんプロモーター物質高感受性遺伝子改変モデルとして Tg.AC マウスを C57BL/6 マウスに back cross することにより胸腺腫及び前胃の squamous papilloma(乳頭腫)が高頻度に自然発生することを確認した。そこで、このマウスを用いて TCDD の発がん性試験を行った。更に、肝発がん機構の解明のため、TCDD 単回投与マウス肝で変動する癌関連遺伝子の検索を実施した(菅野)。

【障害性発現メカニズム解析と毒性等価換算係数(TEF)及び耐容一日摂取量(ADI)の妥当性の検討】

新規化学物質の作用メカニズムを予測するシステム「Cancer Cell Informatics」を用い、EDCs の評価を行う。データベース内の機能既知の化学物質との比較検討を行い、細胞増殖阻害の分子機構解析を通じて内分泌かく乱分子機構の推測を行う。さらに標的依存性とリガンド依存性の両面に関する生物学的意義を明らかにする(矢守)。

AhR 欠失マウスと野性型マウスとの機能の比較から、AhR の発生及び成熟マウスにおける生理的機能について明らかにし、外来異物の毒性発現における AhR の役割について理解を深める。雌マウスの生殖サイクルにおける AhR の役割、AhR の大腸における癌抑制作用メカニズム及び AhR と他の脂質性リガンド受容体との相互作用について検討する(藤井)。これまでの研究で PAHs はアテローム性動脈硬化を誘発すること及び PAHs が誘発するアテローム性動脈硬化には CYP による代謝的な活性化が重要となることが明らかとなっている。PAHs が AhR を介して、生体内でのコレステロール代謝の

マスターレギュレーターである LXR シグナル伝達経路を抑制するか否かを検討し、PAHs が誘発するアテローム性の動脈硬化の発症機構を解明する(鎌滝)。新生児マウス(PND 0~15)の前立腺に対する EDCs の障害作用は、前立腺の腺管分岐発達過程を標的とする。これはアンドロゲンであるので、まずこの時期の前立腺におけるアンドロゲン応答遺伝子群を同定する。更に、それらの遺伝子発現に対するダイオキシン類及びエストロゲン作用物質に対する応答性を検討することにより、障害作用に関わるターゲット遺伝子を同定する(藤本)。

PCB 投与によりラットの血中サイロキシン(T₄)濃度が低下することが報告されている。ヒトにおいても PCB 暴露により甲状腺ホルモンの攪乱が引き起こされている可能性が指摘されている。一般に、PCB による血中 T₄ 濃度の低下は、肝臓の UDP-グルクロン酸転移酵素(UDP-GT)が誘導され、T₄ のグルクロン酸抱合化が促進されること、或いは PCB の水酸化代謝物が血中 T₄ の輸送タンパクであるトランスサイレチン(TTR)と親和性を持ち、T₄ と競合的に結合することが、血中 T₄ の標的器官への輸送を攪乱し、血中 T₄ 濃度を低下させると報告されている。しかし、ヒトのみならず実験動物においても PCB による血中 T₄ 濃度の低下作用機構は十分に解明されていない。そこで、UGT1A ファミリー酵素を欠損したラット(Gunn ラット)、TTR 遺伝子欠損マウスなどを用いて PCB による血清中 T₄ 濃度低下作用機構を解明し、その低下作用機構をヒトに適用できるか否かを追究した(加藤)。

【リスクコミュニケーション・国際動向等調査】

EDCs(ダイオキシン類を含む)の生体作

用及びその作用機構に関する新たな科学的知見を一般社会にリスク情報として還元してゆくための要件を整理し、ダイオキシン対応研究と行政に向けて、適切な危機管理と信頼の醸成のための方途を提供することを目的として3年間にわたり研究を実施した(井上)。海外における最新のEDCs(ダイオキシン類を含む)のヒトへの健康影響評価、特に胎児・新生児暴露によるリスク予測に関する研究の国際的な進展状況に関する情報を収集し、本基盤研究の実験部分や事実上情報が不足している低用量効果の毒性評価のための背景的な支援を行う(広瀬)。

B. 方法

【奇形発生】

C57BL/6の妊娠マウスより13.5、14.5、及び15.5日齢の胎児を摘出し、口蓋をハサミで採取し、RNAをRNAeasy(キアゲン)で抽出、蛍光ラベル後、40,000以上の遺伝子解析が可能なアフィメトリクス社のMouse Genome 430 2.0 Arrayを用いて正常発生過程における遺伝子発現解析を行った。データ取得に際しては細胞1個当たりのmRNAのコピー数を得る“Percellome”法を用いた。次いで、12.5日齢のC57BL/6妊娠マウスにTCDDを20 μ g/kgの用量で単回強制経口投与後、13.5、14.5、及び15.5日齢の胎児口蓋の遺伝子発現を同様の手法を用いて解析した(江馬、高木)。

アカゲザルを交配し、約70匹を3群に分け、妊娠20日にTCDDを、0(溶媒のみ、以下対照)、30又は300ng/kgを皮下投与し、その後30日毎に初回投与量の5%量を維持量として投与した。妊娠動物は自然分娩

させ、児を哺育させた。母体へのTCDD投与は分娩後90日まで続けた。約1年後に離乳した。初産児(F1a)の離乳後、期間において母体を再度交配、妊娠させ、妊娠20日にTCDD 20ng/kg(低暴露量群)または200ng/kg(高暴露量群)を皮下投与した。その後はF1a実験と同様にTCDDを投与して第二産児(F1b)を得た。対照にはF1aと同様の処置を行った。生後約200日から5歳まで、軽麻酔下で児の歯を口腔内デジタルカメラ及びX線により観察した。また、第3大臼歯欠如の自然発生率を知るために、実験に用いた母体60例(推定年齢7~14歳)の頭部を解剖して、上下顎の歯を肉眼的に精査した。F1bは生後約850日で剖検し、精巣と精巣上体の組織所見を中心にTCDDの影響を検討した。精巣の組織を顕微鏡撮影し、単位面積あたりのセルトリ細胞数と精母細胞数を計測した。精巣上体組織の単位面積あたりの精巣上体管面積を算出した。精液採取を行い、精液性状を調べた。また、血液からRNAを抽出し、AhRの塩基配列の同定を試みた(隅田)。

ES細胞(E14-2a)をゼラチンコートDish上でLIFの存在下、ES培地で培養した。TCDDはDMSOに溶解し、最終濃度0、1、10あるいは100nMで添加した。対照群にはDMSOを0.1%の最終濃度で添加し、それぞれ、細胞数を計測した。また、ES細胞をLIFが非存在ES培地で浮遊培養し、4日後に形成された胚様体(EB)の細胞数を計測した。また、ゼラチンコートdish上でTCDDを除いた培地でEBを更に培養して分化誘導させ、形態学的観察を行った。TCDDのES細胞及びEBの分化への影響を遺伝子レベルで解析するため、経時的にマイクロア

レイ解析を行った。次いで、マウス ES 細胞 (TT2) をフィーダー細胞上で培養後トリプシン処理、細胞培養用 dish 上でさらに 2 時間培養し、フィーダー細胞を除去した後 LIF 非存在下で 2 日間 hanging drop 法 (ES 細胞 800 個/20 μ l) により、次の 5 日間は浮遊培養法により、計 7 日間培養した。その間に形成される EB の培養開始 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5 及び 7 日目のものを、0.5 日間隔で採取し、サンプルとしマイクロアレイ解析に供した。0 日のサンプルとしては上記フィーダー細胞除去後の ES 細胞 (1×10^6 個) を用いた。RNA はキアゲン社の RNeasy にて抽出、アフィメトリクス社の Mouse Genome 430 2.0 Array を用いて遺伝子発現解析を行った (定量的比較を正確に行うために、我々の開発した Percellome 手法 (細胞 1 個当たりの mRNA 絶対量を得る遺伝子発現解析手法) を用いた) (高木)。

【発がん】

Tg.AC マウスの雄 (一群 8 匹) に、TCDD を 1、3、10、30 及び 100ng/kg 体重の用量で週 2 回 6 ヶ月間経口投与した。プロモーター作用高感受性動物として Tg.AC マウスを C57BL/6 マウスに 7 世代戻し交配した雌雄マウス (一群 8 匹) に、TCDD を 1、3、10、30 及び 100ng/kg 体重の用量で週 2 回 3 ヶ月間経口投与した。さらに、C57BL/6 マウスに 10 世代戻し交配した雌雄 Tg.AC マウス (一群 15 匹) に、TCDD を 0.1、1、10ng/kg 体重の用量で週 2 回 3 ヶ月間経口投与し、生じてくる腫瘍の種類並びに発生頻度を解析した。Tg.AC マウスに一定の頻度で出現する non-responder は、サザンブロット解析により排除した。雄 C57BL/6 マウスに TCDD を 1 ~ 30 μ g/kg の用量で単回経口投与し、2, 4, 8

及び 24 時間後の肝臓のマイクロアレイデータを解析に供した (菅野)。

【障害性発現メカニズム解析と毒性等価換算係数 (TEF) 及び耐容一日摂取量 (ADI) の妥当性の検討】

ダイオキシン類を含む種々の EDCs、核内受容体アゴニストのヒトがん細胞パネルに対する増殖阻害活性の強弱を調べることにより、その毒性 (増殖阻害) 評価を「Cancer Cell Informatics」により実施した。メカニズム既知の抗がん剤や阻害剤との比較検討を行った。また、ヒト癌細胞株に対する化学物質暴露の影響を、遺伝子発現プロファイルの変化によって調べた。濃度時間依存的な変動を、GeneChip を用いて取得した (矢守)。

作製した AhR 欠失マウスを用いて、野性型マウスとの比較から機能欠損を推定し、機能欠損の認められた卵巣、腸、腹腔浸出液などの組織、細胞について遺伝子発現や形態学的変化などをマイクロアレイ法、RT-PCR 法、抗体染色法や生理学的・分子生物学的方法により解析し、AhR の生理的機能を総合的に解析した (藤井)。

PAHs が LXR α 標的遺伝子 (ABCA1 及び SREBP1c) mRNA 発現に及ぼす影響をリアルタイム RT-PCR 法を用いて検討した。TK プロモーターに LXR 応答配列を連結させたレポータープラスミドを HepG2 細胞及び Hep3B 細胞に導入し、MC の LXR α 転写活性に及ぼす影響を検討した。RXR α タンパク質の発現量は HepG2 細胞から調製した核抽出液を用い、ウエスタンブロット法により定量した (鎌滝)。

生後 5 日目の C57BL 雄マウスを Charles River Japan より購入した。生後 6 日目で、テストステロンプロピオネイト (T) 4 mg/kg bw、

3MC 0.2, 1 mg/kg bw 及び TCDD 10-1000 ng/kg bw を i.p. 投与した。前立腺分泌タンパクの解析には、10 週齢動物を用いた。前立腺組織は、腹葉(VP)、背側葉(DLP)、前葉(AP)を解剖学的に区別して保存した。二次元電気泳動と MALDI-TOF/MAS 解析によるタンパク質同定を行った。各組織についてマイクロアレイ解析を行った。また、real time PCR 法により mRNA の発現レベルを測定した。PND6 マウスの前立腺を解剖学的に切り出し、MC フィルター上に置いて器官培養した。これまでのプロテオーム及び cDNA マイクロアレイ解析により同定された新生児期アンドロゲン応答遺伝子である PSP94, probasin, SPI-KT3, EAPA2, SPI-KT3 についてその遺伝子上流域を含む luc レポーターを作製した。これらを、CHO、HepG2、DT3 細胞株にトランジェントに導入して、デハイドロテストステロン(DHT)、3MC 及びエストラジオール(E2)を添加し、それらのアンドロゲン応答性に対する修飾作用を解析した(藤本)。

Wistar 系ラット及び Gunn ラット、TCDD 高感受性マウス(C57BL/6 系マウス)及び TCDD 低感受性マウス(DBA/2 系マウス)、TTR 遺伝子欠損マウスに Kanechlor-500 (KC500) 、 2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl (PentaCB) 、 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (CB126) 、 或いは 4-OH-2,2',3,4',5,5',6-heptachlorobiphenyl (4-OH-CB187) を投与し、血清中甲状腺ホルモン濃度、肝ミクロソームにおける抱合活性及び UGT 分子種の発現量、血中 PCB 水酸化体濃度、肝臓中甲状腺ホルモントランスポーター遺伝子の発現量を測定した。また、各種動物に PCB 或いはその水酸化体を処置し、処置後一定

時間に $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ を静脈内投与し、 $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ の血清クリアランス、血清タンパクとの結合率、組織分布量及び胆汁中 $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ のグルクロン酸抱合体の排泄量を測定した。また、ラット及びマウスに PCB を投与後、肝実質細胞懸濁液を調製し、肝実質細胞への $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ の取り込み量を測定した。また、昆虫細胞発現系ヒト UGT 分子種、ヒト肝ミクロソーム及びヒト小腸ミクロソームについて、 T_4 -UDP-GT 活性及び UGT 分子種の発現量を解析した(加藤)。

【リスクコミュニケーション・国際動向等調査】

国際機関や各国政府機関で採用している化学物質の安全性評価に関する情報を収集し、また化学物質の生体影響に関する基礎研究成果をトランスレーショナルに社会に対して公表するなど、情報の質に応じた開示を進めるべく戦略的に考察を加えた(井上)。

2004 年 9 月にベルリンで行われた第 24 回、2005 年 8 月にトロントで行われた第 25 回、2006 年 8 月にオスロで行われた第 26 回ハロゲン化有機環境汚染物質と POPS に関する国際シンポジウムに参加し、最新の EDCs の健康影響に関する国際動向について情報収集した。また、2005 年の 2 月に行われた JECFA(FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives)会議での芳香族炭化水素や、ポリ臭素化ジフェニルエーテル(PBDE)の評価状況や、2005 年に WHO/IPCS で行われたダイオキシン及びダイオキシン様 PCB のヒト及び哺乳動物における TEF の WHO 2005 再評価に関する情報収集を行った(広瀬)。

(倫理面への配慮)

使用する動物の屠殺に当たっては、麻酔薬の使用や頸椎脱臼法など苦痛の少ない方法を用いるといった、国立医薬品食品衛生研究所の「動物実験の適正な実施に関する規程」に従い実施した。また、ダイオキシン類の実験に際しては、当研究所の専用特殊実験施設内で、その運用規則に従い実施しており、暴露・漏洩を防止する対策については万全を期して実施している(江馬、高木、菅野)。動物を扱う委託実験においては、「イナリサーチ動物実験指針」に従って行い、ダイオキシン類の実験は専用特殊実験施設内で、暴露・漏洩を防止する対策については万全を期して実施している(菅野)。動物は新日本科学(SNBL)のサル実験施設の「動物実験ガイドライン」に従い愛護的に扱い、また実験者が TCDD からの悪影響を受けないように配慮した(隅田)。動物を扱う実験においては、筑波大学「動物実験規則」に従って行った(藤井)。動物を扱う実験においては、広島大学「動物取り扱い倫理規定」に従って行った(藤本)。動物を扱う実験においては、静岡大学の「動物実験ガイドライン」に従って行った。また、実験者及び飼育者は PCB による汚染を受けないように十分に保護対策を施し、また PCB 暴露動物、廃液等は保管し、暴露・漏洩を防止する対策についても万全を期して実施した(加藤)。

C. D. 研究結果と考察

【奇形】

13.5、14.5 及び 15.5 日齢の胎児のそれぞれの日齢のサンプル間のデータを比較したところ、いずれもバラツキの少ない良好なデータであった。13.5 日に対する 14.5 日と 15.5 日齢の変動遺伝子の解析を実施した結果、

口蓋形成に伴って、骨化、液性免疫応答遺伝子、細胞外スペース、核、中間フィラメント(ケラチン)、酸素輸送、筋収縮等の機能に関連する遺伝子の増加が見られ、次いで、12.5 日の妊娠マウスに TCDD を単回経口投与し、13.5、14.5 及び 15.5 日齢の胎児口蓋のマイクロアレイ解析を行った。今回得られたデータを昨年度得られたマイクロアレイデータを合わせて検討した結果、Cyp1a1、Ahrr、Cyp1b1、TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase (Tiparp)等の TCDD により誘導されることが知られている遺伝子が対照群に比較して顕著に増加していることが確認された。その他、数多くの遺伝子の発現量の変化が確認され、その中には、CDK inhibitor が胎齢 14.5 日に増加していることが確認された。細胞増殖に関連する遺伝子として p21 と Rerg (ras related, estrogen regulated growth inhibitor) 遺伝子の増加が見られた。また、血管形成を阻害する PF4 遺伝子の増加が見られた。転写因子 Glis1 や糖鎖の代謝に関与する Hs3st6、シグナル伝達に関与する Dab1 遺伝子等の発現増加が見られた。胎齢 15.5 日にはケラチン遺伝子が増加した。減少した遺伝子としては AhR の他に、細胞接着に関与することが知られている Pcdh8(protocadherin8) 遺伝子があった。(江馬、高木)。

TCDD 投与アカゲザル児の体重は、生後 78 ヶ月で対照群 5.23 kg ± 1.11、30 ng/kg 群 5.79 Kg ± 0.96、300 ng/kg 群 5.23 kg ± 1.08 であり、群間に差は認められなかった。雌雄別に体重を分類すると、雄では対照群 6.35 kg ± 0.73、30 ng/kg 群 6.46 Kg ± 0.69、300 ng/kg 群 5.56 kg ± 1.22 であり、300 ng/kg 群で有意に体重増加遅延が認められた。歯に

ついて観察することのできた生存児は、対照群 15 例、30 ng/kg 群 13 例、300 ng/kg 群 11 例であった。対照群及び 30 ng/kg 群では乳歯及び永久歯に異常は認められなかった。これに対して、300 ng/kg 群では 7 例(64%)に歯の欠如、円錐歯等の形態異常、歯尖が舌側に偏倚した萌出方向の異常が見出された。欠如歯は上顎では乳中切歯、永久側切歯、第 1 及び第 2 小臼歯、下顎では永久中切歯、第 2 小臼歯などで、犬歯や大臼歯には欠如は見られなかった。円錐歯は上顎の第 1 及び第 2 小臼歯に、また萌出方向異常は上顎及び下顎の第 1 及び第 2 小臼歯に認められた。永久歯の萌出異常があると、乳臼歯は脱落せず、残存していた。エナメル質の欠損など、微細な異常を生存児で観察することは困難であった。

約 5 歳時点での口腔 X 線観察で、300 ng/kg 暴露群の 8 例中 2 例に第 3 大臼歯の欠如が発見された。第 3 大臼歯欠如の自然発生率を知るために、実験に用いた母体(観察時推定年齢 7~14 歳)対照群 14 例、30 ng/kg 群 19 例、300 ng/kg 群 27 例 60 例の上・下顎を精査したが、全例で上・下顎とも第 3 大臼歯は認められた。F1b 児の精巣は、低暴露量群、高暴露量群ともに水腫傾向が認められた。対照群、TCDD 暴露群ともに精子形成は認められなかったが、対照群の精巣では精子形成細胞の成熟度は良く、精母細胞は数多く認められた。TCDD 暴露群の精巣では、精細管そのものの発達は悪くなかったが、精子形成細胞の成熟度は個体でまちまちであり、精母細胞の分布が対象に比較して少ない個体も認められた。そこで、精巣組織単位面積あたりの細胞数を定量したセルトリ細胞数は対照群との間に有

意差は認められなかったが、TCDD 暴露群の精母細胞数は対照群のそれと比較して有意に小さかった($P<0.05$)。さらに、セルトリ細胞 1 個当たりの精母細胞数を計算したところ、TCDD 低暴露量群の精母細胞数は対照に比較して有意に低下していることがわかった。しかし一方で、高暴露量群では、精巣の成熟度に関して個体差が非常に大きかったため、対照に比較してセルトリ細胞 1 個当たりの精母細胞数には差が認められなかった。生後 76 ヶ月時点での精巣の大きさ(mm)は、各群に有意差は認めなかったが、対照群と 300 ng/kg 群がほぼ同じ値であったのに対して、30 ng/kg 群では数値が高い傾向にあった。陰莖長(mm)についても、対照群と 300 ng/kg 群ではほぼ同じ数値であったが、30 ng/kg 群では対照群に比較して有意に高い数値であった。今回観察した年齢では、精巣内での精子形成は行われていないので、当然精巣上体管内に精子は認められていない。生存 F1a 児の精子数については TCDD 容量依存的に低下していた。

アカゲザル AhR の塩基配列を決定したところ、ヒト AhR との相同性は高かった。文献的には、ニワトリとアジサシの TCDD に対する感受性の差は、アジサシ AhR の 325 番目のアミノ酸残基と 381 番目のアミノ酸残基がニワトリ AhR と異なることに起因するとのことである。この部に相当するアカゲザルのアミノ酸残基は Ala であり、C57BL マウスやアジサシと同じであるが、ヒトでは Val であり、アカゲザルの TCDD に対する感受性はヒトよりも高いと予想される。今回、齧歯類での LAOEL より低い 30 ng/kg 暴露量でも精子数に変化が認められたことは、霊長類での詳細な検討の必要性を示している。ヒト例では、

妊娠率に有意差は認められていないが、比較的低暴露量群にも性比に有意差が認められるとされる。そのため、TCDD 暴露群の精子形成を検討した結果、対照群に比較して精子数に明らかな差が認められた。このことから、ダイオキシン類の暴露により、次世代の生殖能力に影響が及ぶことが示唆された。動物種により、TCDD に対する感受性が大きく異なることが知られている。今回アカゲザル AhR の塩基配列の同定を試みたが、研究期間中に他研究機関より塩基配列データベースへの登録がなされた。その配列に比較して、5'末端に配列について、われわれの結果と異なったが、その差がどの程度 AhR の機能に本質的に関連するかは不明である。(隅田)。

ES 細胞をゼラチンコート Dish 上で LIF 存在下で培養し、培養 4 日後に ES 細胞の細胞数を計測した結果、TCDD の 1nM 以上の濃度で用量に相関的して有意な減少または減少傾向が認められた。また、RT-PCR の結果、LIF 存在下で TCDD 添加 2 日間培養後、1nM から CYP1A1 の増加を確認した。ES 細胞を LIF 非存在 ES 培地で浮遊培養し、4 日後に形成された胚様体 (EB) の細胞数を計測した結果、1nM 以上で有意な増加が認められた。また、ゼラチンコート dish 上で TCDD を除いた培地で EB を培養して分化誘導させて、形態学的観察を行った結果、0.1nM 以上で形態学的に異常な大型細胞の出現数の増加が見られた。

ES 細胞及び EB の分化過程で発現する遺伝子を経時的にマイクロアレイ解析した。AhR を始め、関連する AhRR、Arnt、Arnt2、Arnt11、Arnt12、ER(エストロゲン受容体) α 、 β 、Cyp1a1、Cyp1b1 遺伝子は ES 細胞の

分化の開始によりその発現は増加し、分化開始後、1 日目にピークとなり、その後減少するパターンを示した。内胚葉マーカーの AFP(alpha fetoprotein)、TT (transthyretin)、心臓のマーカーである NKX2.5、cardiac actin、中胚葉マーカーである brachyury、BMP4、神経系のマーカーである MAP2 の発現パターンとの比較では、AhR 及び関連遺伝子は神経堤細胞のマーカーの発現パターンと近似していることが示された。また、TCDD により肝臓及び胎児口蓋で誘導されることが知られている遺伝子の発現パターンを解析したところ、Cyp1a1 と同様に Cbr3 (carbonyl reductase 3) と Pmml1 (phosphomannomutase1) が分化初期に増加することが明らかとなった。今回の結果、ES 細胞の細胞数には LIF 存在下で TCDD により減少が見られたことから、TCDD が ES 細胞の増殖抑制あるいは細胞死を亢進させている可能性が示唆された。また、EB においては細胞数増加が認められ、ES 細胞とは逆の反応性が示された。また、EB の分化誘導実験結果から、早期の ES 細胞への TCDD の暴露が、後期の分化過程に何らかの影響を及ぼすことが示唆された。

以上の結果、ES 細胞培養系はダイオキシン類の反応を調べる良い系であることが明らかになった(高木)。

【発がん】

Tg.AC マウスを用いた TCDD の 6 ヶ月間試験において TCDD による腫瘍の誘発は観られなかった。Tg.AC に C57BL/6 を 7 世代戻し交配して得られた雌雄マウス (6-7 週齢、1 群 8 匹) に、TCDD を 1、3、10、30 及び 100ng/kg 体重の用量で週 2 回 3 ヶ月間経口投与した結果、雄では 1、10ng/kg 群に死亡

が見られ、投与終了時の0、1、3、10、30及び100ng/kg群の生存率はそれぞれ、100、62.5、100、75、100、100%、雌では0、1、30、100ng/kg群に死亡が見られ、投与終了時の0、1、3、10、30及び100ng/kg群の生存率はそれぞれ、87.5、75、100、100、87.5、75%であった。体重及び摂餌量、臓器重量には差は認められなかった。外表所見として口唇周囲の乳頭腫がいずれの群とも散発性に認められたが、TCDD投与による影響は見られなかった。剖検による肉眼所見では、前胃の乳頭腫が対照群を含む各群のほとんどのマウスで見られたが、TCDD投与による影響は明らかでなかった。一方、胸腺の肥大あるいは腫瘍が対照群を除く各投与群で低頻度ながら見られ、雄と雌を合わせて計算すると1ng/kg群で有意に増加し、組織学的にはthymic lymphomaであることが確認された。さらに、Tg.ACにC57BL/6を10代戻し交配して得られた雌雄マウス(6-7週齢、1群15匹)に、TCDDを0.1、1、10ng/kg体重の用量で週2回3ヶ月間経口投与した。投与終了時まで死亡は見られなかった。体重及び摂餌量、臓器重量には差は認められなかった。外表所見として口唇周囲の乳頭腫がいずれの群とも散発性に認められたが、TCDD投与による影響は見られなかった。剖検による肉眼所見では、前胃の乳頭腫が対照群を含む各群のほとんどのマウスに見られたが、TCDD投与による影響は明らかでなかった。一方、胸腺の肥大あるいは腫瘍が対照群を除く各投与群で低頻度ながら見られたが、雄ではTCDDによる増加は見られず、また雌では減少傾向が見られるなどTCDDによる胸腺腫の増加は確認出来なかった。以上、プロモーター作用高感受性動物として

Tg.ACマウスを用いたTCDDの発がん作用の解析のための新たなマウスモデルの樹立のため、Tg.ACマウスのC57BL/6(TCDD高感受性マウス)へ戻し交配を行い、これまでに、皮膚乳頭腫誘発感受性がC57BL/6背景でも保たれることを確認したと共に、前胃の乳頭腫の自然発生が高率に認められることを見出した。更に、戻し交配によりB6背景が濃くなるに連れて、胸腺腫(胸腺リンパ腫)の発生が高率となり、歯芽腫及び前胃乳頭腫と近い発生率・発生時期を示すようになった。そこで、このマウスを用いた逆U字型用量相関の有無の追試検証を行った結果、前胃の乳頭腫に関してはTCDDの影響は明らかでなかった。また、胸腺腫が低用量群で有意に増加したが、その再現性は見られなかったことから、胸腺への腫瘍誘発作用を確認することは出来なかった。Tg.ACマウスに導入されているv-ha-ras遺伝子は胎児期に発現することから、胎児期暴露が発がん高感受性である可能性がある。そこで今後、TCDDを妊娠Tg.ACマウスに暴露し、児の発がん頻度について検討する。TCDD投与マウス肝遺伝子発現のデータベースの癌関連遺伝子発現解析の結果、癌抑制作用が示唆されているHtati2(TIP30)遺伝子がTCDD及び、TCDF、メチルコランスレン(MC)により顕著に増加することが新たに確認された。また、この遺伝子のin silicoプロモーター解析の結果AhR応答配列が認められた。TIP30は癌抑制作用、癌転移抑制作用、血管形成阻害作用、エストロゲン受容体のコアクチベーターとの相互作用など種々の作用が報告されており、ダイオキシンによる発がんを阻害している可能性が示唆された。今後、TCDDの発がん機序を遺伝

子レベルでより詳細に検討するため、TCDDをマウスに反復投与し、肝遺伝子発現のマイクロアレイ解析を行い、癌関連遺伝子発現の変化を検索する(菅野)。

【障害性発現メカニズム解析と毒性等価換算係数(TEF)及び耐容一日摂取量(ADI)の妥当性の検討】

ヒトがん細胞パネルから得られたフィンガープリントを解析した結果、レチノイン酸アゴニストの 9-cis, all-trans retinoic acid と TTNBP が一つのクラスターを形成した。エストロゲンアゴニスト estradiol と dieldrin がクラスターを形成し、このクラスターはエストロゲンアンタゴニストの tamoxifen, toremifene が形成するクラスターとは異なっていた。PPAR アゴニストである Bis (2-ethylhexy) phthalate と troglitazone は更にまた別のクラスターを形成した。スズ化合物も興味あるクラスターを示した。Tributyltin が各種の EDCs と比較して、強い増殖抑制作用を示した。ヒト前立腺癌培養細胞株 PC-3 において、Tributyltin 暴露による遺伝子発現変動を検討した結果、濃度、時間依存的な発現変動を示す遺伝子が多数抽出された。その中には 3T3-L1 細胞で Tributyltin による発現誘導が報告されている aP2 遺伝子も含まれていた。Tributyltin 処理後、IL1 下流の遺伝子群や MAPK 系遺伝子群などの発現レベルの時間依存的上昇が見られた核内受容体アゴニスト、アンタゴニストなど約 30 種について取得した Fingerprint のクラスター解析を行った。ターゲットの核内受容体を同じくする物質同士がクラスターを形成する傾向が見られた。以上により、ターゲット既知の EDCs をレファレンスとすることによりヒトがん細胞パネルは EDCs の分子メカニズム予測に使えることが

示唆された。さらに多くの核内受容体アゴニストをこの系で評価する必要がある。また、ヒト前立腺癌 PC-3 細胞における Tributyltin による遺伝子発現変動の解析は Tributyltin の作用メカニズムの解析に有用と考えられた(矢守)。

以下に AhR の生理的機能に関する結果と考察を示す。

卵巣における役割: AhR の欠失マウスの雌は、野性型に比較して産児数が 1/4 程度に減少している。これは生殖サイクルの不順であり、PMSG と hCG (処理)による強制排卵で排卵数を調べると排卵数が顕著に低下しており、黄体形成不全であることが認められた。この症状はステロイドホルモンを合成するアロマターゼ (CYP19) 遺伝子欠失マウスやエストロゲン (E2) 受容体 (ER) 欠失マウスの症状とよく似ていることから、E2 合成に原因があると予想された。卵巣の E2 濃度を測定すると正常マウスの 1/3~1/5 に低下していることが分かった。卵巣にはコレステロールから E2 が合成される E2 合成系が備わっている。AhR 欠失マウス卵巣のステロイドホルモン合成酵素系の発現を PT-PCR で調べると E2 合成系の律速酵素でテストステロンから E2 を合成する最終段階の反応を触媒する CYP19 遺伝子の発現が顕著に低下していることが明らかになった。CYP19 遺伝子の発現機構を詳細に検討したところ、CYP19 遺伝子のプロモーター領域には XRE 配列と Ad4 配列が存在し、各々の配列に AhR/Arnt のヘテロ 2 量体と Ad4BP/SF-1 が結合して協調的に CYP19 遺伝子の発現を活性化するメカニズムの存在を明らかにすることができた。AhR 欠失マウスに E2 を与えると排卵数が明らかに増加することが示されたが、野性型の

数に完全には戻らなかった。このことは、与えた E2 の生体内濃度が至適な濃度にならなかったのか、AhR 欠損が E2 の合成の他にも卵巣の機能に関係しているのか主として 2 つの可能性が考えられるが今のところ、どちらが原因であるか不明である。

AhR の大腸における癌抑制作用: AhR 欠失マウスは生後 15 週位になると脱肛が見られるようになる。腸を詳細に検討すると癌が発生していることが認められ、脱肛が見られないマウスでも癌の発症があることが分かった。癌は主として回盲部に認められ、他の部分にはあまり観察されない。癌の発症は 8 週令で見られるようになり 11 週令で殆どすべての AhR 欠失マウスに認められることが分かった。腸の異形成はポリープ、腺腫、腺癌などで経時的に腺癌が多くなり、筋肉層まで浸潤している癌も 15 週を過ぎると多く見られるようになった。免疫染色法で遺伝子発現を見ると AhR は正常細胞では、遍在的に発現しているが、パネート細胞を含む crypt の底辺の細胞に強く発現している像が見られ、腸上皮細胞の分裂や細胞接着に重要な役割を果たしている β -カテニンは細胞膜に沿って発現している像が見られた。しかし、AhR 欠失マウスでは β -カテニンの顕著な発現増加が認められ、特に核に移行している像や β -カテニン/TCF4 転写因子の標的遺伝子であり、癌遺伝子である cMyc の発現が亢進していることが明らかになった。AhR 欠失マウスの β -カテニンタンパク質の蓄積は mRNA の増加が伴わないことから、遺伝子の発現亢進によるのではなく β -カテニンタンパク質の安定化によることが考えられた。東大分生研の加藤研究室との共同研究により、AhR/Arnt ヘテロ 2 量体が Cul4B、DDB1 な

どと複合体を構成して ER α 、ER β 、AR などのステロイドホルモン受容体のユビキチン化とプロテアソームによる分解機構の存在を今年度明らかにすることが出来たので同じ機構によって β -カテニンが AhR/Arnt を含む複合体によってユビキチン化、分解によって壊されている可能性を検討した。APC の機能欠失した細胞である DLD 細胞や SW480 細胞を用いて β -カテニンの安定性を調べると β -カテニンは 3-メチルコレラトレンに依存して β -カテニンタンパク質が顕著に減少することが分かった。更に、この分解は MG132 や AhR の siRNA を加えると停止するので AhR 依存的にプロテアソームの分解系によって起こることが確かめられた。 β -カテニンは APC や Axin を含む系によって分解されることが良く知られており、家族性腸ポリポーシスでは APC の欠失変異が原因で β -カテニンの安定化・蓄積による cMyc の発現亢進が癌化の原因であることが報告されている。埼玉県立がんセンターに保存されているヒト盲腸癌の標品 12 例のすべてで β -カテニンの高発現と AhR の顕著な発現低下が認められ、ヒトに於いても AhR の発現低下が盲腸癌の発症に強く関連していると考えられた。また AhR 欠失マウスは LPS や DSS (Dextran sodium sulfate) 処理に対し過敏になり、敗血症ショックや大腸炎を起こし易くなっていることが明らかになった。AhR 欠失マウスは 20 週令を過ぎると自然に大腸炎を発症する。従って AhR が免疫応答に関与していることが考えられるが、この原因を追求する研究は現在進行中である。大腸癌自然発症と易炎症性との関係も今後の問題である。

以上より、AhR が生体において多彩な機

能の発現に関与していることが徐々に姿を見せて来ているように思われる。AhRはArntとヘテロ2量体を形成して転写因子として働くことが薬物代謝酵素(CYP1A1, 1A2)のダイオキシンなどの外来異物による誘導的遺伝子発現の研究から発見されたものであるが、卵巣においてアロマターゼ(CYP19)の遺伝子発現制御を介して生殖サイクルの制御に関わっていることが分かった。またAhR/Arntヘテロ2量体がCul4BやDDB1などとユビキチン化複合体を形成してER α 、ER β 、ARのステロイドホルモン受容体のユビキチン化・分解に関与していることの発見はAhR/Arntの機能の研究では全く新しいブレイクスルーが開けられたことを意味している。AhR欠失マウスで見られた盲腸癌の自然発症が β -カテニンの異常な蓄積によることが示され、AhR/Arntヘテロ2量体がユビキチン化複合体として β -カテニンの分解による癌抑制因子として働いていることが明らかになった。さらに、AhR欠失マウスがLPSによる敗血症ショックやDSSによる腸炎の発症に非常に感受性になっている発見はAhRが自然免疫にも関与していることを示唆しており、この方面の研究の進展は今後の大きな楽しみである(藤井)。

PAHsの一つであるMCでHepG2細胞を処置した場合、ABCA1及びSREBP1c mRNA発現量は濃度依存的に抑制された。LXR α を介して誘導された転写活性はMCによって抑制された。AhR及びCYP1A1に対するsiRNAを発現させたHepG2細胞を用いた場合、MCによってLXR α を介した転写活性は抑制されなかった。p53変異株であるHep3B細胞ではMCはLXR α を介した転写活性を抑制しなかった。MCによる

RXR α タンパク質の発現量の抑制はプロテアソーム阻害剤であるMG132共処置によって解除された。以上のことからLXR α シグナル伝達経路はPAHsによって活性化されたp53を介してRXR α タンパク質のプロテアソームによる分解が促進されることで抑制される可能性が示唆された。

LXR α 欠損マウスにおいてコレステロール代謝のバランスが著しく低下し、肝臓へのコレステロールの蓄積及び血漿コレステロール濃度の上昇が報告されている。またPAHsはタバコ煙中に多く含まれ、動脈硬化を誘発することが知られている。以上のことから、PAHsはLXR α シグナル伝達系を抑制することでコレステロールのホメオスタシスを阻害し、その結果、動脈硬化が誘発されると考えられた(鎌滝)。

以下に、マウス前立腺に関する結果と考察を示す。

1) マウス前立腺分泌タンパク質の同定

主要分泌物は、VPでspermine binding protein(SBP)とserine protease inhibitor KT3(SPI-KT3)、DLPとAPでは、IgG binding protein like protein (IgGBPLK)とexperimental autoimmune prostatitis antigen 2(EAPA2)であった。さらに、既知のPSP94、probasin(pb)に加え、peroxiredoxin 6、GRP78、phospholipase C、scavenger receptor like protein(91KDa protein)等が新規に同定された。

2) マイクロアレイ解析により同定された新生仔期前立腺のT応答性遺伝子

PND6で、T応答性に発現上昇が見られる遺伝子として、defensin beta 1, estrogen sulfotransferase, Purkinje cell protein 4等が同定された。新規に同定されたタンパク質

mRNA の新生仔前立腺での発現と T 応答性：PND7 の時点で、SBP、PSP94、91K protein, IgBPLP, EAPA2、SPI-KT の mRNA の発現検出可能であった。T の投与後 48 時間で、いずれの遺伝子も発現が強く誘導された。一方で、DLP/AP における IgBPLP, EAPA2 はともに T 応答性を示さなかった。

既知の増殖因子として AR、ER α 、AhR、Arnt mRNA 発現レベルは、成体前立腺組織と同程度であった。ER β の発現は観察されなかった。T 投与により、AR、ER α の発現は約 1/2 に低下した。増殖因子 mRNA では、IGF-1 発現が、2.2 倍上昇したのに対し、KGF は半減していた。

3) 新生児期 T 依存性遺伝子発現に対する 3MC 及び E2 投与の作用

3MC の同時投与は、T 単独投与による前立腺 SBP、PSP94、SPKT3、defensin beta1、estrogen sulfotransferase の発現上昇、及び AR と ER α 発現低下の双方を抑制した。E2 同時投与は、T による IGF-1 発現に促進作用を示した。

4) 器官培養での T と 3MC の作用

VP の器官培養において、DHT 添加群では腺管の成長が観察されたが、これは 3MC の同時投与により抑制された。一方 DLP では、3MC による有意な形態学的変化は観察されなかった。培養組織で遺伝子発現を検討したところ、T 投与により SBP、IGF-1 mRNA の有意な上昇、また、KGF の有意な低下が観察された。3MC の同時投与は、*in vivo* 同様 T による IGF-1 の上昇及び KGF 低下を抑制した。

5) 同定した新生仔期前立腺でのアンドロゲン応答遺伝子の 5'f 上流域のプロモーター活性

2a) mPSP94 プロモーター：mPSP94 の転写開始点上流-562bp を含む luc レポーターを作製し、アンドロゲン受容体(AR)とともに細胞株へ導入したところ、この領域がアンドロゲン応答性転写活性化を示した。そこで、このアンドロゲン応答に対する 3MC の作用を Ahr/Arnt(+) である HepG2 細胞により検討した結果、3MC 10^{-8} M \sim 10^{-6} M は、アンドロゲン応答性を増強することが示された。一方で、コンセンサスのアンドロゲン応答配列を有する (ARE) $_2$ -luc による応答は、3MC により濃度依存性に抑制された。エストロゲン受容体(ER)のアンドロゲン応答性転写に与える影響を検討するため、CHO 細胞株を用いて ER α ・ β をコトランスフェクションした。PSP94 プロモーター活性は、ER α の存在下で 2 \sim 7 倍になった。一方で、ER β による転写活性化促進は弱いことが示された。

EAPA2 プロモーター：mEAPA2 の転写開始点上流-1200bp を含む luc レポーターを作製した。このレポーターは単独では、アンドロゲン応答性を示さなかったが、ER α 存在下のみで応答性を発揮した。

6) 前立腺機能を指標とした、TCDD/3MC の新生児投与の影響検討

本研究で同定してきた応答遺伝子群を指標として、新生児期 TCDD 投与の影響を 6 週齢前立腺で検討した。主要な分泌タンパク質である腹葉の SPI-KT3、SBP、背側葉前葉の EAPA2、IgGBPLP の発現量は、TCDD 1000ng/kg 群でも有意な変化が見られなかった。一方で、PSP94、defensin β 、PCP4 の発現は、TCDD 投与量に依存して有意に発現上昇していた。特に defensin β は、TCDD 10ng/kg 群でも有意な発現上昇が見られた。一般に前立腺においてアンド

ロゲンにより調節されている代表的なタンパク質は、前立腺分泌タンパク質であるが、これまでマウスについては未解明であった。本研究では、プロテオーム解析によりこれらを解明し、IgGBPLK、EAPA 2、peroxiredoxin 6、GRP78等が新規に同定された。同定したタンパク質は、成体においては全てT応答性転写活性を示したが、その程度はタンパク質種と前立腺部位(葉)により異なっていた。さらに分泌タンパク質のうちSBP、SPI-KT3、probasin、PSP94は、新生児期においても、T応答性ターゲット遺伝子であることが示された。一方、投与後の新生仔前立腺を材料にしたマイクロアレイ解析により、T応答遺伝子として sulfotransferase、defensin β 1等が同定された。これら明らかになった新生児前立腺のアンドロゲン応答性遺伝子について、3MCの発現修飾作用を検討した。その結果、多くの遺伝子について、3MCの同時投与によりT依存性発現変化が抑制されることが示された。すなわち、3MCの作用は、遺伝子転写レベルでのアンドロゲン応答性の抑制であることが示唆された。そこで、ARE-luc レポーターを用いて検討した結果、3MCはAR-ARE応答性転写活性を阻害することが示された。しかし、PSP94プロモーターを介したアンドロゲン応答性転写活性を見てみると、低濃度3MCは、むしろ促進的に作用することが示された。このことから、TCDDによるPSP94遺伝子の発現亢進作用は、PSP94プロモーターを介した直接的な作用であることが示唆された。TCDDの新生児期投与により、成体(6週齢)の前立腺において、PSP94、defensin β 、PCP4のmRNAの発現が異常亢進していることが明らかになった。すなわち、低用量の

TCDDの新生児期暴露により、前立腺の分泌機能の一部が不可逆的に影響されることが示された。前立腺分泌タンパク質であるPSP94は、アポトーシスの促進作用などにより癌抑制遺伝子として機能することが知られる。また、前立腺から分泌されて精液に抗菌活性を付与すると考えられるdefensinについても、癌抑制遺伝子としての機能が見いだされている。従って、これらの遺伝子発現の異常上昇により、前立腺の正常発達が阻害されることが示唆される(藤本)。

以下にPCBの血中濃度定価作用に関する結果と考察を示す。

1)血中 T_4 濃度低下作用における肝臓UDP-GTの関与

Wistar系ラット及びGunnラットにKC500 10 mg/kgを10日間連続投与すると、血清中総 T_4 及び遊離 T_4 濃度は両ラットにおいていずれも有意に低下した。また、KC500を連続投与したWistar系ラットでは、UGT1Aの発現量及び T_4 -UDP-GT活性は著しく増加したが、Gunnラットでは、それらは全く変化しなかった。

また、KC500を連続投与したWistar系ラット及びGunnラットの血中から $[^{125}I]T_4$ の消失は、両ラットとも著しく亢進した。また、 $[^{125}I]T_4$ の全身クリアランス及び分布容積(Vd)も、両ラットにおいて有意に増加した。 $[^{125}I]T_4$ の血清-肝臓間分配係数(Kp値)及び $[^{125}I]T_4$ の肝臓への分布量は、KC500を連続投与した両ラットにおいて有意に増加した。一方、肝臓単位重量当たりの分布量は、KC500連続投与により、Wistar系ラットにおいて有意に増加したが、Gunnラットでは変化しなかった。また、KC500連続投与により、両ラットの

[¹²⁵I]T₄とT₄輸送タンパクであるTTRとの結合率は有意に減少し、アルブミンとの結合率が増加した。

両ラットにKC500を連続投与した時の血清中甲状腺ホルモン濃度、肝臓のUGT1Aの発現量及びT₄-UDP-GT活性の結果から、KC500を連続投与したGunnラットの血清中T₄濃度の低下には、肝臓のT₄-UDP-GT活性は関与していないことが示唆された。また、Gunnラットの親系統がWistar系ラットであることを考え合わせると、Wistar系ラットにおける血清中T₄濃度の低下には、T₄-UDP-GTの誘導に加えて、少なくとも一部、別の作用機序が存在する可能性が考えられる。

そこで、KC500連続投与による血清中T₄濃度の低下作用機構を追究するため、KC500を連続投与したWistar系ラット及びGunnラットに*ex vivo*で血清中から[¹²⁵I]T₄の消失について検討した。KC500を連続投与することにより、両ラットの血清中[¹²⁵I]T₄の消失は[¹²⁵I]T₄投与後5分から著しく亢進した。また、両ラットにおいて[¹²⁵I]T₄の全身クリアランス及びVdはいずれも顕著に増加し、Gunnラットでは[¹²⁵I]T₄の半減期も有意に増加した。これらの結果から、KC500を連続投与した両ラットの血清中T₄濃度の低下には、血清中[¹²⁵I]T₄のVdの増加が関与していること、またGunnラットでは、[¹²⁵I]T₄の分布過程の変化に加え、消失速度の増加も関与していることが示唆された。

そこで、KC500連続投与後の[¹²⁵I]T₄のVdの増加の要因を明らかにするため、[¹²⁵I]T₄の組織分布量について検討を加えた。両ラットとも、[¹²⁵I]T₄の移行量は肝臓で最も多く、KC500の連続投与によりその移行量及び肝臓の[¹²⁵I]T₄のK_p値は著しく増加

した。また、肝臓重量及び肝臓単位重量当たりの[¹²⁵I]T₄の移行量は、Wistar系ラットでは有意に増加したが、Gunnラットでは変化しなかった。これらの結果から、両ラットにKC500を連続投与することによる[¹²⁵I]T₄のVdの増加は、[¹²⁵I]T₄が、血中から主に肝臓へ移行することが示された。更に、Wistar系ラットにおける肝臓への[¹²⁵I]T₄の移行量の増加には、肝臓の肥大による量的変化及び肝臓のトランスポーターなどの質的变化が関与し、Gunnラットでは質的变化のみが関与していることが示唆された。

次に、KC500連続投与後の両ラットの血清中[¹²⁵I]T₄と血清タンパクとの結合率の変化について検討を加えた。Wistar系ラット及びGunnラットに[¹²⁵I]T₄を投与すると、血清中[¹²⁵I]T₄は主にTTRと結合していたが、KC500を連続投与すると、両ラットにおいて血清中[¹²⁵I]T₄とTTRとの結合は阻害され、[¹²⁵I]T₄とアルブミンとの結合が有意に増加した。これらの結果から、Wistar系ラット及びGunnラットにKC500を連続投与することにより血清中[¹²⁵I]T₄とTTRとの結合が阻害されるが、このことも血清中T₄濃度の低下の一因であると考えられる。

2)血清中T₄濃度低下作用における血清中TTRの関与

① KC500及びPentaCBによる検討

C57BL/6系(野生型)マウスにKC500(100 mg/kg)及びPentaCB(112 mg/kg)を投与した時、血清中総T₄濃度はいずれも著しく低下した。一方、TTR遺伝子欠損マウスでは、KC500を投与した時にのみわずかに低下した。この時、両マウスにおいて肝臓のUgt1a1の発現量は、両PCBにより同程度に増加した。一方、両PCB投与によるTTR遺伝子欠