

「内分泌かく乱物質」

平成10年度採択研究代表者

遠山 千春

(独)国立環境研究所 環境健康研究領域長

## 「リスク評価のためのダイオキシンによる内分泌かく乱作用の解明」

### 1. 研究実施の概要

世界保健機関(WHO)は、98年5月に「ダイオキシン類の耐容1日摂取量に関する見直し」のための諮問委員会を開催した。この見直し作業に参加し感じたことは、第1にリスクアセスメントに使用することができる科学的知見の一層の蓄積が必要なことである。第2には、これだけ我が国においてダイオキシンの健康リスクが問題になっているにもかかわらず、研究面での日本からの発信が極めて不十分であったことだ。そこで、日本からリスク評価に適用することができる学術的価値も高い研究成果の発信を集中的に行う必然的かつ緊急性がある。そこで、私たちは、リスク評価の基礎データを得る目的で、マウスやラットなどの実験動物を、妊娠時期を中心に感受性が高い期間に、低用量のダイオキシンに曝露し、いかなる影響が現れるかを観察し、メカニズムの解明を行うことを目指して研究を進めています。このプロジェクトが開始されて4年を経て、低用量ダイオキシンの生殖機能、脳機能・行動、免疫機能に及ぼす作用について、今までに知られていなかった新たな現象やそのメカニズムについての知見が得られてきた。

(1) 生殖機能への影響：マウス受精卵の特定時期の胚細胞にTCDDを曝露し、仮親に胚移植を行ったところ、妊娠14日目の胎仔重量が減少していた。この胎仔のゲノムDNAを解析したところ、胎仔の発育に関連するH19及びIgf2のゲノミックインプリント領域のメチル化DNAの比率が増加していた。

TCDDの精子発生に対する影響を検討するため、野生型、及びAhR欠損マウスにTCDDを投与し7日目に解剖をした。精巣内テストステロン値、ならびにP450sccタンパク量は、野生型マウスでのみ減少していた。TCDDの精巣内ステロイド酵素遺伝子への作用は、下垂体・性腺軸の変調によるものではなく、精巣特異的な現象であることが示唆された。

低用量TCDDの周産期曝露に伴う前立腺の発達障害のメカニズムの解明のため、特定時期に発現する遺伝子への作用の有無をマイクロアレイ解析により検討した。前立腺への作用は、AhR依存的、かつ妊娠13日に特異的なことから、13日目に特徴的な遺伝子プロフィールの中に前立腺発育遅延に関わる原因遺伝子がある可能性が高い。

妊娠15日目のホルツマン系ラットにTCDDを投与したところ、胎盤組織中のHSP27やGDPDHなどの発現量が上昇しており、胎盤の迷路部の血管の収縮が観察された。TCDD曝露ラット

の胎盤は、低酸素状態となっていることが推測できた。他方、SD系のラットにおいては、高い用量のTCDDによっても、血管の収縮や胎仔死亡も観察されず、CYP1A1の誘導能やAhR構造に、両系統で違いが無いことが判明した。

(2) 脳機能・行動への影響：脳の性分化に対するTCDDの影響について、雄優位性的二型核の影響を客観的に評価するための方法の確立、さらに、サッカリン水への甘味嗜好性についての検討を行った。

妊娠12.5日目にTCDDを投与したC57BL/6マウスの脳においてWntシグナル系の遺伝子であるsfrp2のmRNA量が上昇していることから、この遺伝子の発現の組織局在をin situ hybridizationによって調べた。第3脳室周辺において、TCDD投与群においては非対称性の局在を示した。

(3) 免疫機能への影響：TCDDによる免疫機能低下のメカニズムへのAhRの関与を調べるため、TCDDの有無に関係なく、恒常的に活性化しているAhR (CA-AhR)をT細胞特異的に発現させたトランスジェニックマウスを作製した。さらに、Jurkat T細胞にCA-AhRをトランスフェクションし、細胞周期抑制やアポトーシスへの影響を検討した。CA-AhR導入Jurkat T細胞では、細胞数の増加が完全に抑制された。この細胞ではG1期の割合が増加しS期の割合が低下しており、CA-AhRは細胞周期の進行をG1期で抑制していると考えられた。またこの細胞ではアポトーシス細胞が増加していた。

妊娠12.5日の母ラット、あるいは離乳時期の仔に、TCDDを投与し、生後3週齢の仔に卵白アルブミン (OVA) を免疫し、その1週間後にOVAに対するIgM抗体価を測定した。その結果、3週齢でTCDD曝露した群でのみ、用量依存的に抗原特異的IgM産生が抑制されることが明らかとなった。6週齢ラットを用いて同様の実験を行ったが、抗体産生の抑制は認められなかったことから、離乳時期のマウスがTCDDに対して感受性が高いことが明らかとなった。

アトピー性皮膚炎の炎症増悪とTCDD曝露との関連について明らかにするために、アトピー性皮膚炎自然発症 (NC/Nga) マウスに、皮膚感作アレルゲンを塗布し、その後にTCDDを経口投与したが、IgE抗体価の増加はみられなかった。

(4) 内分泌攪乱作用に基づいたダイオキシンのリスク評価手法の提示：ダイオキシンのリスク評価の際に、2,3,7,8,-TCDDを標準としてその他のダイオキシン類の異性体の相対的毒性がTEF概念のもとに算定されている。そこで、TCDD様毒性を示すコプラナーPCB (PCB77、PCB126) と非コプラナーポリ塩素化ビフェニル (PCB153) を個別に、マウスに投与することにより、甲状腺ホルモン、関連遺伝子の発現解析、免疫組織学的検索を行った。その結果、PCB126投与による血清T4 の低下はAhR を介した影響であると考えられた。PCB77投与によるT4 の低下は主にトランスチレチン が関与すると考えられた。PCB153投与によるT4 の低下は、AhRを介さないメカニズム推測された。

妊娠15日のHoltzmanラットにTCDD 1 µg/kg、あるいはコーン油を一回経口投与し、生後1日目に、曝露群、対照群のそれぞれ半数の腹をcross-fosterし、曝露形態の組み合わせによる4群の仔について、生後21日目における仔の甲状腺機能への影響、関連する遺伝

子発現の解析を行った。昨年報告した血清中TT4濃度の低下および胸腺重量の減少、肝臓重量の増加に加えて、CYP1A1、UGT1A6およびUGT1A7の発現誘導が授乳期にTCDD曝露したラットに認められた。さらに授乳期にTCDD曝露したラットでは、肝臓レチノイドの有意な減少および水腎症の高い発症率が認められた。すなわちTCDDの甲状腺機能への毒性影響は妊娠中のTCDD曝露に無関係で、授乳期にTCDD曝露したラットに現れることが明らかとなった。

## 2. 研究実施内容

生殖機能への影響（リーダー：大迫誠一郎）

### ① 受精卵、初期胚への影響（担当：呉 慶ほか）

胚発生と胚内における遺伝子発現へのダイオキシンの影響を報告してきた。マウス受精卵の体外培養系で各ステージの着床前胚に対するTCDD曝露を行ったが、以前の報告と異なり分化率に影響は無く、胚盤胞への分化はTCDDによって影響されないこと、また、各培養胚からRNAを抽出し、各種遺伝子の発現を半定量的RT-PCRで測定したところ、1細胞期および胚盤胞においてAhRの発現は観察されるが、8細胞期においてはほとんど発現が観察されないことを示した。また、CYP1A1のTCDDによる誘導は胚盤胞ではあるものの、1および8細胞期胚ではないことを示し、1-8細胞期胚はそれ以降の胚とTCDDに対する感受性に差があることがわかった。そこで、1-8細胞期胚にTCDDを曝露、仮親に胚移植し、GD14における胎仔重量を測定したところ、TCDD曝露群で有意な体重減少が観察された。さらに、この胎仔からゲノムDNAを抽出し、胎仔発育に関連するとされるH19-Igf2のゲノミックインプリント領域のメチル化解析を行ったところ、対照群では50:50の比率で既知のメチル化パターンであったが、TCDD曝露群ではメチル化DNAの比率が増加し、さらに部分メチル化パターンが約20%の頻度で観察された。これらの結果は初期胚に対するTCDD曝露がゲノムメチル化に影響を与えることを示唆している。

### ② 雄性生殖細胞系列に対する影響（担当：福澤徳穂ほか）

これまで、ダイオキシソ類が雄配偶子（精子発生）に対して直接的に影響するのか検討するため、新生仔マウスから精巣を摘出し、コプラナーPCB（co-PCB）に対する曝露実験を行ってきた。その結果、最も感受性の高いと考えられるこのステージの精巣においても各細胞の増殖率分化率に影響は認められなかった。しかしながら、CYP1A1 mRNAはco-PCBの用量依存的に上昇し、ステロイド合成酵素であるP450scc mRNAレベルは減少、P450c17 mRNAレベルは上昇することを報告した。性ステロイドは精子発生に必須の因子である。そこで、このようなステロイド合成酵素遺伝子のダイオキシソによる発現変動およびテストステロン産生変動がAhR遺伝子依存的であるか検討するため、野生型およびAhR遺伝子欠損（AhRKO）成熟雄マウスを用いTCDD 100 µg/kg投与後7日目に解剖した。精巣内テストステロン値は野生型で有意に減少したが、AhRKOマウスでは変化がなかった。また野生型のみで、新生仔器官の培養系と同様、P450sccのmRNAレベルおよびタンパクレベルの減少が確認された。したがって、テストステロン産生抑制とP450scc発現抑制はAhR遺伝子依存的であることが明らかとなった。一方、同じステロイドホルモン産生器官である副

腎では、P450sccレベルに変動はなかった。また、TCDD投与群の脳下垂体内LHβサブユニットmRNAレベルを、陽性対照のエストラジオールベンゾエート(EB) 100 μg/kg投与群と比較解析したが、TCDD投与ではEBの様なLHβサブユニットmRNAの消失は無く、Vehicle投与群との差は認められなかった。上記の結果は、TCDDによる精巣内ステロイド酵素遺伝子(P450scc)のdown-regulationが下垂体性腺軸の変調によるものではなく、精巣特異的現象であることを示唆している。

#### ③ 雄性生殖器官発生に及ぼす影響 (担当：大迫誠一郎ほか)

これまで、ダイオキシン類の胎仔期曝露によりもっとも顕著な変化を示すとされる雄の外部生殖器・副生殖腺の発生影響における作用メカニズムの解明を目的に、関連する遺伝子の発現変化と、最も影響の現れやすい投与時期を検討してきた。妊娠15日(GD15)のラットにTCDDを単回経口投与による、産仔の腹側前立腺内5α-reductase mRNAの発現上昇とandrogen receptor mRNAの発現減少を報告した。またGD15、GD18、PND2にTCDDを投与したところ、GD15投与で、AGDと腹側前立腺の減少とandrogen receptor mRNAレベルの前立腺内での減少が見られたが、他方、GD18とPND2投与群では変化がなかった。前立腺重量の減少は、GD15より後の妊娠期間中における曝露では引き起こされないこと、すなわちクリティカルウィンドウの存在が示された。また、TCDDによるこの現象がAhR遺伝子依存性であるか検討するため、AhR遺伝子ヘテロマウス(+/-)雌雄を交配し、GD13に10 μgTCDD/kgを投与、PND14の雄を解析したところ、AhR(+/+)および(+/-)のTCDD投与群のみにAGDの短縮が生じ、一方、probasin, mp25, PSP94などの前立腺分泌タンパク遺伝子群の発現が見られなかったことから、ダイオキシンによる雄性生殖器官発生影響はAhR依存性であることが判明した。さらに本年度は、この現象を起こすAhR-ダイオキシン依存性の胎仔遺伝子を探索するため、野生型マウスGD13およびGD17に10 μgTCDD/kgおよびvehicleを投与し、24時間後に雄胎仔の全RNAを回収し、各群任意に5個体を混合し、GD13-TCDD投与群対GD13-Vehicle投与群、GD17-TCDD投与群対GD17-Vehicle投与群にて、マイクロアレイ解析(Atlas Mouse Glass Array 3.8I, Clontech)を行った。その結果、3756の全遺伝子中、822遺伝子がいずれか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遺伝子および239遺伝子がGD13-TCDD投与群でup (ratio > 1.5)あるいはdown (ratio < 0.67) -regulationされることがわかった。面白いことに、そのうちGD17-TCDD投与群でもupあるいはdown -regulation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。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。

#### ④ 胎盤・妊娠子宮機能に及ぼす影響 (担当：石村隆太ほか)

昨年度、妊娠ホルツマンラットにTCDDを曝露すると胎仔の死亡率の上昇がおき、また同時に胎盤のグルコース動態が異常になることを報告した。今年度は、TCDDに曝露された胎盤の変化と胎仔の死亡との関連性を説明できる生体、分子を明らかにすることを目的と

して、1) TCDDに曝露した胎盤において発現量が変化するタンパク質を二次元電気泳動法により検出および同定を行い、2) 子宮動脈結紮モデルにおいて発現量が変化するタンパク質とTCDD曝露モデルとの比較を行った。ホルツマンラットの妊娠15日目に1600 ng/kgのTCDDを曝露し、GD16およびGD20に胎盤を回収した。胎盤の15,000 x g上清画分を二次元電気泳動に処し、発現量が変化しているタンパク質を検出した。目的のタンパク質をゲルから回収してアミノ酸配列分析にかけ同定を行った。その結果、TCDDに曝露された胎盤では、曝露1日後からHsp27とトロポミオシンベータ鎖が発現上昇傾向を示し、その後にGAPDHの発現量が上昇してくることが明らかとなった。次に、GD15に子宮動脈結紮モデルを作出し、GD20に胎盤を回収した。この胎盤を同様に処理し二次元電気泳動で解析したところ、GAPDHの発現量が上昇していることが明らかとなり、低酸素状態のマーカー遺伝子として有用であることが明らかとなった。また我々は胎盤の迷路部を組織学的に精査したところ、GD20のTCDD曝露胎盤では母体血管の径が有意に縮小していることを見出した。以上の結果から、GD20にTCDD曝露胎盤が低酸素状態になっていることが明らかとなった。次に、昨年度に引き続きホルツマンラット、ならびにTCDDに対して低感受性であるSDラットを用い、TCDDによる胎盤機能の変化と胎仔の死亡の関連性について解析を行った。SDラットに0、2、5、10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、ホルツマンラットに0、0.8、1.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ のTCDDをGD15に単回経口投与しGD20に解剖した。SDラットでは高用量の10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ のTCDD曝露によっても、胎仔死亡は観察されず、胎盤のグルコース輸送を担うGLUT3 mRNA発現量の変化も認められなかった。また迷路部の血管の太さを組織学的に検証したところ、ホルツマンラットにのみ母体血管の縮小が観察された。両系統間での影響の差はAhRの活性の差によるのかどうかを検討するため、上記の高用量曝露動物に加え、0、12.5、50、200、800、1600 ng/kg曝露動物を用意し、CYP1A1の誘導率を測定した。その結果両系統間では差が認められなかった。これらのことから胎仔死亡や胎盤の機能変化の系統差はAhRの活性だけで決定されるものではなく、胎盤の血管構造等の遺伝的な背景の違いが要因となっていると考えられた。

脳機能・行動に及ぼす影響（リーダー：曾根秀子）

① 遺伝子改変マウスを用いた性ステロイド産生系への影響解析（担当：曾根秀子ほか）

AhRノックアウトマウス（C57BL/6）を用いた、aromatase及びエストロゲン受容体（ER $\alpha$ ）遺伝子発現に対するTCDDの経胎盤・経母乳曝露の影響について、変化が認められなかったことから、マウスの脳においては、TCDD曝露によるステロイド代謝酵素遺伝子の発現変動への直接影響はほとんどない可能性が示唆された。

② 視索前野性的二形核の神経細胞死に対する影響（担当：掛山正心ほか）

脳の性分化に対する影響については結果が錯綜しており、我々の研究グループ内でのSDN-POA（雄優位性的二形核）の大きさについての結果も、影響が認められたケース（GD15のHoltzman母動物に対して200 ng/kg曝露した場合。第3回環境ホルモン学会にて発表）と認められないケース（GD15のLong-Evans母動物に対して200 または800 ng/kg曝露。組織学的検査は先のHoltzmanラットのものと同条件である。NeuroToxicology, in press）がある。この点について検証するため、まず非曝露のHoltzmanラットを用い、出生直後（雌

雄差の決定時期)のPOA性的二形核における神経細胞死数についての試験法を確立した。AVPvN-POA(雌優位な神経核)ではTUNEL陽性細胞数が雄で多く、SDN-POAでは雌が多かった。さらにAVPvN-POAの雌雄差は生後1日齢で顕著であり、SDN-POAのそれは生後7日齢で顕著であったことから、脳の雌性化と雄性化の時期が異なっていることが新たに示された。神経細胞あたりのTUNEL陽性細胞数を指標としたところ、TUNEL陽性細胞数の雌雄差は、それぞれの部位において約5倍認められたことから、本試験法は脳の雄性化と雌性化それぞれの指標について感受性が高く毒性試験としても有効であると考えられた。現在、TCDDの経胎盤・経母乳曝露(GD15の母動物に対して200 ng/kgを経口投与)を行った仔動物の脳について検討中である。

③ 脳における性決定機構へのダイオキシンの影響とそのメカニズム解析(担当:静岡県立大・池田雅彦ほか)

昨年度までの研究において、Holtzmanラットにおいて、TCDDの経胎盤・経母乳曝露(GD15の母動物に対して200 ng/kgを経口投与)により、雄の新生仔の脱雄性化とSDN-POAの体積の減少が認められたが、800 ng/kgの曝露ではその変化は認められなかった。そこでTCDDの曝露用量依存性について検討するため、50、100、200、400 ng/kgのTCDDを曝露(母動物に対する量)した動物について検討した。PND2での産仔数、仔の体重およびAGDにはいずれの濃度のTCDDにおいても曝露による有意な影響は認められなかった。また雄の血清テストステロン濃度にTCDD曝露による有意な変化は認められなかった。PND28で離乳し、PND84で甘味嗜好性試験(サッカリンテスト)を行った。雄において、サッカリン水(0.25%)の飲水量はTCDD 50 ng曝露群では変化なく、100 ng曝露群で対照群に比し増加傾向を示し、200 ng曝露群では対照群に比し有意な増加が認められた。しかし400 ng曝露群では対照群と同程度であった。サッカリンテスト終了後(PND98-112)における雄の腹側前立腺重量はTCDDの曝露用量依存的に低下し、400 ng曝露群で対照群に比し有意に低下した。以上の結果から、雄の甘味嗜好性に対しTCDDは比較的低用量の限られた用量でのみ影響を与えることが明らかとなった。

④ ダイオキシンの脳の発達過程における毒性発現機構の解析(担当:山梨大・前田秀一郎;国環研:座波ひろ子ほか)

先に、妊娠12.5日目のC57BL/6マウスに体重当たり5 µg/kgのTCDDを投与し、6日後にその影響を遺伝子レベルで解析し、Wntシグナル伝達系の調節に関与するsecreted frizzled-related protein 2 (SFRP2) mRNA量が、脳で増加することを見出した。そこで胎仔脳を、*in situ*ハイブリダイゼーション法により解析し、第三脳室周辺のSFRP2 mRNAが、投与群では非投与群と異なり、非対称的に局在することを見出した。また、ニッスル染色によりSFRP2発現場所以外の大脳皮質などでもマイグレーションの異常か細胞の過形成と考えられる構造異常の可能性が示唆されており、現在、解析を進めている。

さらに、SFRP1とSFRP3 mRNA量が約3倍に増加していた。そこで、Wntシグナル伝達系の標的遺伝子の発現変化を調べたところ、c-MYC mRNA量は非投与群に比べ投与群において増加していたが、connexin43とc-junのmRNA量に、両群間で差異はなかった。また、Wntシグ

ナル伝達系の他の関連タンパク質、Wnt-1、-4、-7B、 $\beta$ -cateninのmRNA量にも変化がなかった。glycogen synthase kinase-3 $\beta$  については、タンパク質量とそのリン酸化レベルについて、ウエスタンブロット法で解析したが、変化を認めなかった。そこで現在、その細胞内分布を免疫組織化学的に調べている。またWntシグナル伝達系の亢進には、 $\beta$ -cateninの核内への移行が必須である。そこで現在、その細胞内分布も免疫組織化学的に解析している。

上記、SFRP2 mRNAの脳内局在の変化は、TCDDが脳の発生分化に重大な影響を及ぼして、その毒性を発現している可能性を示唆している。そこで、脳の形態形成への関与が考えられる、Pitx2、ActRIIB、Lefty1、Nodal、Hes1、Hes5のmRNA量を胎生18.5日で調べたが、TCDD曝露による変化を認めなかった。今後、TCDD曝露による脳の形態形成変化機序の解明を目指し、胎生のより早い時期からこれら遺伝子の発現を経時的に調べる計画である。また昨年、褐色脂肪細胞において、uncoupling protein-1 (UCP-1) mRNA量がTCDD投与群で増加していることを見出したが、免疫組織化学的解析の結果、未熟な脂肪細胞で強く発現しているのを認めた。

### (3) 免疫機能への影響 (リーダー：野原恵子)

#### ① T細胞特異的constitutive active-arylhydrocarbon receptor (CA-AhR) トランスジェニックマウスの作成 (担当：野原恵子ほか)

TCDD曝露によって抗体産生が抑制されることが知られているが、私達のこれまでの研究結果から、TCDDはB細胞が抗体産生細胞に分化する際に必須の働きをするT細胞の活性化を抑制することによって、間接的に抗体産生を抑制することが示唆されている。そこでT細胞におけるAhRの活性化が免疫抑制の原因であるかどうかを明らかにするために、TCDDの有無に関わらず活性化しているconstitutive active AhR (CA-AhR)をCD2プロモーターを用いてT細胞特異的に発現させたトランスジェニック (Tg) マウスを作製した。CA-AhRは、リガンド結合部位の一部を欠失し、リガンド非存在下でも核へ送られ転写活性化能を持つ変異体を、藤井義明先生よりご供与いただいた。

C57BL/6マウスとDBA/2マウスを交配させて得た受精卵に、VA CD2-CA-AhRおよびVA CD2-GFPをco-injectionし、これらの遺伝子を発現しているF1マウスを得た。得られたマウスはC57BL/6マウスと戻し交配を行った。現在1ラインについてはN4世代を交配し、N5を得ようとしているところである。これらのマウスでは、期待どおり胸腺および脾臓でCA-AhRの発現、およびAhR依存的に誘導されるCYP1A1の発現が確認された。さらにGFPを指標としたセルソーター解析で、導入した遺伝子がCD4 T細胞およびCD8 T細胞で発現し、B細胞には発現していないことが確認された。このマウスの胸腺では、ダイオキシンを投与した時と同じく細胞数の減少、およびCD8 single positive細胞の比率の増加が見られ、これらがT細胞のAhR依存的な現象であることが明らかとなった。

N5世代の動物において、今後免疫機能への影響を詳細に検討する予定である。また現在複数のラインを作製中である。

## ② AhRの活性化がT細胞の増殖・アポトーシスに及ぼす影響（担当：伊藤智彦ほか）

これまでの私達の研究で、TCDDは免疫反応におけるT細胞の活性化とそれに続く増殖を抑制することが示されている。そのメカニズムを明らかにするために、Jurkat T細胞に constitutive active AhR (CA-AhR)をトランスフェクションし、細胞周期抑制やアポトーシスへの影響を検討した。CA-AhRをJurkat T細胞にトランスフェクションすると、細胞数の増加が完全に抑制された。セルソーターで細胞周期を調べた結果、CA-AhRをトランスフェクションしたJurkat T細胞ではG1期の割合が増加しS期の割合が低下しており、CA-AhRはJurkat T細胞の細胞周期の進行をG1期で抑制していると考えられた。またCA-AhRをトランスフェクションしたJurkat T細胞では、Annexin-V陽性のアポトーシス細胞が増加していた。これらの結果から、CA-AhRはT細胞において細胞周期の抑制およびアポトーシスの両方を誘導することによって増殖を抑制することが示唆された。今後はさらに、T細胞において細胞周期やアポトーシスを制御しているCA-AhRの標的遺伝子を検索する予定である。

## ③ TCDDが抗体産生に及ぼす影響の曝露時期による感受性の比較（担当：井上薫ほか）

これまでマウス成獣の体液性免疫に対するTCDDの影響を検討し、サイトカイン産生など感度の高い指標を明らかにしてきた。さらに今年度は、それらの指標を用いて、曝露時期による感受性の比較を行った。

妊娠12.5日の母親に、または離乳時期(生後3週令)の仔に直接、TCDD(3, 1, 0.3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重)を経口投与し、いずれの群についても生後3週令の仔に卵白アルブミン(OVA)を免疫し、その1週間後にOVAに対するIgM抗体価を測定した。その結果、3週令でTCDD曝露した群でのみ、用量依存的に抗原特異的IgM産生が抑制されることが明らかとなった。その抑制は3  $\mu\text{g}$  TCDD /kgで有意であった。マウスの性別による感受性の違いは認められなかった。つぎに、同様に6週令のマウスにTCDD投与およびOVA免疫をし、1週間後にOVA特異的IgM抗体価を測定した結果、抗体産生の抑制は認められなかった。以上の結果から、離乳時期のマウスがTCDDに対して感受性が高いことが明らかとなった。

これらの結果について、TCDDに対してIgM産生よりも感度の高い指標であるIL-5の産生を指標として、影響が検出される閾値をさらに検討中である。

## ④ アトピー性皮膚炎自然発症マウスにおけるアレルギー反応に及ぼす影響（担当：藤巻秀和ほか）

アトピー性皮膚炎の発症とTCDD曝露との関連について明らかにするために、これまで、抗原OVAで感作したアトピー性皮膚炎自然発症NC/NgaマウスへのTCDD投与の影響について検討した。その結果、抗原特異的なIgE産生は抑制し、同時にTh2タイプのサイトカイン産生も顕著に抑制することが明らかとなった。また、TCDD投与によるアトピー性皮膚炎様症状の自然発症も認められなかった。そこで、アトピー性皮膚炎の炎症増悪とTCDD曝露との関連について明らかにするために、NC/Ngaマウスへ前もってアレルゲンを皮膚に塗布して誘導したアトピー性皮膚炎様症状にその後のTCDD投与がどのような影響を与えるのか検討した。皮膚感作アレルゲンとして塩化ピクリルを用いて毎週1回塗布し、4回塗布後に0, 5及び20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ TCDDを経口投与した。その結果、TCDD投与1週後と2週後における血中



のIgEを測定したが、アトピー性皮膚炎自然発症マウスでの増悪を示すIgE抗体価の増加はみられなかった。皮膚組織における炎症像への影響については解析中である。

#### ⑤ コプラナーPCBとTCDDの免疫系への影響の比較（担当：潘小青ほか）

コプラナーPCB類の免疫系への影響は、ほぼAhR依存性であると報告されている。そこでAhR依存的に作用するコプラナーPCB、PCB169（TEF=0.01）の一次免疫反応に対する影響をTCDDと比較した。その結果、TCDD 20 µg/kgの一回経口投与でIgG1産生の抑制や、T細胞からのIL-5産生の抑制が見られるのに対して、2 mg/kgまたは5 mg/kgのPCB169一回経口投与ではどちらも抑制されなかった。AhR依存的に誘導されるCYP1A1 mRNAの発現量を調べると、TCDD 20 µg/kgとPCB169 5 mg/kgの投与で、肝臓では同程度のCYP1A1の誘導が見られるものの、脾臓ではPCB169による誘導はTCDDに比べてかなり弱いことが観察された。以上の研究から、IgG1産生をはじめとする免疫機能に対してはPCB169のTEF0.01という係数は適用されないことが明らかとなった。

#### (4) 内分泌攪乱作用に基づいたダイオキシンのリスク評価手法の提示（リーダー：米元純三）

##### ①ダイオキシン/ポリ塩素化ビフェニル類の甲状腺ホルモンおよびレチノイド代謝への作用メカニズム

ダイオキシンのリスク評価の際に、2,3,7,8-TCDDを標準としてその他のダイオキシン類の異性体の相対的毒性がTEF概念のもとに算定されている。そこで、TCDD様毒性を示すコプラナーPCBとその他のポリ塩素化ビフェニル類を用いて、リスク評価のための検討を行った。

##### (1) 甲状腺機能への影響（担当：西村典子ほか）

妊娠期の2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin（800 ng TCDD/kg BW）一回投与が、仔の甲状腺機能に影響を及ぼし、不可逆的な甲状腺濾胞細胞の過形成が生じることを昨年度までに報告してきた。さらにaryl hydrocarbon receptor（AhR）欠損マウスを用いた実験で、TCDDによるT4の低下およびUGT1A6の発現誘導がAhRを介することを明らかにしてきた。

一方、塩素化ビフェニル(PCB)類による血清T4の低下は、主に、その水酸化代謝産物とT4のtransthyretin（TTR：T4輸送タンパク）に対する競合的結合によることが示唆されている。今年度は、TTR欠損(TTR<sup>-/-</sup>)マウスを用いてTCDDおよびPCB同族体の曝露にともなうT4低下へのTTRの関与について検討した。

13週齢の野生型（TTR<sup>+/+</sup>）およびTTR欠損（TTR<sup>-/-</sup>）雌マウスに、PCB77（50, 75 mg/kg BW）、PCB126（1 mg/kg BW）、PCB153（200 mg/kg）およびTCDD（10, 20 µg/kg BW）を単回経口投与して、7日後に血清および肝臓・胸腺を採取し、甲状腺ホルモン、関連遺伝子の発現解析、免疫組織学的検索を行った。

対照群ではTTR<sup>-/-</sup>マウスの血清total T4（TT4）レベルはTTR<sup>+/+</sup>マウスの約50%であった。血清TT4濃度はTTR<sup>+/+</sup>マウスではTCDDおよびいずれのPCB投与群においても、対照群に比べて有意に低下し、特にPCB77投与群の低下は他の投与群に比べて大きかった。

TTR -/-マウスの血清TT4 濃度がTCDD投与群で対照群の約10%まで低下していたのに対し、PCB77 とPCB153 投与群は約70%までしか低下しなかった。TCDD やPCB126 投与群ではTTR +/+マウス、TTR -/-マウスともに肝臓のCYP1A1、CYP1A2、UGT1A6 mRNA の誘導が見られたが、PCB77 とPCB153 投与群ではこれらAhR 応答遺伝子の誘導が見られなかった。

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

## (2) レチノイド代謝への影響 (担当：西村典子ほか)

これまでに、AhR遺伝子欠損マウスではTCDD曝露による肝臓retinoid量の低下が起きないことから、TCDDはAhRを介して肝臓retinoid量を低下させることを報告した。一方、ポリ塩素化ビフェニル類 (polychlorinated biphenyl, PCB) もretinoidの代謝に影響を及ぼすことが知られているが、この場合はPCBの水酸化代謝産物とretinolのtransthyretin (TTR) に対する競合的結合により血清中retinolの減少が起こると考えられている。本実験では、TTR遺伝子欠損マウスを用いて、TCDDおよびPCB同族体のretinoid代謝への影響に対するTTRの関与について検討した。

13週齢の野生型 (TTR+/+) およびTTR欠損 (TTR-/-) 雌マウスに、PCB77 (50, 75 mg/kg BW)、PCB126 (1 mg/kg BW)、PCB153 (200 mg/kg) およびTCDD (10, 20 µg/kg BW) を単回経口投与して、7日後に血清および肝臓を採取し、レチノイド代謝への影響を調べた。体内のvitamin Aの80%以上が肝臓に存在し、主として脂肪酸エステル (retinyl esters) の形で貯蔵されていて、retinyl estersはパルミチン酸エステル (retinyl palmitate) が最も多いことが分かった。本研究ではretinol、retinyl palmitateとその他のretinyl estersのうち主要な7種を測定し、これらの合計をtotal retinoidとした。

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

## ② Cross-fostering 実験による経胎盤曝露と母乳曝露のダイオキシン毒性の検討 (担当：米元純三ほか)

昨年度に継続してTCDDの妊娠期、授乳期曝露による甲状腺機能への影響が、妊娠期の

経胎盤曝露によるものか生後の授乳による曝露によるものを明らかにするために行った cross-fostering 実験の発現遺伝子の解析を行った。

妊娠15日のHoltzmanラットにTCDD 1 µg/kgまたは対照群にコーン油を一回経口投与した。生後1日目に、曝露群、対照群のそれぞれ半数の腹をcross-fosterし、曝露形態の組み合わせによる4群の仔について、生後21日目における仔の甲状腺機能への影響、関連する遺伝子発現の解析を行った。昨年報告した血清中TT4濃度の低下および胸腺重量の減少、肝臓重量の増加に加えて、CYP1A1、UGT1A6およびUGT1A7の発現誘導が授乳期にTCDD曝露したラットに認められた。さらに授乳期にTCDD曝露したラットでは、肝臓レチノイドの有意な減少および水腎症の高い発症率が認められた。すなわちTCDDの甲状腺機能への毒性影響は妊娠中のTCDD曝露に無関係で、授乳期にTCDD曝露したラットに現れることが明らかとなった。

③ 実験動物におけるTCDDの体内負荷量および内分泌かく乱作用に基づいたダイオキシンのリスク評価手法の提示（担当：信州大・宮原裕一ほか）

cross-fostering実験において、生後21日目の仔の肝臓および血清中TCDD濃度を測定した。雄の肝臓中の濃度は、胎児期のみの曝露群の44 pg/g-wet に対して、授乳期のみの曝露群が1120 pg/g-wet、胎児期・授乳期曝露群が2200 pg/g-wetであった。経胎盤曝露群に比べて授乳期にTCDD曝露したラットで顕著に高い値が認められ、仔の体内ダイオキシンの大部分は授乳により、親から仔へ移行することが明らかとなった。

これまでダイオキシン類およびポリ塩素化ビフェニル類の毒性は、AhRとの親和性やAhRを介した酵素の誘導能などに主に基づくTEFを指標として評価がなされてきた。本実験結果によりコプラナ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ポリ塩素化ビフェニル類の甲状腺機能に関する毒性評価に今後はTEF以外の新たな指標が必要と考えられる。

### 3. 研究実施体制

#### (1) 総括グループ

① 研究分担グループ長：遠山千春（国立環境研究所環境健康研究領域 領域長）

② 研究項目：研究全体

#### (2) 生殖機能グループ

① 大迫誠一郎（国立環境研究所環境健康研究領域 主任研究員）

② 受精卵・初期胚及び性比

生殖細胞系列・生殖器官発生

胎盤機能

#### (3) 脳機能・行動グループ

① 曾根秀子（国立環境研究所環境ホルモン・ダイオキシンプロジェクト 主任研究員）

② 脳の性分化・性行動

甲状腺ホルモン系

(4)免疫機能グループ

① 野原恵子 (国立環境研究所環境健康研究領域 室長)

② 免疫機能の抑制

アトピー性疾患

(5)リスク評価グループ

① 米元純三 (国立環境研究所環境ホルモン・ダイオキシンプロジェクト 総合研究官)

② リスク評価

ダイオキシン分析

4. 主な研究成果の発表 (論文発表および特許出願)

(1) 論文 (原著論文) 発表

- 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.
- Doi H., Baba T., Tohyama C., 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.
- Kakeyama 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. *Neuro Toxicology*, 24:207-217, 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*, 17/3, 259-269, 2003.
- Ishimura R, Ohsako S, Kawakami T, Sakaue M, Aoki Y, Tohyama C. Altered protein profile and possible hypoxia in the placenta of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposed rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 185:197-206, 2002.
- Ito T, Inouye K, Fujimaki H, Tohyama C, Nohara K. Mechanism of TCDD-Induced Suppression of Antibody Production: Effect on T Cell-Derived Cytokine Production in the Primary Immune Reaction of Mice. *Toxicol. Sci.*, 70: 46-54, 2002.
- Wu Q., Ohsako S., Baba T., Miyamoto K., Tohyama C. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the mouse preimplantation embryos. *Toxicology*, 174: 119-129, 2002.

(2) 特許出願

無し