

研究サブ・グループ1 Co-PCBsの次世代に及ぼす影響

代田欣二 (生物科学総合研究所)

村上 賢 (獣医学部)

赤堀文昭 (獣医学部)

代田真理子 (客員研究員, 財・食品薬品安全センター秦野研究所)

櫻田陽右 (大学院獣医学研究科動物応用科学専攻)

早坂恵子 (大学院獣医学研究科動物応用科学専攻)

笠井 豊 (大学院獣医学研究科動物応用科学専攻)

澤井政善 (大学院獣医学研究科動物応用科学専攻)

研究目的

本研究の目的は、コプラナー PCB の一つである 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) の暴露が次世代の雌性動物の生殖機能にどのような影響をもたらすかを明らかにする事である。これまでに我々は、ラットにおいて PCB126 の経胎盤・乳汁暴露が雌出生子の春機発動を遅延させ初回排卵数を減少させること、卵巣重量を減少させること等を報告してきたが、これは PCB126 暴露が卵胞発育を阻害することによると考えられる。ラットの卵巣では、卵胞は出生後に形成され、日齢を追って発育していくので、本研究では卵胞の発育段階によって発現の程度が異なる遺伝子の発現を定量解析するなどして、どの発育段階の卵胞が PCB126 の標的となっているのか、どの時期の暴露が卵巣の機能障害にとってクリティカルであるかを検討する。

(1) 妊娠ラットへの PCB126 単回投与 (経胎盤・経乳汁暴露) が出生雌ラットの卵巣における遺伝子発現に及ぼす影響

【方法】

妊娠15日のSD系ラットにコーン油、あるいは PCB126 を 10, 30 または 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で経口投与し、雌出生子を 5, 10, 15, 21, 24 日齢の各時期に屠殺して卵巣を採取した。卵巣について real-time PCR により、卵胞の発育に伴って増加する顆粒膜細胞や莢膜細胞に発現する *inhibin α* サブユニットおよび *βA* , *βB* サブユニット、顆粒膜細胞の分化に伴い発現が増加するとされる *aromatase*、卵胞発育において重要な役割を担うゴナドトロピンの受容体である FSH 受容体、LH 受容体、発育開始前から卵母細胞に発現する *c-kit*、発育開始後の卵母細胞に発現する *BMP-15*、*GDF-9* 各遺伝子の発現を定量解析した。さらに、ダイオキシン類の毒性発現に重要な AhR とその標的遺伝子 *CYP1A1* の遺伝子の発現量を定量した。また、残りの一部の動物は、膈開口日まで飼育して、初回排卵数を数えた。

【結果と考察】

これまでの実験同様に、体重増加抑制と共に、卵巣重量は 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上で、初回排卵数は、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で対照群と比較して、有意な減少が認められた。*CYP1A1* は、暴露動物の卵巣において 5 日齢で既に有意な増加が認められ、その後次第に減少した。発育卵胞に発現する *inhibin βA* , *βB* サブユニット、アロマターゼおよび LH 受容体の遺伝子発現量は、中用量から高用量群の動物で 10 日齢以降に、また *inhibin α* の遺伝子は 5 日齢から、同日齢の対照と比べて有意な低値を示した。一方、日齢の進行により卵巣の total RNA に対する寄与率が低下していく卵母細胞に発現する *GDF-9*, *BMP-15* の各遺伝子は、15 日齢以降の高用量群で発現量は高値であった。本実験の結果から、PCB126 の暴露が幼若期卵巣における卵胞を構成する体細胞に発現する遺伝子の発現量を減少させること、また、それにより発育開始後の卵胞が PCB 暴露の標的となっていることが示唆された。

(2) 性腺刺激ホルモンによる誘起排卵に対する PCB126 の影響

PCB126と同様にAhRを介して毒性を発現するTCDDを幼若雌ラットに投与すると、性腺刺激ホルモンによる誘起排卵が抑制されることが報告されていることから、PCB126の出生後直接暴露の影響を誘起排卵に至るまでの卵巣における遺伝子発現と併せて検討した。

【方法】

24日齢のSD系雌ラットにコーン油、または160, 320 $\mu\text{g}/\text{kg}$ のPCB126を経口投与し、投与後24時間にPMSG 5IUを皮下投与して、その約76時間後に排卵数を数えた。一部の動物はPCB126投与時(0h), 6h, 24h(PMSG投与時), 72hに解剖し、卵巣ならびにTCDDの毒性標的である肝臓及び胸腺の各重量を測定した。さらに卵巣について、real-time PCRによりCYP1A1, inhibin α , aromataseならびにFSH及びLHの各受容体mRNAsの発現量を計測した。

【結果と考察】

肝臓及び胸腺の重量は、それぞれ24h, 72hから対照群との間に有意差が認められ、また、卵巣には6hをピークとしてCYP1A1 mRNAの増加が認められことから、PCB126はPMSG投与前から卵巣に影響を及ぼしていることが明らかとなった。しかし、その他の遺伝子の発現量や卵巣重量、そして排卵数にはPCB126の影響は認められなかった。母体を介した暴露は、今回の10分の1以下の用量でも幼若期の卵巣に影響を及ぼすことから、暴露時期および暴露期間が卵巣に及ぼす影響の有無に重要であると考えられた。また、この時期の大型の胞状卵胞はPCBの標的ではないことが示唆された。

文 献

Shirota, M., Kitazawa, I., Inoue, K., Doyama, A., Mukai, M., Haishima, A., Yamamoto, K., Katoh, C., Soda, S., Kawabata, A., Akahori, F. and Shirota, K.: Adverse effects of in utero and lactational exposure to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) on the first ovulation in rats. *Organohalogen Compounds*, 49: 356-358, 2000.

要 約

妊娠15日のSD系ラットにコーン油、あるいはPCB126を10, 30または100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で経口投与し、5, 10, 15, 21, 24日齢の雌出生子の卵巣におけるAhR, CYP1A1, inhibin α サブユニットおよび βA , βB サブユニット, aromatase, FSH受容体, LH受容体, c-kit, BMP-15, GDF-9の遺伝子発現量を定量した。残りの一部の動物は、膈開口日まで飼育して、初回排卵数を測定した。その結果、卵巣重量は30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上で、初回排卵数は、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で対照群と比較して、有意な減少が認められた。CYP1A1は、暴露動物において5日齢で既に有意な増加が認められ、その後次第に減少した。inhibin βA , βB サブユニット, aromataseおよびLH受容体の遺伝子発現量は、30または100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 動物で10日齢以降に、またinhibin α の遺伝子は5日齢から、同日齢の対照と比べて有意な低値を示した。一方、GDF-9, BMP-15の各遺伝子は、15日齢以降の100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群で発現量は高値であった。本実験の結果から、PCB126の暴露が幼若期卵巣における卵胞を構成する体細胞に発現する遺伝子の発現量を減少させること、また、発育開始後の卵胞がPCB暴露の標的となっていることが示唆された。また、24日齢のSD系雌ラットにコーン油、または160, 320 $\mu\text{g}/\text{kg}$ のPCB126を経口投与し、投与後24時間にPMSG 5IUを皮下投与して、その約76時間後に排卵を検査した。一部の動物はPCB126投与時(0h), 6h, 24h(PMSG投与時), 72hに解剖した。肝臓及び胸腺の重量は、それぞれ24h, 72hから対照群と比較して有意に減少し、卵巣には6hをピークとしてCYP1A1 mRNAの増加が認められことから、PCB126はPMSG投与前から卵巣に影響を及ぼしていることが明らかとなった。また、卵巣におけるinhibin α , aromataseならびにFSH及びLHの各受容体mRNAsの発現量、卵巣重量、および排卵にはPCB126の影響が認められなかった。以上から、PCB126暴露時期および暴露期間が卵巣に及ぼす影響の有無に重要で、この時期の大型の胞状卵胞はPCBの標

的ではないことが示唆された。

Research Group 1

“The Effects of Exposure to Coplanar PCBs on the Progeny”

Kinji Shirota, Yosuke Sakurada, Keiko Hayasaka, Yutaka Kasai, Masayoshi Sawai (Research Institute of Biosciences)
Masaru Murakami, Humiaki Akahori (School of Veterinary Medicine)
Mariko Shirota (Visiting Researcher)

Abstract: The pregnant female SD rats were single-administered orally corn oil or 10, 30 and 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ B.W. of PCB126 on gestational day 15 (GD 15). Their offspring were sacrificed on the post-natal day (PND) 5, 10, 15, 21 and 24, and the ovaries were collected for quantification of the gene expression of CYP1A1, AhR, inhibins (α , βA and βB), FSH receptor (FSHR), LH receptor (LHR), aromatase, GDF-9, BMP-15, c-kit and kit ligand. The remaining offspring of each dam were sacrificed at the day of virginal opening (VO) and the number of oocytes shed was counted. The gene expression of CYP1A1 in the ovaries of exposed offspring was significantly increased on PND 5 with dose dependent manner and decreased with age. Inhibin α subunit mRNA was decreased from PND 5. The gene expression of βA and βB subunits, aromatase and LHR was also decreased in 30 and 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -dosed groups from PND 10. The levels of mRNA of GDF-9 and BMP-15 in the ovaries of 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -exposed group were higher than those in controls. Ovarian weight of 30 and 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -dosed groups at PND 15 and PND 24 were lower than that of controls. In the 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -dosed group the number of oocytes shed at the first ovulation was lower than that in the control group. These results suggest that the exposure to PCB126 decreases the levels of gene expression in the somatic cells composing ovarian follicles before puberty and the ovarian follicles entering into developing stage might be the target of PCB126 toxicity. Furthermore, female SD rats aged 24 days were single-administered orally corn oil or 160, 320 $\mu\text{g}/\text{kg}$ B.W. of PCB126. The rats were also injected subcutaneously 5IU of PMSG 24 hours after PCB126 administration to induce ovulation. Then, the number of shedding oocytes induced by PMSG was counted 76 hours after PMSG injection. Some rats were sacrificed 0, 24 and 72 hours after PCB126 administration. The weight of liver and thymus were significantly decreased 24 and 72 hours after PCB126 exposure, respectively. The level of CYP1A1 mRNA in the ovaries significantly increased and peaked 6 hours after PCB126 administration. These indicate that PCB126 affected the ovary before PMSG treatment. However, there were no effects of PCB126 exposure on the level of gene expression of inhibin α , aromatase, FSHR and LHR in the ovaries. These results suggest that the timing of PCB126 exposure might be critical for ovarian toxicity and the large follicles in the ovary at this age might not be the targets of PCB126.