

研究サブ・グループ4

トランスジェニックマウスを用いたコプラナー PCBs の毒性評価

猪股智夫（獣医学部）

研究概要

PCB126 子宮内暴露に伴うマウス胎子への催奇形性や、胎子遺伝子突然変異について調べるとともに、PCB126 に子宮内暴露されたマウスの成長過程における反射、運動能力、行動量などを行動学的に観察した。

研究目的

内分泌攪乱物質は、母体を経由し胎子へ移行するため、その影響が危惧されている。本研究は、内分泌攪乱物質の中でも、特に毒性が強く、生体への影響が指摘されている Co-PCBs (PCB126: 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl) について、子宮内暴露後のマウス胎子遺伝子に及ぼす影響や、次世代マウスの発育と行動に及ぼす影響について調べた。

材料と方法

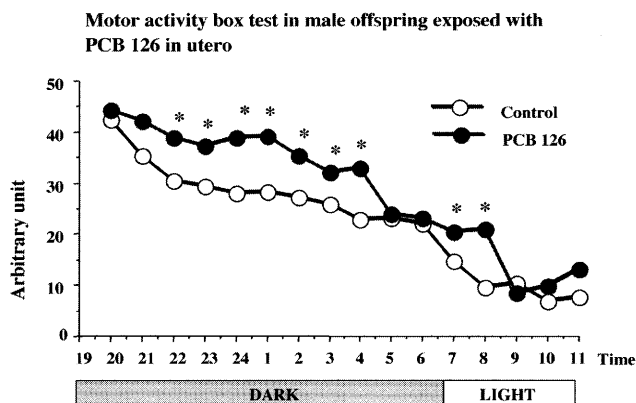
10～12週齢の Muta Mouse (大腸菌 lacZ 遺伝子をトランスジェニックしたマウス) の雌雄を交配させ、陰栓が確認された日を妊娠0日目とし、妊娠10日目の母体に、コーンオイルに溶かした PCB126 を 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を単回経口投与した。また、対照群には、溶媒を投与した。妊娠18日目に一部の母マウスを安楽死させ、帝王切開にて胎子を摘出した。摘出した胎子は、体重を測定し、肛門生殖結節間距離を測定した後、外表奇形の有無を確認した。胎子は低温麻酔により安楽死させ、液体窒素にて凍結保存した。その後、胎子から DNA (ラムダシャトルベクター) を抽出し、その遺伝子突然変異頻度について調べた。

また、10～12週齢の C57BL マウスを用い、交配後、同様に妊娠10日目の母体に、実験群には PCB126 を 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 暴露し、対照群には、溶媒を投与した。その後、自然分娩させ、新生子は母マウスに哺育させた。両群ともに離乳までの時期には正向反射テスト、遊泳テスト、ロープ下りテストを行ない、成長過程における反射や運動能力について観察を行った。雌については離乳後、陰開口日を観察した。その後、両群共にオープンフィールドテストや夜間行動量テストを実施した。オープンフィールドテストや夜間行動量テストについては、雌では性周期が行動に影響する点を考慮し、観察しなかった。

結果

PCB126 の子宮内暴露により、胎子体重の減少、死亡率の増加が認められ、また、口蓋裂の発生が観察された。雄胎子の肛門生殖結節間距離は 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では $1.64 \pm 0.02 \text{ mm}$ であり、対照群の $1.83 \pm 0.05 \text{ mm}$ に比べて有意 ($p < 0.05$) に減少していたが、雌胎子の肛門生殖結節間距離は PCB 投与群と対照群との間に差は認められなかった (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群; $1.25 \pm 0.09 \text{ mm}$, 対照群 $1.17 \pm 0.05 \text{ mm}$)。口蓋裂が観察された胎子から抽出した DNA の遺伝子突然変異頻度は 4.11×10^{-5} であり、口蓋裂が観察されなかった胎子のそれは 3.95×10^{-5} であり、対照群のそれは 2.79×10^{-5} とほぼ同様であった。

一方、自然分娩後の PCB126 (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) に暴露された次世代マウスの陰開口日は 26.6 ± 0.9 日であり、対照群の 28.5 ± 0.7 日に比べて有意 ($p < 0.05$) に促進していた。離乳前の次世代マウスの正向反射テスト、遊泳テスト、ロープ下りテスト、オープンフィールドテストについては、対照群のそれと同様であり、PCB126 の影響は観察されなかった。しかし、性成熟に達した雄マウスでは、夜間行動量テストが対照群のそれに比べて有意に増加していた (下図)。



考 察

本研究において、PCB126の子宮内暴露は、胎子に対して催奇形性を示したが、胎子遺伝子に対しては影響しないものと推察された。また、雄胎子については肛門生殖結節間距離が短縮し、雄胎子の雌性化が示唆された。生後の発育に関しては、PCB126暴露により膣開口が早期に観察され、雌では性成熟の促進が認められた。一方、反射や運動能力にはPCB126の子宮内暴露による影響は認められなかったが、夜間における行動量の増加が観察され、PCB126は、次世代マウスの自発行動量に強い影響を及ぼすことが判明した。以上の結果から、PCB126は母体を通じ、世代を越え、生殖系や一部の行動に影響を及ぼすものと考えられた。

文 献

- Sekiguchi, M., Ninomiya, H., Inomata, T. (2002) 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) on genomic DNA of mouse fetuses. *Exp. Anim.* 51: 280
- Sekiguchi, M., Ninomiya, H., Kashiwazaki, N., Sino, M., Inomata, T. (2003) Effects of 3,3',4,4',5 pentachlorobipheyl (PCB126) on mice. *Exp. Anim.* 52: 261

要 約

内分泌攪乱物質は、母体を経由し胎子へ移行することがあり、その影響が危惧されている。本研究は、多数存在する内分泌攪乱物質の中でも、生体への影響が指摘されているCo-PCBs (PCB126: 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl) について、子宮内暴露に伴うマウス胎子遺伝子に及ぼす影響や、次世代マウスの発育と行動に及ぼす影響について調べた。10～12週齢のMutaMouse (大腸菌lacZ遺伝子をトランスジェニックしたマウス)の雌雄を交配させ、膣栓が確認された日を妊娠0日目とし、妊娠10日目の母体に、コーンオイルに溶かしたPCB126を500 µg/kg単回経口投与した。また、対照群には、溶媒を投与した。妊娠18日目に一部の母マウスを安楽死させ、帝王切開にて胎子を摘出した。摘出した胎子は、体重を測定し、肛門生殖結節間距離を測定した後、外表奇形の有無を確認した。胎子は低温麻酔により安楽死させ、液体窒素にて凍結保存した。その後、胎子からDNAを抽出し、その遺伝子突然変異頻度について調べた。また、10～12週齢のC57BLマウスを用い、交配後、同様に妊娠10日目の母体に、実験群にはPCB126を500 µg/kg暴露し、対照群には、溶媒を投与した。その後、自然分娩させ、新生子は母マウスに哺育させた。次世代マウスは、膣開口日を観察するとともに、正向反射テスト、遊泳テスト、ステップスルー型受動的回避テスト、オープンフィールドテストや夜間行動量テストなど、成長過程における行動学的観察を行った。雌については、性周期がその行動に影響するため観察しなかった。PCB126の子宮内暴露により、胎子の死亡率は増加し、口蓋裂の発生が観察された。また、雄胎子の肛門生殖結節間距離は、対照群のそれに比べて有意に減少していたが、雌胎子の肛門生殖結節間距離は両群の間に差は認められなかった。口蓋裂が観察された胎子から抽出したDNAの遺伝子突然変異頻度

は、対照群のそれとほぼ同様であった。一方、自然分娩後のPCB126に暴露された次世代マウスの膣開口は、対照群に比べて促進していた。離乳前の次世代マウスの正向反射テスト、遊泳テスト、ステップスルー型受動的回避テスト、オープンフィールドテストについては、対照群のそれと同様であり、PCB126の影響は観察されなかった。しかし、性成熟に達した雄マウスでは、夜間行動量テストが対照群のそれに比べて有意に増加していた。本研究において、PCB126の子宮内暴露は、胎子に対して催奇形性を示したが、胎子遺伝子に対しては影響しないものと推察された。また、雄胎子については肛門生殖結節間距離が短縮し、雄胎子の雌性化が示唆された。生後の発育に関しては、雌では、膣開口が早期に観察され、性成熟の促進が認められた。一方、反射や運動能力にはPCB126の子宮内暴露による影響は認められなかったが、夜間における行動量の増加が観察され、PCB126は、次世代マウスの自発行動量に強い影響が現れることが判明した。以上の結果から、PCB126は母体を通じ、世代を越え、生殖系や一部の行動に影響を及ぼすものと考えられた。

Research Group 4

“Evaluation of the Toxicity of Coplanar PCBs Using Transgenic Mice”

Tomo-o Inomata (School of Veterinary Medicine)

Abstract: PCBs are persistent environmental agents that show endocrinological and immunological impairments and tumorigenic and teratogenic effects. In this study we used the transgenic mouse model (Muta Mouse), carrying bacterial lacZ genes, to assess the effects of PCB126 on the prenatal and postnatal offspring. Mothers on the 10th day of pregnancy were given a single injection of PCB126 (500 micrograms/kg) orally. Mothers on the 18th day of pregnancy were sacrificed by decapitation to obtain their fetuses. The fetuses were subjected to observe their external malformations and gene mutations. The other mothers delivered and their offspring were subjected to observe the period of vaginal opening and to measure their motor activity. Fetuses of experimental group showed low incidental rates of the external malformation, cleft palate (5%). DNA (LacZ gene) extracted from these fetuses especially in malformed fetuses showed low incidents of LacZ mutation, 4.11×10^{-5} which was mostly the same as controls, 2.79×10^{-5} . The periods of vaginal opening in the pups of experimental group were little earlier than that observed in the controls. The amounts of motor activity in the pups of experimental group were higher than that observed in the controls. The results indicate that PCB126 induced the malformation and gene mutations in the offspring but its incidental rates were low levels, and that PCB126 induced to accelerate the sexual maturation of the female pups and to increase the amount s of the motor activity.