

## 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・乳汁暴露が雌出生児の春機発動を遅延させ初回排卵数を減少させること、卵巢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。平成15年度の研究で、幼若期のラット卵巢において発育開始後の卵胞が暴露の影響を受ける事が示唆されたため、本年度は卵胞発育阻害がどのような機序で引き起こされているのかを明らかにする目的で、卵巢におけるステロイドホルモン産生に着目し、卵胞発育、ステロイド産生関連遺伝子そして血中ホルモン濃度に対するPCB126暴露の影響を評価した。

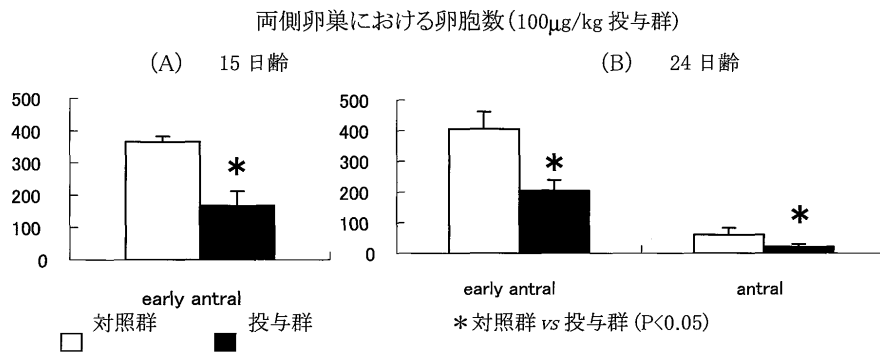
### 方法

妊娠15日目のSD系雌ラットに、30及び100 µg/kgのPCB126を、また対照動物にはコーン油を単回経口投与し、得られた出生仔を10～24日齢で屠殺して卵巢及び血液を採取した。卵巢はホルマリン固定後、卵巢全体を6 µmの連続パラフィン切片として全て観察し、退行像が認められない卵胞腔を持つ小型胞状卵胞（early antral）と単一の卵胞腔を持つ大型胞状卵胞（antral）を数えた。別の卵巢からはtotal RNAを抽出しreal-time PCR法によりステロイド産生に関連する種々の遺伝子の発現量を測定した。また、15～24日齢のラットの血中inhibin, estradiol-17β (E<sub>2</sub>)及びFSHの濃度をラジオイムノアッセイ法で測定した。測定は東京農工大学家畜生理学教室の渡辺元助教授の協力を得て行った。統計解析はANOVA検定を行い、有意性の認められたものに関してはさらにDunnetの多重比較検定を行った。有意水準は5%以下と定めた。

### 結果と考察

卵胞数の検索は、対照群と100 µg/kg投与群を対象とし、15日齢ではearly antral, 24日齢ではearly antral及びantralを数えたが、100 µg/kg投与群の動物では15日齢のearly antralが既に有意に少なく（図-A）、24日齢ではearly antral及びantralともに減少していた（図-B）。血中のホルモンについては15日齢におけるinhibin, E<sub>2</sub>の値が投与群で有意に低く、FSHは高かった。21, 24日齢においてもinhibin濃度は低かった。卵巢におけるP450sccと3β-HSDの遺伝子発現量は、10日齢から100 µg/kg投与群で低く、血中ホルモンが低値を示した15日齢では3β-HSDと17β-HSDの遺伝子発現量が対照動物に比べ有意に少なかった。また21, 24日齢ではP450scc, 3β-HSD, P450c17, StAR, の遺伝子発現量が有意に少なかった。

今回の結果から、PCB126の経胎盤・経乳汁暴露が、次世代幼若ラット卵巢において卵胞発育を阻害して健



常な卵胞の数を減少させ、ステロイド合成関連遺伝子の発現量を変化させること、また、血中ホルモン濃度にも影響を及ぼし生殖内分泌機能を攪乱することが示された。血中の *inhibin*,  $E_2$  濃度の低下は、卵巢におけるステロイド合成関連遺伝子の発現量の低下と卵胞数の減少が反映されているものと考えられた。これらのホルモンは発育卵胞から産生され、視床下部-下垂体系に対しネガティブフィードバック作用を持つが、暴露動物の血中 FSH は高く、フィードバック作用は機能していることが示唆された。ステロイド合成に関わる種々の遺伝子の発現減少は、それらを発現する細胞を多く含む発育卵胞数の減少が一因であると考えられるが、個々の合成細胞において遺伝子発現の抑制が起こっているのかどうかについては、PCB126 の標的細胞・遺伝子の探索という観点からも、今後、検討する必要がある。また、10日齢といった早い時期から発現量が減少した遺伝子もあり、卵胞発育の初期からその発育に寄与する卵巢由来ステロイドホルモンの合成が PCB126 の暴露によって抑制され、卵胞の発育に何らかの影響を及ぼす可能性も考えられた。

## 要約

PCB126 暴露による次世代ラットの卵胞発育阻害の機序を明らかにするため、妊娠 15 日目の SD 系雌ラットに 30 及び 100  $\mu$ g/kg の PCB126 またはコーン油を単回経口投与し、10 ~ 24 日齢の出生仔の卵巢における卵胞発育、ステロイド産生関連遺伝子の発現そして血中ホルモン濃度を対照群の動物のそれらと統計学的に比較した。100  $\mu$ g/kg 投与群の卵巢では 15 日齢で小型胞状卵胞、24 日齢では小型胞状卵胞及び大型胞状卵胞ともに少なかった。投与群における血中のホルモンは 15 日齢において *inhibin*, *estradiol-17 $\beta$*  の値が低く、FSH 値は高かった。21, 24 日齢においても *inhibin* 濃度は低かった。100  $\mu$ g/kg 投与群では、卵巢における P450 $_{scc}$  と 3 $\beta$ -HSD の遺伝子発現量が 10 日齢から低置を示し、15 日齢では 3 $\beta$ -HSD と 17 $\beta$ -HSD 遺伝子、21, 24 日齢では P450 $_{scc}$ , 3 $\beta$ -HSD, P450 $_{c17}$ , StAR, の遺伝子発現量が少なかった。以上より、PCB126 の経胎盤・経乳汁暴露が、次世代幼若ラット卵巢において卵胞発育を阻害して健全な卵胞の数を減少させ、ステロイド合成関連遺伝子の発現量を変化させること、また、血中ホルモン濃度にも影響を及ぼし生殖内分泌機能を攪乱することが示された。

## Research Group 1

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

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

**Abstract:** To clarify the mechanisms of growth disturbance of the ovarian follicles in PCB126-exposed female progeny, the pregnant female SD rats were given single oral administration of corn oil or 30 and 100  $\mu$ g/kg of PCB126 on gestational day 15. The offspring were sacrificed on the post-natal day (PND) 5-24, and their ovaries were collected for quantification of the gene expression and for counting ovarian follicles. In the ovaries of 100  $\mu$ g/kg-exposed rats, the number of early antral

follicles was smaller than that of controls on PND 15. Both early antral and antral follicles were less numerous than those in control rats on PND 24. The levels of mRNA of P450<sub>scc</sub> and 3 $\beta$ -HSD in the ovaries of 100  $\mu$ g/kg-exposed rats had been lower than those in control animals from PND 10. These exposed rats showed lower level of mRNA of 3 $\beta$ -HSD and 17 $\beta$ -HSD on PND 15, and also lower gene expression of P450<sub>scc</sub>, 3 $\beta$ -HSD, P450<sub>c17</sub> and StAR on PNDs 21 and 24 as compared to control rat ovaries. The values of serum concentration of inhibin and estradiol-17 $\beta$  were lower and that of FSH was higher in exposed rats as compared to those in control rats on PND 15. The value of serum Inhibin was still low in the exposed rats on PNDs 21 and 24. These data suggest that *in utero* and lactational exposure to PCB126 disturbs growth of ovarian follicles resulting in decrease of the number of healthy follicles, and modify expression of steroid-relating genes in the ovary of the progeny. In addition, PCB126 affects serum concentration of some hormones and might disrupt reproductive endocrine mechanisms.