

研究サブ・グループ5 ダイオキシン類の発がん性への影響

和久井 信 (獣医学部)

目 的

ヒトは多種多様な化学物質を作り出しその恩恵に預かってきたが、これら多くの化学物質が環境中に放出されることから、今日、深刻な環境汚染問題が引き起こされている。環境中に認められる化学物質の中には、生体内の内因性ホルモンの合成や作用を模倣したり、また拮抗的に作用する物が有り、現在これらは内分泌攪乱物質 Endocrine Disrupting Chemicals (EDC) と総称されている。EDCの中でもポリ塩化ジベンゾパラジオキシン (PCDD)、ポリ塩化ジベンゾフラン (PCDF) さらに、Coplanar-polychlorinated biphenyls (Co-PCB) などのダイオキシン類による環境汚染が近年、特に問題視されている。ダイオキシン類の内、Co-PCBは煙突の煤煙や固定廃棄物・土壌中に高濃度に分布し、他のダイオキシン類と比べて生体濃縮・蓄積性も高く、ヒト・野生生物の脂肪組織に高濃度に蓄積される。日本人が呼吸や食事等を通じて摂取しているダイオキシン類量は平均毎日約2.3 pg/kgと報告されている。そして現在、ダイオキシン類の1日耐容摂取量 Tolerable Daily Intake (TDI) は、日本では4 pg/kg/dayと定められている。これに対し、母乳中のダイオキシン類量は、50-100 pg/kg/dayとTDI値をはるかに超過していることから、母乳から乳児へのダイオキシン類の移行はその後の小児期あるいは成人に達した時点での生体に、様々な障害を及ぼす危険性があることが危惧されている。Co-PCBは、生体内で水酸化などの代謝を受けにくい化学物質である。さらに、多くのEDCがエストロゲン受容体 (ER) と高い親和性を示すのに対し、Co-PCBはERとの結合性を示さず、ダイオキシン受容体とも言われている AhR との結合を介して、エストロゲン作用に関与する遺伝子群の発現を阻害することで、抗エストロゲン様作用を示す。エストロゲン様作用を有するように合成された化学物質では、その用量・使用時期が乳腺等の発癌のリスクを上昇させることが報告されているが、抗エストロゲン様作用を示す化学物質の、胎生期暴露と発癌のリスクに関する研究は殆ど行われていない。

我々は過去、Co-PCBの内での最大のTEF値を示すPCB126を対象として、PCB胎生期暴露の7,12-dimethylbenz [a] anthracene (DMBA) 誘発乳腺発がんへの影響について、特にPCB暴露量と発がん率・がんの進展度について検討した。その検討から、我々は過去、PCB126胎生期暴露の7,12-dimethylbenz [a] anthracene (DMBA) 誘発乳腺発がんへの影響について検討し、比較的低用量の胎生期PCB126暴露は、生後のDMBA誘発ラット乳腺発がんを亢進させるのに対して、高用量の胎生期PCB126暴露は、生後のDMBA誘発ラット乳腺発がんを低下させる現象を示すことを明らかにした。すなわち、ダイオキシン類低用量暴露が生体へ影響を及ぼすことを示唆した。しかし、この現象のメカニズムには不明な点が多くより詳細な検討が必要とされた。我々は上記の影響には、PCB126の直接的な抗腫瘍発育進展活性以外の他の機序が関与していることを考えた。

そして、まず胎生期PCB126暴露PCB126の乳腺発がんの母地であるラット乳腺の発達へ影響について検討を行った。検討には妊娠雌SDラットに対し妊娠13-19日まで、0 g, 25 pg, 2.5 ng, 250 ng, 7.5 µg PCB126/kgのPCB126を連日経口投与した。その後、通常DMBA投与する生後50日齢でのラット乳腺の発達を形態学的に検討した。結果として、250 ng投与群では他の群と比較して有意なTerminal End Buds (TEB) の増数、さらにAlveolar Buds and Lobules (ABL) の減数が認められた。これに対し、7.5 µg投与群では他の群と比較して有意なTEB,ABLの減数が認められた。乳腺組織ではTEBが最もDMBAへの感受性が高いとされているのに対し、ABLはDMBAへの感受性が低いことが知られている。このことから、比較的用量胎生期PCB126投与群で特にTEBの増数が認められたことが、同群でのDMBA誘発乳腺発がんの亢進と関係する一要因であることを明らかにした。

さらに、胎生期暴露されたPCB126の生体内残量が投与量で有意な差が認められたことから、DMBA投与時、生後50日齢のラットの生体内環境を明らかにする必要性が明らかとなった。そこで、我々は、乳腺発がん亢進のメカニズムを解明する為の一助として、乳腺発がんのイニシエーター段階に重要とされているDMBA代謝に関与するCYP1A1 CYP1B1 mRNAの肝臓での発現が、PCB126胎生期暴露量といかなる関係を示すかについてComparative RT-PCR解析を行い、比較的低用量PCB126胎生期暴露群のラットでは、DMBA投与後の肝臓におけるCYP1B1発現亢進することをmRNAレベルで明らかにした。しかし、CYPの発現は転写レベル(mRNA)とタンパク発現との間に正の相関関係を示さないことも多いため本年度は、CYP1A1 CYP1B1 AhRタンパクの肝臓における発現をWestern Blot解析を行い、Real time RT-PCR解析と比較検討した。さらに、免疫組織化学的にも検討を行った。

方 法

Co-PCBは、PCB126 (3, 3', 4, 4', 5, 5'-P5CB) (Accu Standard社)を、50匹の母親SD (slc) ラット妊娠期間の、13日目から19日目まで、7.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ (PCB7.5 μ 投与群 10匹)、250 $\text{ng}/\text{kg}/\text{day}$ (PCB250 ng 投与群 10匹)、2.5 $\text{ng}/\text{kg}/\text{day}$ (PCB2.5 ng 投与群 10匹)、25 $\text{pg}/\text{kg}/\text{day}$ (PCB25 pg 投与群 10匹)、さらに対照群として10匹にcorn oil同用量を、連日経口投与した。出産後、雌雄5匹にリッター調整を行い、生後21日に離乳を行った。発がん実験には産出された250匹の雌ラットを用いた。ラットの飼育状況は、室温を $23 \pm 2^\circ\text{C}$ に保ち、人工照明は午前7時より、午後7時までの12時間とし、固形飼料(CE-7日本クレア社)と、水道水を自由摂取させた。本実験に用いたすべてのラットは週に1度の体重測定を行った。本論文では、4種のPCB用量を設定した。最低用量としては、TDI用量として25 $\text{pg}/\text{kg}/\text{day}$ 、比較的低用量としては、TDI用量の 10^2 倍用量・TDI用量の 10^4 倍用量、高用量としては、TDI用量の 3×10^5 倍用量とした。高用量として設定したTDI用量の 3×10^5 倍用量は、生後50日齢の時点で成長抑制の認められない最小容量であることを予備実験で確認して設定した。7,12-dimethylbenz [a] anthracene (DMBA) (関東化学株式会社)を、corn oil (ACROS/関東化学株式会社)に溶解させ、生後50日目に単回経口投与を行った。DMBA投与後、6時間、12時間、1日、2日、5日、10日、20日、30日に肝臓を剖出した。その後、各検体について、CYP1A1 CYP1B1 AhRタンパクの肝臓における発現をWestern Blot解析を行い、Real time RT-PCR解析と比較検討した。さらに、免疫組織化学的検討を行った。

結果と考察

7.5 ug/kg 群の肝臓ではCYP1A1 mRNA & ProteinとAhR mRNA & Proteinの発現延長が認められた。これに対し、250 ng 群の肝臓ではCYP1B1 mRNA & ProteinとAhR mRNA & Proteinの発現延長が認められた。近年になってProcarcinogenに分類されるDMBAの代謝機構が解明された。DMBAは2段階の代謝を受ける第一段階の代謝はCYP1A1酵素あるいはCYP1B1酵素が進行させる。これに対し第二段階の代謝はCYP1B1酵素のみが進行させることが明らかとなり、発がん性の獲得にCYP1B1酵素が重要であることが提唱されている。本検討でも、発がん性の亢進を示した250 ng 群でCYP1B1 mRNA & Proteinの高い発現が示唆された。これに対し、発がん性の抑制された7.5 ug 群ではCYP1B1 mRNA & Proteinの発現は抑制される傾向を示した。

要 約

比較的低用量PCB126胎生期暴露群のラットでは、DMBA投与後の肝臓におけるCYP1B1 mRNA & ProteinとAhR mRNA & Protein発現亢進することが明らかとなった。この結果は、比較的低用量PCB126胎生期暴露群のラットでは、生後50日齢において有意に発がん性の高い体内環境になっていることがmRNA & Proteinレベルでも示唆された。この結果は我々の昨年度の研究成果を支持するものであった。

*Research Group 5**“Effect of Exposure to Dioxins, as Endocrine Disruptors, on Carcinogenesis”*

Shin Wakui (Graduate School of Veterinary Science, Azabu University)

Abstract: Previously we reported the finding that prenatal exposure to a relatively low dose of PCB126 increases the rate of DMBA-induced rat mammary carcinoma, while a high dose decreased it. One of the most important factors determining the sensitivity to mammary carcinogenesis is the metabolic stage at administration of the carcinogenic agent. DMBA is a procarcinogen that recruits the host metabolism to yield its ultimate carcinogenic form, and CYP1A1 and CYP1B1 (CYP1) conduct this metabolism. We investigated the hepatic expression of CYP1 and AhR following oral administration of DMBA (100 mg/kg b.w.) (i.g.) to 50-day-old female Sprague-Dawley rats whose dams had been treated (i.g.) with 2.5 ng, 250 ng, 7.5 μ g of PCB126/kg or the vehicle on days 13 to 19 post-conception. Real-time quantitative RT-PCR analysis revealed that the prenatal exposure to a relatively low dose of PCB126 (the 250 ng group) prolonged the higher expression of CYP1A1, CYP1B1 and AhR mRNA, while prenatal exposure to a high dose of PCB126 (the 7.5 μ g group) prolonged the higher expression of CYP1A1 and AhR mRNA. Western blotting and immunohistochemical analyses were consistent with mRNAs changes. Because DMBA oxidation produces a highly mutagenic metabolite and is finally catalyzed by CYP1B1, a relatively low PCB126 dose might produce the biological character to potentially increase the risk of DMBA-induced mammary carcinoma.