

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、胎生期曝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胎生期曝露の7,12-dimethylbenz [a] anthracene (DMBA) 誘発乳腺発癌への影響について、特にPCB曝露量と発癌率・癌の進展度について検討した。その検討から、我々は過去、PCB126胎生期曝露の7,12-dimethylbenz [a] anthracene (DMBA) 誘発乳腺発癌への影響について検討し、比較的低用量の胎生期PCB126曝露は、生後のDMBA誘発ラット乳腺発癌を亢進させるのに対して、高用量の胎生期PCB126曝露は、生後のDMBA誘発ラット乳腺発癌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曝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曝露PCB126の乳腺発癌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誘発乳腺発癌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、乳腺発癌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胎生期曝露群のラットでは、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 Blots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ことから。比較的低用量PCB126胎生期曝露群のラットでは、DMBA投与後の肝臓におけるCYP1B1mRNA & 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胎生期曝露群のラットでは、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。

このように、ダイオキシン類による汚染は地球規模で広がっている。ダイオキシン類は水・堆積物・魚・野生動物、およびヒトの脂肪組織・ミルクならびに血清を含む地球の生態系のほとんどすべての構成要素に汚染物質として検出されている。また他のダイオキシン類に比べその生物濃縮性が高いことが知られている、さらに、胎盤・授乳を介して次世代に移行するため、次世代への影響が示唆されている。さらに近年PCBs曝露が精巣腫瘍の発生と関係するとの報告が散見される。しかし、PCB126胎生期曝露が次世代の精子形成へ可逆的・非可逆的影響を与えるかについては検討させていない。我々はPCB126胎生期曝露が思春期から成獣期のラット精子形成サイクルにどのような影響をおよぼすかについて検討することを目的とし、環境汚染化学物質であるPCB126の生体への可逆・非可逆的影響を検討した。

方 法

SD (slc) ラット妊娠13～19日目までPCB126を7.5 ug/kg/day (7.5 ug群), 250 ng/kg/day (250 ng群), 25 ng/kg/day (25 ng群), 25 pg/kg/day (25 pg群), 0 g/kg/day (対照群) 連日経口投与を行う。出生後、7週齢、17週齢に安楽死後に剖検し精巣を剖出する。各精巣はH&E, PAS染色を施し、精細管における精子形成サイクルにおけるステージ分類を観察し各対照群と比較検討をおこなった。

結果と考察

生後7週齢・17週齢において、PCB126投与群、対照群間で動物の体重また精巣重量に有意差は認められなかった。肝臓内PCB126含有量は7週齢では、対照群と比較して7.5 ug群、250 ng群で有意に高い値を示し、17週齢では7.5 ug群で有意に高い値を示した。7週齢・17週齢において、PCB126投与群、対照群間で曲精細管内のセルトリ細胞数に有意差は認められなかった。7週齢・17週齢の7.5 ug群、7週齢の250 ng群ではVII-VIIIステージの曲精細管数は対照群と比較して有意に増加を示し、さらに、I-XIVステージのpreleptotene spermatocyte, spermatids数が有意に減少した。対照群と比較して7週齢・17週齢の250 ng群では、VI-VIIステージのround spermatidsが有意に増加し、VIIIステージのelongating spermatidsの有意な減少が認められた。生後7週齢・17週齢において、PCB126投与群、対照群間でtestosterone値に有意差は認められなかった。

PCB126胎生期曝露は用量相関的に次世代の精子形成能に影響を与えることが明らかとなった。高用量曝露群では、思春期から成獣期においてspermatogonia, spermatidsに障害が認められた。これに対し、低用量群では思春期ではspermatidsに障害が認められたが、成獣期では回復を示した。生後7週齢・17週齢において、PCB126投与群、対照群間でtestosterone値に有意差は認められなかったことから、これらの異常の原因には性ホルモンによる直接的变化以外の因子が関与することが考えられた。

要 約

内分泌かく乱化学物質である3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl 胎生期曝露後のラット精巣では精巣腫瘍は認められなかった。しかし、精子形成過程に有意な変化が認められたので、これらの変化に関して生後7週齢・17週齢に形態学的に検討した。高用量曝露群では思春期から成獣期において spermatogonia, spermatids に障害が認められた。また、低用量群では思春期では spermatids に障害が認められたが、成獣期では回復する可逆的障害であることが示唆された。

Research Group5

“Effect of Exposure to Dioxins, as Endocrine Disruptors, on Carcinogenesis”

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

Abstract: The present study investigated the dose-response relationship in testicular toxicology of 7 (pubescent)- and 17 (adult)-week-old Sprague-Dawley rats whose dams had been injected (i.g.) with 25 pg, 2.5 ng, 250 ng, or 7.5 μ g of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126)/kg or the vehicle on days 13 to 19 post-conception. At 7 and 17 weeks old of the 7.5 μ g group and at 7 weeks old of the 250 ng group showed an increase in the percentage of seminiferous tubules at Stages VII-VIII. At 7 and 17 weeks old, the 7.5 μ g group showed a decrease in preleptotene spermatocytes with spermatids at all Stages; while the 250 ng group also showed a decrease in preleptotene spermatocytes, but round spermatids increased at Stages VI-VII and elongated spermatids decreased at Stage VIII. At 7 weeks old, the 2.5 ng group showed an increase in round spermatids at Stages VI-VII. The formation of spermatogenic cells in the 25 pg group was similar to that of the vehicle group. The number of Sertoli cells and cauda epididymal sperms in the PCB126 groups were similar to those of the vehicle group. Prenatal PCB126 exposure induced dose-related defective spermatogenesis. A high dose PCB126 group affected the development of spermatogonia and spermatids in puberty and adulthood, while a low dose group affected the conversion of spermatids at puberty, although this was recovered in adulthood. Because the serum testosterone levels were similar in the PCB126 and vehicle groups in puberty and adulthood, a direct endocrine cause for the observed effects was unlikely.