

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)

目 的

これまでの実験から、PCB126の経胎盤・経乳汁曝露が、次世代の卵巣に影響を及ぼす事が示されたが、その影響は胎生期曝露と出生後の経乳汁曝露のどちらがより大きいのかは明らかではない。そこで、平成17年度は妊娠15日目のラットにPCB126を曝露し、出産後に出生子を交換する養母交換実験を行い、曝露経路の違いによる次世代の卵巣への影響を比較した。

材料と方法

・動物と処置

PCB126を投与動物のkg体重あたりの液量が2mlになるようにコーン油に溶解し、妊娠15日目のSprague-Dawley系雌ラット(Crj:CD(SD)IGS)に経口投与した。曝露群の動物には30 μ g/kgを投与し、対照群にはコーン油のみを投与した。娩出を認めた日を分娩後0日(生後0日)とし、同時に産児数を数えた。分娩後1日において、リッター数を各腹8として、同投与群あるいは異なる投与群の母動物に出生後21日の離乳まで哺育させた。この処置により、実験期間を通して曝露を受けないCC群、胎生期は曝露を受けず、出生後に乳汁を介して曝露を受けるCP群、胎生期に胎盤を介して曝露を受け、出生後は曝露を受けないPC群、胎生期から出生後も継続的に曝露を受けるPP群の計4群を設定した。生後5, 15, 24日の各日齢において出生仔を剖検し、残りの動物(各群n \geq 8)は24日齢でPMSGを5IU皮下投与して排卵を誘起し、76時間後に解剖、排卵の有無を確認して新生黄体数を数えた。

・剖検

生後5, 15及び24日に全採血し血清を分離した。両側卵巣を全採血後直ちに摘出して、組織学的検索に用いるものについてはパラフォルムアルデヒドとホルマリンの各固定液で固定し、パラフィン切片を作成した。遺伝子発現量測定に用いる組織は直ちに液体窒素で凍結し、-80 $^{\circ}$ Cで保存した。臍開口日の出生仔は、採血後に剖検し、実体顕微鏡下で卵管膨大部と卵巣を観察し、卵細胞数及び黄体数を数えた。

・Real-time PCR

各群の出生仔から得られた卵巣組織からtotal RNAを抽出し、逆転写反応によりcDNAを合成し、これを鋳型としてreal-time PCRを行った。Real-time PCRには、PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用い、CYP1A1, inhibin- α , - β A, - β B, FSH-receptor, LH-receptor, PRLRS, PRLRL, P450aromatase, StAR, P450scc, 17 β HSD, P450c17, 3 β HSD, BMP-15の各遺伝子の発現量を測定した。

・ラジオイムノアッセイ (RIA)

血清中のFSHとE₂濃度は、National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK, Baltimore, MD)を用いたRIA法により測定した。本実験における測定間変動は11%以下であった。

・統計解析

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Dunnettの多重比較検定を行った。

本検定においては、有意水準は5%以下と定めた。

結 果

・遺伝子発現量

15日齢においては卵巣重量に影響は認められなかったが、24日齢になるとCP群の値が有意に低値を示した。卵巣内のinhibin- α mRNA発現量は、24日齢のCP, PC, PP群で有意に低かった。CP, PP群の肝臓におけるCYP1A1 mRNA発現量と肝臓重量相対値は有意に高く、卵巣におけるCYP1A1 mRNA発現量も、肝臓のそれと同様にCP, PP群でCC群に比べ有意に高かったが、PC群はCC群と殆ど変わらなかった。

・血中ホルモン濃度

血清中のFSH濃度は15日齢のPP, CP群で有意に高く、E2濃度はPP群で有意に低かった。

・初回排卵数

誘起排卵後の卵巣の新生黄体数は、PC, CP, PP群で有意に少なかった。

考 察

肝臓・体重比や卵巣におけるCYP1A1遺伝子が示すように、母動物に投与されたPCB126は胎盤を介した曝露に比べ、乳汁を介した曝露によってより多く移行していることが予想された。PCB126の毒性標的臓器である肝臓、そして標的遺伝子であるCYP1A1の変化は曝露量を反映することが知られている。今回これらが、出生後15日においてPC群では対照群動物と有意差は認められず、CP群もしくはPPでは、有意に肝臓体重比が増加し、遺伝子発現量も亢進していたことから、暴露経路によってPCB126の移行量が大きく異なること、そして乳汁による移行量の多さが示唆された。一方、初回排卵数への影響は、移行量の違いが予想されるにも拘わらず、胎盤もしくは乳汁のいずれかの曝露を受ければ、初回排卵数に影響が及ぶことが明らかにされた。このことは、胎齢期と授乳期のいずれの時期にもPCB126による卵巣機能障害の臨界期が存在することを示唆しているものであろう。しかし、今回の養母交換は出生後1日で行ったため、PC群も初乳を介したPCB126の暴露を受けている可能性も否定できない。実際、経胎・盤経乳汁曝露を受けた出生児では、卵巣におけるCYP1A1遺伝子発現量は、生後5日をピークとして日齢を増すごとに減少していたことから、この時期が最も強く曝露されていることが示唆されており、卵巣機能にも影響が認められている。今回検索した卵巣の遺伝子の中では、PCB126の標的遺伝子であるCYP1A1以外はinhibin- α のみに曝露による影響が認められたが、この遺伝子はこれまでの実験でも卵胞発育の阻害と共に減少することが明らかになっているので、本実験においても、いずれの経路による曝露を受けても卵胞の発育が阻害されていることが示唆された。また、卵巣重量や血中ホルモン濃度に影響が認められることも、これまでの実験と同様に、初回排卵数の減少が卵胞発育の阻害によることを示唆するものと考えられた。

要 約

PCB126の曝露が次世代ラットの卵巣に及ぼす影響について、胎生期と授乳期の何れの時期の曝露が卵巣の発育や排卵により強い影響を及ぼしているかを明らかにする為に、妊娠15日目のラットにPCB126を30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 曝露して、分娩後に出生子を交換し、21日齢まで哺育させる養母交換実験を行った。出生子は曝露を受けないCC群、乳汁曝露のみのCP群、胎盤曝露のみのPC群、経胎盤、経乳汁曝露を受けたPP群とした。その結果、卵巣重量は24日齢のCP群の動物で有意に低値を示した。卵巣内のinhibin- α mRNA発現量はCP, PC, PP群で有意に低かった。肝臓におけるCYP1A1 mRNA発現量と肝臓重量相対値はCP, PP群で有意に高く、卵巣におけるCYP1A1 mRNA発現量はCP, PP群でCC群に比べ有意に高かったが、PC群はCC群と差が無かった。PMSG投与による誘起排卵後の卵巣の新生黄体数はPC, CP, PP群で有意に少なかった。

*Research Group 1**“The Effects of Exposure to Coplanar PCBs on the Progeny”*

Kinji Shirota, Yosuke Sakurada (Research Institute of Biosciences)
Masaru Murakami, Humiaki Akahori (School of Veterinary Medicine)
Mariko Shirota (Visiting Researcher)

Abstract: To compare the effects of PCB126 on the ovary between transplacentally-exposed and lactationally-exposed rat progeny, 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of PCB-126 or corn oil were orally administered to pregnant SD rats on gestational day 15. On post natal day 1 (PND 1), we performed cross-fostering experiment, which resulted in 4 groups of female offspring as follows: CC (not exposed, control); CP (lactationally-exposed); PC (transplacentally-exposed); PP (transplacentally and lactationally-exposed). The offspring was weaned on PND 21. The ovarian weight of the rats in CP-group on PND 24 was significantly lower than that in other groups. The amount of gene expression of inhibin- α in the ovary was significantly lower in CP-, PC-, PP- groups as compared to that in CC- group. The amount of gene expression of CYP1A1 in the liver and the ratio of liver/body weight were higher in CP- and PP- groups, and the amount of CYP1A1 gene expression in the ovary was significantly higher in CP- and PP- groups as compared to that in CC- and PC- groups. The number of corpora lutea in the ovary at the PMSG-induced first ovulation was significantly lower in PC-, CP- and PP- groups than that in CC- group.