

## 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 2.3pg/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 4pg/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、PCB126 胎生期曝露の 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  $\mu$ g/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  $\mu$ g 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、比較的低用量胎生期 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、胎生期曝露したPCB126の生体内残量が群間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胎生期曝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、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癌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。

次に、雄への影響についてPCB126を対象として、PCB胎生期曝露の*N*-methyl-*N*-nitrosourea誘発前立腺発癌への影響について検討した。

## 方 法

Co-PCBは、PCB126 (3,3',4,4',5,-P5CB) (Accu Standard社)を、30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 µg/kg/day (PCB7.5 µg投与群10匹)、250 ng/kg/day (PCB250 ng投与群10匹)、2.5 ng/kg/day (PCB2.5 ng投与群10匹)、25 pg/kg/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。発癌実験には産出された200匹の雌ラットを用いた。ラットの飼育状況は、室温を23±2℃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、3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 pg/kg/day、比較的低用量としては、TDI用量の10<sup>2</sup>倍用量・TDI用量の10<sup>4</sup>倍用量、高用量としては、TDI用量の3x10<sup>5</sup>倍用量とした。高用量として設定したTDI用量の3x10<sup>5</sup>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用量であることを予備実験で確認して設定した。*N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) (関東化学株式会社)を45 mg/kg、生後10週齢に単回尾静脈投与を行った。生後75週齢をEnd Pointとして剖検し比較検討した。さらに、Androgen Receptor免疫組織化学的検討を行った。

## 結果と考察

前立腺癌発癌率は7.5 µg群で2%、250群で17%、2.5 ng群では29%、25 pg群では48%、対照群では47%を示していた。Chi-square testから、対照群と比較して発癌率は7.5 µg群、250群、2.5 ng群で有意に低値を示していた。今回の検討から、胎生期PCB126曝露を受けた次世代雄におけるMNU誘発前立腺発癌はPCB126曝露用量依存的に減少することが明らかとなった。次に、MNU誘発前立腺発癌の生物学的特性を調べるためにAndrogen Receptorの発現の免疫組織化学的検討結果では、25 pg群、対照群では多数の癌細胞核に陽性像が認められたのに対して、250群、2.5 ng群では一部の癌細胞で陽性像を認めた。さらに7.5 µg群では認められなかった。本検討から、PCB126胎生期曝露はMNU誘発前立腺発癌を抑制することが明らかとなり、原因の一つとしてAndrogen Receptorの発現抑制が示唆された。

## 要 約

PCB126胎生期曝露は*N*-methyl-*N*-nitrosourea誘発前立腺発癌を用量依存的に抑制することが明らかとなり、その原因の一つとして前立腺癌細胞におけるAndrogen Receptorの発現抑制が示唆された。PCB126胎生期曝露

は雄ラットに対して Androgen Receptor を介し抗アンドロゲン様に作用することが推定された。

### *Research Group 5*

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

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

**Abstract:** Although polychlorinated biphenyls (PCBs) are fat-soluble environmental pollutants stored breast fatty tissue and secreted in milk, the precise evidence of carcinogenesis from exposure to PCBs remains unclear. The aim of this study was to investigate the dose-response relationship prenatal exposure of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) for *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) induced rat prostate carcinogenesis. Male Sprague-Dawley rats whose dams had been injected (i.g.) with 25 pg, 2.5 ng, 250 ng, 7.5  $\mu$ g of PCB126/kg, or the vehicle, on days 13 to 19 post-conception. 12-weeks-old male offsprings were injected (i.v.) with 45 mg MNU/kg. The concentration of PCB126 in the liver of the 12-weeks-old was compared to the vehicle-group, found to be significantly higher in the 7.5  $\mu$ g-group, but other group was nearly to that of the vehicle group. The experiment was terminated when the pups were 75-weeks-old. The 7.5  $\mu$ g, 250 ng and 2.5 ng-group showed reduction of prostate carcinogenesis, but the 25 pg revealed increases incidence of carcinoma that is a similar incidence of the vehicle-group. The present studies indicated that prenatal exposure of high to relatively low dose PCB126 acted as an inhibiting agent toward MNU-induced rat prostate carcinogenesis. This effect partly might be due to an inhibition of androgen receptor (AR) expression at prostate, as relatively low dose PCB126 injected group, such as the 2.5 ng group, showed inhibition of AR expression at prostatic lesions.