

ゼブラフィッシュ胚の脳におけるダイオキシン誘発性アポトーシス

董武¹、寺岡宏樹¹、築山周作¹、山崎康司¹、今仁須美子¹、近藤俊三²、平賀武夫¹

¹酪農学園大学獣医学部毒性教室、²三菱生命研

ダイオキシンは、齧歯類をはじめとする哺乳類のほか、鳥類、魚類に対して致死性、免疫毒性、発癌性、催奇形性を有することが知られている。この他、台湾油症や米五大湖沿岸住民の例などダイオキシンは高次機能にも影響する可能性が指摘されているが、その機序は分かっていない。またダイオキシンによる中枢神経のアポトーシスに関する報告は見られない。本研究では、環境毒性モデルであるゼブラフィッシュを用いて、アポトーシスに対する TCDD の影響を検討した。受精後 24 時間(hpf)の胚を、最も arylhydrocarbon receptor (AhR)活性の高い 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)を含む水溶液中で暴露した。アポトーシス細胞に選択性のある TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL)染色によって、ゼブラフィッシュの中脳背側部における陽性細胞が TCDD 暴露により有意に増加することが観察された。また、電子顕微鏡像において、核の濃縮、断裂などのアポトーシスの特徴を示す細胞が TCDD 暴露群で観察された。TCDD によるアポトーシスの増加はカスパーゼ阻害薬である Z-VAD-FMV によって抑制された。TCDD によるアポトーシスの発生率は 60hpf から急増した後、72hpf では減少し、96hpf までにはコントロール値まで戻った。また、アポトーシスの発生は TCDD の濃度に依存して増加した。TCDD は循環障害を起こすことが知られているので、脳血流を画像解析法により測定した。その結果、50hpf 胚の中脳背側部において、TCDD による中脳静脈(Mesencephalic Vein)血流の減少が見られたが、60hpf までに対照値に回復した。TCDD 処置で見られるアポトーシスの増加と血流の遅延は AhR 作動薬である β -ナフトフラボンにより再現され、これらの作用は AhR 阻害薬である α -ナフトフラボンにより抑制された。TCDD による両作用はチトクローム P450 阻害薬あるいは抗酸化剤である N-acetylcysteine により抑制された。50 hpf 胚において、P450 1A mRNA 発現と抗体陽性が TCDD 暴露の濃度に依存して脳を含む血管内皮、鰓弓、心臓などで見られた。以上の結果は TCDD が局所循環障害を介して中枢神経にアポトーシスを誘発することを示唆する。また、AhR を介した CYP1A 発現や酸化ストレスが TCDD の毒性発現に関与しているかもしれない。

Correlation between local circulation failure and apoptosis by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the dorsal midbrain of zebrafish embryos

W. Dong¹, H. Teraoka¹, S. Tsukiyama¹, K. Yamazaki¹, S. Imani¹, S. Kondo and T. Hiraga¹

¹Department of Toxicology, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Japan and Mitsubishi Kasei Institute for Life Science, Machida, Japan

Zebrafish (*Danio rerio*) embryos were exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) from 24 hours post fertilization (hpf) until observation. TCDD transiently decreased the blood flow in mesencephalic vein of dorsal midbrain at 50 hpf but returned to control level until 60 hpf, whereas the rate of blood flows in other vessels did not significantly change until 72 hpf. On the other hand, TCDD caused apoptosis (AP) in dorsal midbrain of 60 hpf embryos with the similar concentration dependency to local circulation failure. These effects were mimicked by beta-naphthoflavone and almost abolished by alpha-naphthoflavone. These effects by TCDD and BNF were similarly inhibited by inhibitors for cytochrome P450 and antioxidants. The same range of TCDD enhanced mRNA expressions and immunoreactivity of cytochrome P450 1A in endothelial cells of blood vessels in the brain and trunk, heart and other branchial arch primordia until 50 hpf. These results suggest that TCDD induces apoptosis in central nervous system of zebrafish embryos by way of local circulation failure, which could be related to AhR activation, induction of CYPs and oxidative stress.