

別添 1

研究費の名称 = 厚生科学研究費補助金

研究事業名 = 生活安全総合研究事業

研究課題名 = ダイオキシン類の汚染状況及び子宮内膜症等健康影響に関する研究

国庫補助金精算所要額(円) = 175,000,000

研究期間(西暦) = 1998-2000

主任研究者名 = 金子豊蔵(国立医薬品食品衛生研究所)

分担研究者名 = 安田峯生(広島大学医学部)、菅野純(国立医薬品食品衛生研究所)、井上達(国立医薬品食品衛生研究所)、佐井君江(国立医薬品食品衛生研究所)、藤井義明(東北大学大学院理学部)、鈴木 勝士(日本獣医畜産大学)、三国 雅彦(群馬大学医学部)、今田中伸哉(化学品検査協会日田研究所)、長谷川隆一(国立医薬品食品衛生研究所)、広瀬明彦(国立医薬品食品衛生研究所)、黒川 雄二(国立医薬品食品衛生研究所)

研究目的 = ダイオキシン類がヒトの健康影の解明については、リスクマネジメントの観点からもいっそう重要性を帯びてきており、数多くの化学物質の中で、受容体原性の極微量毒性に対する対策が求められる AhR を介する化学物質としからざるものとを峻別する技術開発を通じ、さらに、ダイオキシンと他の化学物質、特に内分泌かく乱化学物質とのあり得べき相乗性などを考慮して、奇形、発がん性などに関連した機構研究についても種々の遺伝子組み換え動物を用いた新しい視点に立った検討が求められている。このような必要性に鑑み、本研究は、ダイオキシン類の健康影響のメカニズムを解析し、以てその健康影響評価の科学的基盤に資することを目的とする。この目的に沿って、ダイオキシンの生体影響のうち、特に、①胎生期即ち器官形成期における奇形の誘発の如何、雄胎児の副生殖器官発生かく乱の確認と機序の解明②成熟期における発がん性の如何、及び③障害発現への AhR の関与の如何の 3 点に焦点を絞って、「暴露一般」、「発がん性(in vitro 指標及び、in vivo 指標の双方)」、「AhR そのものの機能変化」、更に「ステロイドやコルチコイドなどの他の受容体への共役性の変化」を指標として研究を進めた。

研究方法 = ① 奇形誘発に関しては、ダイオキシンによりマウスに誘発される口蓋裂の発生のメカニズムについて、p53 遺伝子欠失マウスを用いたアポトーシスの修飾影響を検討した。また、C57BL/6 マウスおよび ddY マウスを用いて口蓋裂の発生の系統差を検討し、ddY マウスが TCDD による口蓋裂嫌発性であることを明らかにした。② 成熟期における発がん性に関しては、Tg.AC マウスを用いて成熟期個体におけるダイオキシンの発がん性高感度検出系として、in vivo 指標の検討を行い、発がん性の認められた化合物について AhR を介するか否かの分別を行うことを継続した。③ ダイオキシンの障害発現機構については、③-1) AhR の機能解析: 本受容体のリプレッサーとしてクローニングされた蛋白による調節機構を解析し、AhR シグナルの伝達機構を明らかにすることを目的として、AhR の標的遺伝子として、新たに AhR repressor を

同定しその作用機能を検討した。③-2) 他の受容体(ステロイドや糖質コルチコイドなど)との共役に関する研究:ステロイドやグルココルチコイド受容体を変化させた実験動物における諸変化、特に神経薬理効果への影響についての研究を平行して進めた結果、ダイオキシンの持続的暴露が脳内の代謝を低下させる傾向があることが示唆された。③-3) TCDD の生体影響:妊娠ラットに極微量のTCDDを単回投与し、雄性副生殖器官の発生異常とその後の機能障害を確認したので、発生初期の転写調節のかく乱について確認し、その機序を解明する。また、④高度ケミカルハザード対応施設としてダイオキシン研究に実績のあるカロリンスカ研究所(スウェーデン)の調査研究及び、⑤ダイオキシン類の毒性学的研究、規制における国際動向について調査を行った。

結果と考察 = ①奇形誘発:外因性 Corticosteron (CS) による、ddYマウス胎児の口蓋裂(CP)について、臨界ウインドウおよび無作用量について検討した。口蓋裂の発生は胎生 12.5 日目をピークとして高率に認められ、単回皮下投与における無作用量は 50mg/kg であった。また PCTs 単独で口蓋裂が低頻度に発症する量を妊娠マウスに投与しておき、そこに単独投与では口蓋裂が発症しない量のコルチコステロンを投与すると、口蓋裂の発症頻度に増加が見られた。これより PCTs による口蓋裂がグルココルチコイド系を介する機構を使用していることが示唆された。3. AhR 遺伝子欠失マウスでは、TCDD による口蓋裂の発症は見られないが、PCTs 投与では AhR 遺伝子欠失マウスにおいても口蓋裂が発症することを確認した。よって、口蓋裂発症には AhR を介する機構と、グルココルチコイド系を介する機構とが存在することが確認された。

②発がん性:In vivo では、TCDDの発がん性は、epi genetic な機構に依ることが示唆され、他方の in vitro においては、佐井らの、WB 培養細胞を用いた検討から、そこに ras 遺伝子が関与するものと考えられる事から、このメカニズムの検討には、Tg/AC マウスおよび Bhas42 細胞のような系が適切であると考えられる。BALB/3T 細胞及び Tg.AC6F1 由来の MEF(mouse embryo fibroblast)、また BALB3T3 細胞に v-Ha-ras を導入した Bhas42 細胞では、増殖効果及び GJIC 切断について WB とは逆の結果を得ており、今後、遺伝発現を含む諸項目について分子メカニズムの検討を進める。

③-1) AhR の機能解析:1) AhR の欠失マウスを用いた実験でベンゾピレンによる発癌に AhR が関与していることを証明したこと、2) AhR による標的遺伝子に AhR の活性を抑制する AhRR (AhR repressor) があることを示し、AhR の働きにフィードバック阻害の調節機構が働いていることを示したこと、3) CYP1A2 の誘導的発現メカニズムの研究から AhR/Arnt ヘテロ2量体はコアクチベーターとしても働くことが出来ることを明らかにした。

③-2) 他の受容体との共役に関する研究:ラット前頭前野における糖代謝を見た限りでは、慢性変動ストレス、さらにダイオキシン類の慢性投与および慢性変動ストレスとの複合処置のいずれも明瞭な影響を与えなかった。つまり成熟後の脳に対してはほとんど影響を与えないものと考えられる。胎生期においてはダイオキシン類の暴露が仔ラットの中枢神経系の発達にいかなる影響を与えるか検討する必要がある、今後他の脳部位でも比較検討を行うとともに、胎生期のダイオキシン類投与についてさらに検討する必要があると考えられた。

③-3) TCDD の生体影響:2,3,7,8-TCDD の子宮内暴露による胎児への影響を解明する目的で、ウイスター今道近交系ラットに妊娠中期(15 日)および初期(3 日)に他段階の用量の TCDD を単回経口投与し、胎児および生後の雄の生殖機能に対する影響を調べた結果、副生殖器官重量を維持するには不十分である可能性があることを示唆された。今回の実験系の中では LOAEL は 1.0  $\mu$ g/kg であったが、これを確定するためにはさらに低用量での実験が必要であ

る。

④高度ケミカルハザード対応動物施設：大型暴露実験の必要性から、実験施設の充実が必須である。高度ケミカルハザード対応動物施設建設にあたっては、作業者の暴露防止法や漏出防止法、廃棄物の処理・保管法について配慮する必要がある。

⑤ダイオキシン類の毒性学的研究、規制における国際動向の調査研究：AhR 自体の解析では、TCDD に対する感受性が、C 末側の転写調節領域の構造に関係しているという状況証拠も揃いつつあるようである。さらに、毒性評価の上では体内動態に関する知見も必要であり、授乳経路による胎児の各臓器における TCDD 体内動態の解析結果は、生殖器毒性を評価する上で重要な知見であると考えられる。

結論 = マウスにおける口蓋裂の検討においては、ddY マウスにおける TCDD による口蓋裂は、C57BL/6 マウスに比べて嫌発性であった。口蓋裂発症には AhR を介する機構と、グルココルチコイド系を介する機構とが存在することが確認された。また、ダイオキシンの発がんプロモーター作用の検出系として Tg.AC マウスおよび Bhas42 細胞のような系を用いることにより、そのメカニズムの検討につながることを示唆され、いわゆるダイオキシン類化合物の作用を検討する基礎となると考えられた。In vitro 及び in vivo の両面から TCDD 発がんプロモーションに関わっていることが示唆されている ras 遺伝子に焦点を当て、さらに、そのメカニズムの詳細を解析することが、TCDD の生体影響の発がん促進標的選択制を含む多様性を解明する一助となると考える。ダイオキシンの毒性が AhR を介するかどうかを検討する上で AhR 遺伝子欠失マウスの作製は非常に有効であり、ダイオキシンの奇形や 2-MC の発がん AhR が関与することが明らかになったように、毒性 やその発現機構の解明に役に立つと考えられており、ダイオキシンによる生体毒発現において AhR は奇型の誘導や発癌に関与していることを AhR 欠失マウスを用いて明らかにすることができた。AhR はダイオキシンの毒性発現の殆どすべてに関与していることが推測される。AhR/Arnt による遺伝子発現系にフィードバック阻害の調節機構が働いていることや誘導的エンハンサー XRE に直接結合して遺伝子発現を活性させる機構の他に、Ah/Arnt ヘテロ2量体はコアクチベーターとしても働く機構が存在していることを発見した。胎生期の母体への軽微な慢性ストレス負荷が成熟後の神経内分泌機能に明らかな影響を与えたことが明らかとなり、従って胎生期においてはダイオキシン類の暴露が仔ラットの中樞神経系の発達により大きな影響を与える可能性がある。今回の検討で胎生期のダイオキシン類曝露は、不安関連行動の発達に障害を与え、危険に対し適切な行動をとる機構に影響を及ぼしている可能性が示唆された。今後さらに行動学的解析、さらに神経内分泌学的機能を評価していく予定である。TCDD の暴露実験の結果、in vitro ではウイスターハノーバーとウイスター今道ラットを用いた今回の実験で、これらの動物を TCDD の実験に用い得ることが判明した。また、今回の妊孕能の確認試験は、形態学では分からない機能異常を検出しており、発生生殖毒性の有用な試験法であることが確認された。このエンドポイントとして  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$  の 1 回投与が現時点での LOAEL であり、さらに用量を低くして影響を見る必要も生じている。3 年間にわたる国内外のダイオキシン研究にかかる調査より、今後、我が国における TDI の再評価の必要性に係る検討に際して、留意すべきと考えられる点のひとつは、ヒトの感受性の個体差であると結論した。また、ダイオキシン類による子宮内膜症の発症に関しては、免疫系の関与が示唆されているが、国際的な大きな流れとして、さらに増殖因子である  $\text{TNF}\alpha$  が分子メカニズム的に関係していることが突き止められようとしている。また、胎児期曝露による前立腺への影響に関しては、Ah-レセプターの発現制御の解析と共に、細胞特異的な毒性発現メカニズムの解析が、これからの大きな課題であると考えられた。

別添2

厚生科学研究費補助金総合研究報告書表紙

厚生科学研究研究費補助金

生活安全総合研究事業

研究課題名(課題番号): ダイオキシン類の汚染状況及び子宮内膜症等健康影響に関する研究

(H10-生活-009)

平成 10-12 年度 総合研究報告書

主任研究者 金子 豊蔵

平成 13(2001)年 4 月

厚生科学研究費補助金総合研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告書	7
ダイオキシン類の汚染状況及び子宮内膜症等健康影響に関する研究 (H10-生活-009)	
	金子 豊蔵
II. 分担研究総合報告書	30
1. 口蓋裂発生機序に関する研究	金子 豊蔵
2. 分子奇形学的検討	安田 峯生
3. ダイオキシン類の発がんプロモーター作用の in vivo 高感度(短期) 検出系に関する研究	菅野 純
4. 細胞接着分子に対する影響とプロモーター作用	井上 達
5. 細胞接着分子に対する影響とプロモーター作用 TCDD によるギャップ結合細胞間連絡 (GJIC)阻害と細胞増殖作用	佐井 君江
6. アリールハイドロカーボン受容体の機能調節	藤井 義明
7. 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシンによる雄生副生殖器の発生歪曲の分子機 序に関する研究	鈴木 勝士
8. 胎児期や新生児期のストレス負荷ラットへの成熟後のダイオキシン類暴露の影響	三国 雅彦
9. 高度ケミカルハザード対応動物施設	今田中伸哉
10. ダイオキシン類の毒性学的研究における国際動向に関する研究	長谷川隆一、広瀬 明彦
11. ダイオキシン規制の国際動向	黒川 雄二
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	84
IV. 研究成果の刊行物・別刷り	88

厚生科学研究費補助金(生活総合研究事業)

総合研究報告書(総括研究報告書)

ダイオキシン類の汚染状況及び子宮内膜症等健康影響に関する研究

国庫補助金精算所要額(円)=175,000,000

研究期間(年度)=1998-2000

主任研究者 金子 豊蔵(国立医薬品食品衛生研究所)

分担研究者 安田 峯生(広島大学医学部)

菅野 純(国立医薬品食品衛生研究所)

井上 達(国立医薬品食品衛生研究所)

佐井 君江(国立医薬品食品衛生研究所)

藤井 義明(東北大学大学院理学部)

鈴木 勝士(日本獣医畜産大学)

三国 雅彦(群馬大学医学部)

今田中伸哉(化学品検査協会日田研究所)

長谷川隆一(国立医薬品食品衛生研究所)

広瀬 明彦(国立医薬品食品衛生研究所)

黒川 雄二(国立医薬品食品衛生研究所)

## 研究要旨

本研究は、ダイオキシン類の生体影響のメカニズムを解析し、以ってその健康影響評価の科学的基盤に資することを目的とする。この目的に従って、ダイオキシンの生体影響のうち、特に奇形の誘発、発癌性、及び障害発現機構の3点に焦点を絞り、以下の概略に沿って検討を行った。① 奇形誘発に関しては、ダイオキシンによりマウスに誘発される口蓋裂の発生のメカニズムについて、p53 遺伝子欠失マウスを用いたアポトーシスの修飾影響を検討した。また、C57BL/6 マウスおよび ddY マウスを用いて口蓋裂の発生の系統差を検討し、ddY マウスが TCDD による口蓋裂嫌発性であることを明らかにした。② 成熟期個体における発がん性に関しては、Tg.AC マウスを用いて発がん性高感度検出系としての *in vivo* 指標の検討を行い、さらに、発がん性の認められた化合物について AhR を介するか否かの分別を行う系の開発を継続した。③ ダイオキシンの障害発現機構については、③-1) AhR の機能解析: AhR の標的遺伝子として、新たに AhR repressor を同定し、これによる AhR シグナルの伝達調節機構

を検討した。③-2) 他の受容体(ステロイドや糖質コルチコイドなど)との共役に関する研究:ステロイドやグルチコルチコイド受容体を変化させた実験動物における諸変化、特に神経薬理効果への影響についての研究を平行して進めた結果、ダイオキシンの持続的暴露が脳内の代謝を低下させる傾向があることが示唆された。③-3) TCDD の生体影響:妊娠ラットに極微量のTCDDを単回投与し、雄性副生殖器の発生異常とその後の機能障害を確認した。さらに、発生初期の転写調節のかく乱について確認し、その機序を解明する。また、④高度ケミカルハザード対応施設としてダイオキシンの研究に実績のあるカロリンスカ研究所(スウェーデン)の調査研究及び、⑤ダイオキシン類の毒性学的研究、規制における国際動向について調査を行った。

#### A. 研究目的

ダイオキシン類がヒトの健康に重大な影響を及ぼすことは、1980年代から世界的に大きな問題となってきた。ダイオキシン(TCDD)の毒性には、齧歯類などで特に顕著な“低濃度レベルでの致死性”、“CYP1A1・CYP1B1 などの誘導”、これに引き続く“肝毒性や肝発癌性”などが知られており、併せて“発生段階での口蓋裂等”が研究の対象となってきた。ダイオキシン受容体としてのアールハイドロカーボン受容体(AhR)の機能が、Poland et al.(1976)によって明らかになるに及んで、以後の研究は、Hoffman et al.(1991)、Ema et al.(1992)、Burbach et al.(1992)の同遺伝子のクローニングを契機として、個々の現象を相互にブリッジで繋ぎ合わせるような形で飛躍的な理解へと前進した。その環境中濃度を規制するための方策が、世界各国政府及び国際機関で考えられてきた。ダイオキシンに関する1998年5月のジュネーブにおけるTDI設定のためのWHOの会議によれば、アールハイドロカーボン受容体(AhR:いわゆるダイオキシン受容体)を介したその障害発生機構の研究が基礎的研究としても、またリスクマネジメントの観点からもいっそう重要

性を帯びてきており、こうした視点に立って、数多くの化学物質の中で、受容体原性の極微量毒性に対する対策が求められるAhRを介する化学物質としからざるものとを峻別する技術開発を通じ、リスクマネジメントに資する必要性も求められている。さらに、ダイオキシンと他の化学物質、特に内分泌かく乱化学物質とのあり得べき相乗性などを考慮して、奇形、発がん性などに関連した機構研究についても種々の遺伝子組み換え動物を用いた新しい視点に立った検討が求められている。このような必要性に鑑み、本研究は、ダイオキシン類の健康影響のメカニズムを解析し、以てその健康影響評価の科学的基盤に資することを目的とする。この目的に沿って、ダイオキシンの生体影響のうち、特に、①胎生期即ち器官形成期における奇形の誘発の如何、雄胎児の副生殖器発生かく乱の確認と機序の解明②成熟期における発がん性の如何、及び③障害発現へのAhRの関与の如何の3点に焦点を絞って、「暴露一般」、「発がん性(in vitro 指標及び、in vivo 指標の双方)」、「AhR そのものの機能変化」、更に「ステロイドやコルチコイドなどの他の受容体への共役性の変化」を指標として研究を進めた。

## B. 研究方法

### ① 奇形誘発

PCTsの口蓋裂の成因について明らかにすることを目的に、内因性に増加するCSの関与について検討しダイオキシン投与マウスと比較した。またp53遺伝子欠失マウスの口蓋閉鎖時のアポトーシス抑制影響については、AhR遺伝子欠失マウスを用いてPCTsによる口蓋裂の発症を比較し、PCTsの口蓋裂がAhRを介するものか否か検討した。

1) C57BL/6Slc 妊娠マウスへの TCDD 単回腹腔内投与後の血漿CS量を測定及びて胎児外形検査を行い、口蓋裂の発生を比較した。2) Slc:ddY 及び C57BL/6Slc マウスへの TCDD 皮下注射後、胎児の外形検査を行った。3) p53 遺伝子欠失マウスの口蓋閉鎖時のアポトーシス抑制影響に関して、ヘテロ同士の掛け合わせで得た妊娠マウスへの TCDD を皮下投与し、胎児の外形検査の結果をジェノタイプごとにまとめた。4) 経口投与による口蓋裂誘発に最適な暴露量と暴露妊娠日令を求める実験では、妊娠 8.5 日～14.5 日のいずれかに1回、Slc:ddY マウスでは、TCDD の 20,40 または 80  $\mu$ g/kg、C57BL/6:Slc マウスでは、10, 20, または 40  $\mu$ g/kg を経口投与し、妊娠 18.5 日に母体を帝王切開して、胎児の外形検査を行った。5) CSを妊娠 10.5～14.5 日までの各妊娠日齢に 1 回、妊娠母体の頸背部皮下に単回投与し、妊娠 18.5 日目に帝王切開により胎児を取り出し、口蓋裂の有無を観察した。6) PCTs1000ppm および 4000ppm 混餌飼料を対照として、PCTs1000ppm 混餌飼料を妊娠 5 日目から母体に摂餌させ、妊娠 10-14 日のいずれかに一回、CS の口蓋裂を発生させないと確認した 50mg/kg を

頸背部に皮下投与した。7) PCTsの AhR 遺伝子関与の有無についての実験では、AhR +/+、+/-、-/-の雌雄マウスをランダムに交配させ、プラグを確認したマウスに PCTsの 4000ppm 混餌飼料を妊娠 0 日より給餌し、妊娠 18.5 日に母体を回復し、胎児の口蓋裂の発症をジェノタイプごとに比較した。

### ② 発がん性

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)は変異原性試験において陰性であるが、米国 National Toxicology Program (NTP)の癌原性試験において、肝臓、甲状腺等に対する発がん性が示されている。このような発がん性はアシルハイドロカーボン受容体 (AhR) (別名ダイオキシン受容体)の遺伝子を欠失させたマウスでの実験結果から、AhR を介した酵素誘導等のepigeneticな事象の上に成り立つメカニズム、言い換えると発がんプロモーター作用が、その本態であることが推察される。短期発がん系において、いわゆるイニシエーションを要求せずにTCDDによる発がんを観測できる系として、Tg.ACマウスが知られている。このマウスは、v-Ha-ras遺伝子導入マウスであり、皮膚を主体とする各臓器・組織における発がん感受性の亢進が認められ、特に非変異原性の発がんプロモーターにも感受性を有する特徴がある。本研究では、AhR遺伝子欠失マウスとの掛け合わせを目的とし、その背景系統であるC57BL/6マウスとのF1動物における皮膚易発がん性の検討、肝発がん好発系であるC3H系マウスとのF1動物における肝易発がん性の検討を行った。これと並行して、v-Ha-ras導入非形質転換BALB由来細胞株(Bhas42細胞)および、Tg.ACマウス胎児由来線維芽細胞継代細胞(いわゆるMEF)を用いて、その発がん

プロモーター作用に対する反応性を検討し、その分子生物学的メカニズムの解析を試みるものである。Tg.ACマウス(Taconic社より入手)はFVBマウスにv-Ha-ras遺伝子をマウスゼータグロブリンプロモーターとともに導入したもので、皮膚発がん好発系である。AhRノックアウトマウスは、藤井らにより作製されたものでC57BL/6を背景としている。肝発がんに関しては、C57BL/6およびFVBマウスはC3Hよりも嫌発系である。平成10年度に、Tg.ACマウスおよびC57BL/6のF1、Tg.ACマウスおよびC3HのF1を作製した。それらには、Tg.ACの自然発生腫瘍として知られる歯原性腫瘍(odontogenic tumor)及び、皮膚創傷部位の皮膚乳頭腫の発生が低頻度ながら観察された。このことから遺伝的背景が異なっても、Tg.ACマウスとしての易発がん性がその標的臓器とともに保たれる可能性が示された。またこれらのマウス胎児よりMEFを作製し、培養形態の安定したものを数系ずつ準備した。これをさらに検証するために、これらに対する皮膚発がん2段階モデル(DMBA+TPA)、および肝発がん2段階モデル(DEN+PB)を各々実施した。また、MEF系の細胞に対してはTCDDの暴露を行い、GJCと増殖への影響を観察した。

### ③-1) AhR の機能解析

1) 作製したAhR欠失マウスを用いて皮下注射あるいは皮膚に塗布して発癌性を観察する(東大・院・医、石川教授のグループと共同研究)。2) 得られているAhRに類似性の高いcDNAを発現ベクターに挿入して、培養細胞に発現させ、その機能を測定する。cDNAをプローブにして遺伝子クローンを単離する。3) AhRの欠失マウスにおいてCYP1A2の発現はCYP1A1の発現と違って

構成的発現は保たれている。CYP1A2のプロモーター領域をCATあるいはluciferase遺伝子に結合してレポーター遺伝子を作製して、培養細胞に導入し、CYP1A1遺伝子との発現機構の違いを明らかにする。

### ③-2) 他の受容体との共役に関する研究

#### (1) ダイオキシン類が中枢神経系に与える直接的作用の検討:

まず副腎皮質刺激ホルモンの反復処置がラット大脳皮質の糖代謝を低下させることを18F-FDGを用いたPET検査で明らかにし、副腎皮質ホルモンの持続的過剰に基づくことを明らかにした。この点を踏まえ、ダイオキシン類の暴露が脳内の糖代謝に同様の影響を与えるか、否かについて検討した。

#### (2) 慢性変動ストレス(chronic variable stress、CSV)が脳内代謝に与える効果に対するダイオキシン類の連続投与の影響:

胎性期のストレス負荷やdexamethasone処置が、胎性期に暴露されたダイオキシン類の影響を受けやすくするか否かについて明らかにする前に、慢性変動ストレスおよびダイオキシン類の連続投与が成熟ラットの脳内代謝にどのような影響を及ぼすかを検討した。

#### (3) 胎生期ダイオキシン類曝露の神経系発達に対する影響:

i. 胎生期にACTH、ダイオキシン類処置を加えたラットの作製:SD系雌妊娠ラットに対し、また妊娠第17~19日目にACTH(50 $\mu$ g、皮下)あるいはTCDD、0.5 $\mu$ g/kgを投与する。出生した仔ラットを雌雄に分別して7週令に達した時点で用いる。

ii. 行動学的観察:

仔ラットに急性ストレスとして、高架式十字迷路によって、不安関連行動(10分間のopen armへ入る回数、およびopen armに滞在する時間の積算)を測定すると共に、胎生期に生理食塩水を処置した対照と比較する。

### ③-3) TCDDの生体影響:

ラット初期胚と雄性生殖器の発生歪曲の分子機序の研究では、精巣と雄性副生殖器での形態形成に関わる遺伝子発現の探査、遺伝的背景が均一と考えられる近交系Wistar Imamichi rat WIでの妊娠初期単回投与と出産児の兄妹交配形式での繁殖試験を行い、妊娠末期に帝王切開して、胎児の異常の有無を検討した。妊娠15日投与については、1.0, 2.0, 及び4.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群にそれぞれ4~5腹を追加して実験を継続した。動物への暴露は(財)動物繁殖研究所にて実施した。空調、照明時間制御のコンベンショナル動物舎環境で、陰圧ラミネフロー条件で動物を飼育、投与実験を行った。育成期間および投与前の妊娠期間についてはステンレス製金網ケージにて群飼、妊娠後期から哺育期はポリカーボネート製ケージにて個別飼育とした。臨床観察により瀕死と判定された動物は切迫屠殺して剖検に付した。

### ④高度ケミカルハザード対応動物施設調査研究

本研究が開始されると後半には大型暴露実験の必要性が生じ、実験施設の充実が必須である。高度ケミカルハザード対応動物施設建設にあたっては、作業者の暴露防止法や漏出防止法、廃棄物の処理・保管法について配慮する必要がある。それらを

ふまえて、高度ケミカルハザード対応動物施設的设计案を提案するとともに高度ケミカルハザード対応施設としてダイオキシン研究に実績のあるカロリンスカ研究所(スウェーデン)の状況を調査した。

### ⑤ダイオキシン類の毒性学的研究、規制における国際動向の調査研究

平成11年度は、イタリアのベニスで開かれたDioxin'99に参加すると共に、ダイオキシン対策としては先端的政策をしているドイツ(ベルリン)において、BGVV(連邦消費者健康保護・獣医学研究所)、UBA(連邦環境局)および、Freie University Berlinを訪問し、ダイオキシンの安全性評価や暴露に関する状況を調査した。平成12年度は、米国のカリフォルニア州モンレー開かれたDioxin'2000で得た最新の知見についてまとめた。特に、ダイオキシンの胎児期暴露による影響、子宮内膜症及びAhRを介した毒性発現メカニズム等に関する新知見についてまとめた。

## C. 結果

### ①奇形誘発

PCTsによるマウス胎児の口蓋裂の発症には、母体血中で増加するコルチコステロン(CS)が関与していることを明らかにし、胎児・胎盤系でのCS合成が母体血中の要因と考えられた。TCDDの投与により口蓋裂が高率に認められたが、母体血漿CS量に変化が見られなかったことからPCTsとTCDDの口蓋裂の成因は異なると考えられた。TCDDの皮下投与では、C57BL/6マウスの口蓋裂の発生率は低く、ddYマウスではさらに低かった。口蓋の閉鎖過程で起こるアポトーシスがp53 dependentであるかど

うかについては、結論づけられなかった。ddYとC57BL/6 マウスで口蓋裂の発現を比較したところ、TCDD の口蓋裂誘発作用に対して ddY マウスは嫌発系であることが明らかになった。PCTs 単独で口蓋裂が低頻度に発症する量を妊娠マウスに投与しておき、そこにコルチコステロンを投与すると、口蓋裂の発症頻度に増加が見られた。このことから、PCTsによる口蓋裂がグルココルチコイド系を介する機構を使用していることが示唆された。AhR 遺伝子欠失マウスでは、TCDD による口蓋裂の発症は見られないが、PCTs投与では AhR 遺伝子欠失マウスにおいても口蓋裂が発症することを確認した。よって、口蓋裂発症には AhR を介する機構と、グルココルチコイド系を介する機構とが存在することが確認された。

## ②発がん性

平成 10-11 年度は、皮膚発がん好発系である Tg.AC マウス (FVB マウスに v-Ha-ras 遺伝子をマウスゼータグロブリンプロモーターとともに導入したもの)、及び C57BL/6 の F1、Tg.AC マウスおよび C3H の F1を作製した。それらには、Tg.AC の自然発生腫瘍として知られる歯原性腫瘍 (odontogenic tumor) および、皮膚創傷部位の皮膚乳頭腫の自然発生が低頻度ながら観察された。このことから、遺伝的背景が異なっても、Tg.AC マウスとしての易発癌性とその標的臓器とともに保たれる可能性が示された。これを、さらに検証するために、これらに対する皮膚発がん2段階モデル (DMBA+TPA)、および肝発がん2段階モデル (DEN+PB) の検討を継続した。その結果、AhR 遺伝子欠失マウスの背景である C57BL/6 マウスと Tg.AC マウスの背景であ

る FVB マウスの F1 では、陽性対照プロモーター物質として用いた DMBA+TPA の 2 段階皮膚発がん実験において、扁平上皮由来の乳頭種発生については Tg.AC に依存したが、メラノサイト由来の腫瘍 (melanocytic tumor) の発生は Tg.AC には依存せず、DMBA 投与にのみ依存することが判明した。肝発がん系においては、有意な腫瘍発生促進は今のところ観察されていない。これと並行して、in vitro の系として、平成 12 年度は

v-Ha-ras 導入非形質転換 BALB 由来細胞株 (Bhas42 細胞) 及び、Tg.AC マウス胎児由来線維芽細胞継代細胞 (いわゆる MEF) を用いて、プロモーター陽対照物質としての TPA と TCDD の増殖促進作用と、細胞間連絡 (gap junction intercellular communication) への影響を色素移行法 (scrape loading dye transfer assay) にて実施した。その結果 TCDD は、TPA 型のプロモーターとは異なり細胞増殖は軽度抑制、細胞間連絡は不変あるいは若干の促進作用を示した。この結果は、形質転換ラット肝細胞株 (WB 細胞) による我々の以前の解析結果と異なっている。発現しているコネクシンの種類が Tg.AC の MEF 細胞と異なっていること、形質転換前後の違いがあることから、ホストの細胞の状況により抑制・亢進作用が入れ替わることが示唆された。

## ③-1) AhR の機能解析

1) ベンツピレンの皮下投与あるいは塗布による発癌性の実験 AhR<sup>+/+</sup>、AhR<sup>+/-</sup>、AhR<sup>-/-</sup> マウスにベンツピレンを投与して、癌の発生を観察した。その結果皮下注射による投与では AhR<sup>+/+</sup>、AhR<sup>+/-</sup> マウスでは 17 週目にベンツピレンを投与したすべてのマウスに癌

の発生が見られたが、AhR<sup>-/-</sup>マウスでは癌の発生は全く見られなかった。発生した癌は、殆どがフィブロサルコーマであった。皮膚表面への塗布でも癌の発生はやや遅れるが、結果は皮下注射の場合と全く同様であった。皮膚における CYP1A1 と CYP1A2 の発現を PCR で測定すると CYP1A2 の構成的発現は観察されたが CYP1A1 の発現は認められなかった。2) AhRR は Arnt とヘテロ2量体を形成して XRE に結合して AhR の転写活性を抑制することを示した。また、この阻害の一部はトリコスタチンによって解消されることから Histone deacetylase によることが示唆された。AhRR 遺伝子をクローニングしてプロモーター付近の構造を解析した。その結果 XRE 配列が存在することが確認された。プロモーター配列を luciferase 遺伝子に結合し、レポーター遺伝子を作製して、HeLa 細胞などに導入して、そのプロモーター活性を測定したところ、メチルコラントレン存在下に AhR と Arnt によって、その発現が誘導されることが確認された。この結果は AhR による遺伝子発現にはフィードバック阻害の調節機構が働いていることを示している。マウスの生体でメチルコラントレンによる AhRR の発現を検討した結果、心臓、肺には発現するが肝、胸腺には殆ど発現しないことが分かった。3) CYP1A2 遺伝子の発現を検討するためにそのプロモーター領域をクローニングして、CAT 遺伝子に結合してレポーター遺伝子を作製した。レポーター遺伝子を Hep3B に導入して、プロモーター活性を測定した結果、遺伝子上流 2Kb に誘導的発現に関わるエレメントを同定した。そのエレメントに点変異を導入して、誘導的エンハンサー配列 CATG N<sub>6</sub> CTTG (XRE2)

を決定した。核抽出物を用いてゲル易動度シフト法によってこの配列に結合する因子を探索した結果、この DNA に結合する因子 (X) は細胞核にかなり普遍的に存在し、AhR/Arnt は直接にこの配列に結合することは出来ないが、X への結合を介して、結合することが示された。DEAE セルロース、ヘパリンセファロース、XRE2 DNA をラテックスビーズに結合したアフィニティーカラムクロマトグラフィーによって精製した。精製標品は 63KD と 64KD の主成分のバンドと 68KD、58KD の副成分から成っていることがアクリルアミド電気泳動で示された。主成分のプロテアーゼ消化による限定分解と HPLC によってペプチドを分離し、部分アミノ酸配列を決定した。

### ③-2) 他の受容体との共役に関する研究

ステロイドやグルチコルチコイド受容体を変化させた実験動物における諸変化、特に神経薬理効果への影響については、TCDD 処置群では脳糖代謝の値はばらつきが多かった。また、慢性可変ストレスおよびダイオキシン類の連続投与が成熟ラットの脳内代謝にどのような影響を及ぼすかを検討するために Sprague-Dawley 系雄ラットを用いて1) 7日間の慢性可変ストレス負荷群、2) TCDD 慢性投与群、3) 慢性可変ストレス及び生食慢性投与群、4) 生食慢性投与群の4群で[14C]-2-deoxyglucoseを用いたオートラジオグラフィによって前頭皮質の糖代謝を比較したが、各群間で有意差は見られなかった。

### ③-3) TCDD の生体影響

11年度より研究課題に加え、暴露が必要な場合、平成11年以降動物繁殖研究所で実施できるよう体制整備等準備を平成10年

度に行った。平成 11 年度には Wilker, C. らの実験と同一用量群で、妊娠 15 日に経口的に 1 回 TCDD を投与し、妊娠末期あるいは分娩哺育後、雄の副生殖器について精査した。また、交尾行動などへの影響を観察した。平成 12 年度には、前年の実験で 4  $\mu$ g/kg 群で F1 が得られず、実験構成も小規模だったため、再現性を確認するために動物数を増やして追加実験を行った。

#### ④高度ケミカルハザード対応動物施設

今田中による高度ケミカルハザード対応施設の設計提案とダイオキシン研究に実績のあるカロリンスカ研究所(スウェーデン)の状況報告は、ダイオキシン研究施設の改善や新設に有用なものとなると考えられる。また、これを基に高度ケミカルハザード対応動物施設における作業者の暴露防止法や漏出防止法、廃棄物の処理・保管法について既存の当該施設に対する対応を行う。

#### ⑤ダイオキシン類の毒性学的研究、規制における国際動向の調査研究

Dioxin'99 及び 2000 における本シンポジウムでは、ダイオキシン類を含めた有機化学汚染物質に対して、分析法や生成分解過程、汚染状況、毒性、毒性発現機序、疫学調査、リスクアセスメント・マネジメントと幅広い研究分野における成果の発表やディスカッションが行われた。また、US-EPA では、ダイオキシン類に関する再評価を 1994 年に行っているが、2000 年 6 月に新しい再評価ドラフトを提示した。全体は、暴露、健康影響、リスク評価の 3 部に分かれており、全 35 章にも及ぶ大部なものであるが、本研究に関わる部分の要約をまとめた。

## D. 考察

### ①奇形誘発

C57BL/6 マウスおよび ddY マウスにおける TCDD の皮下投与による口蓋裂の発生は著しく低く、TCDD の吸収が皮下投与で低いことによると考えられた。また、ddY マウスの TCDD による口蓋裂は、C57BL/6 マウスに比べて嫌発系であった。グルココルチコイド(GC)による口蓋裂と逆の関係にあり、GC 嫌発系である C57BL/6 マウスが、口蓋組織中に存在する glucocorticoid に対するレセプター数が少ないことと関連していると考えられる点で興味深く、今後、この点について検討を重ねたい。P53 欠失マウスの口蓋裂の発生頻度からは、雌においては p53 の発現量の低下に伴って口蓋裂の頻度が上昇する傾向があり、雄ではこれが見られなかったが、p53 欠失状態で誇張される現象については、雌特有のホモ欠失マウスに外脳症が多く発現し、死亡するマウスが多いことを念頭において、今後さらに検索を進めたい。1000ppm の PCTs 単独投与より CS の複合投与において CP 発生率が増加する傾向がみられ、さらに臨界 window である妊娠 12.5 日において胎児 CP 発生率が複合投与で最も高いこと、副腎 11- $\beta$ -hydroxylase を阻害し、CS 合成を阻害する metyrapone を PCTs 投与妊娠マウスに処置することで、母体血漿 CS 量を減少させるとともに CP の発生が抑制される事実と合わせ考えると、PCTs の CP が内因性に増加する CS に起因することがより明確になったと考えられる。2,3,7,8-TCDD が胎児口蓋裂を誘導する作用機序として、胎児口蓋にある AhR との関係が示唆されている(Abbott B.D.1995)。しかし、PCTs の投与では、

TCDDのようにCSの発症は抑制されなかった。一方、胎児組織に特定のレセプターが出現する時期と、母体血漿ホルモンが増加する時期との相互関係は、corticoid 誘発 CP への感受性に関して重要であることから今後これらの検討がなされなければならないと考える。CSの生体内における存在形態やレセプターが出現する時期と母体血漿ホルモンが増加する時期との相互関係、ヒトと実験動物や実験動物間の種差、TCDDとPCTs等の感受性系統差がおこる原因や化学物質間での口蓋裂の成因の相違をより明確に究明することが、ヒトでの安全性を評価する上で重要であると考えられる。PCTsの投与により、口蓋裂発生時に糖質コルチコイド濃度の一過性の上昇が認められることを以前に見出したが、今後、この点とAhRを介する機構との関係について、遺伝子発現解析などを組み合わせた検討が計画される。

### ②発がん性

In vivo では、TCDDの発がん性は、epigeneticな機構に依ることが示唆され、他方のin vitroにおいては、佐井らの、WB培養細胞を用いた検討から、そこにras遺伝子が関与するものと考えられる事から、このメカニズムの検討には、Tg/AC マウスおよびBhas42細胞のような系が適切であると考えられる。BALB/3T3細胞及びTg.AC6B6F1由来のMEF(mouse embryo fibroblast)、またBALB3T3細胞にv-Ha-rasを導入したBhas42細胞では、増殖効果及びGJIC切断についてWBとは逆の結果を得ており、今後、さらに、これらの系について遺伝発現を含む諸項目について分子メカニズムの検討を進める。

### ③-1) AhRの機能解析

アリルハイドロカーボン受容体(AhR)の機能解析について、この3年間の研究は主に3つの成果にまとめられると考えられる。すなわち1) AhRの欠失マウスを用いた実験でベンツピレンによる発癌にAhRが関与していることを証明したこと、2) AhRによる標的遺伝子にAhRの活性を抑制するAhRR(AhR repressor)があることを示し、AhRの働きにフィードバック阻害の調節機構が働いていることを示したこと、3) CYP1A2の誘導的発現メカニズムの研究からAhR/Arntヘテロ2量体はコアクチベーターとしても働くことが出来ることを明らかにしたこと、である。

### ③-2) 他の受容体との共役に関する研究

本研究における検討で、ラット前頭前野における糖代謝を見た限りでは、慢性変動ストレス、さらにダイオキシン類の慢性投与および慢性変動ストレスとの複合処置のいずれも明瞭な影響を与えなかった。つまり成熟後の脳に対してはほとんど影響を与えないものと考えられる。我々が報告したように、胎生期の母体への軽微な慢性ストレス負荷が成熟後の神経内分泌機能に明らかかな影響を与えた<sup>1)</sup>ことから、胎生期においてはダイオキシン類の暴露が仔ラットの中樞神経系の発達にいかなる影響を与えるか検討する必要があり、今回の実験によって、胎生期に生理食塩水注射による軽微なストレスを受けたラットは成熟後に、高架式十字迷路によって測定された不安関連行動が有意に亢進していることが今回も観察された。興味深いことに、胎生期にTCDD投与を受けたラットは、成熟後の不安関連行動は無処置群と変化がなかった。このことは生理食塩水投与によって亢進するはずの不

安関連行動が消失していることになり、むしろ危険を感知し防御するという行動が障害されていることが示唆された。今後他の脳部位でも比較検討を行うとともに、胎生期でのダイオキシン類投与についてさらに検討する必要があると考えられた。

### ③-3) TCDD の生体影響

2,3,7,8-TCDD の子宮内暴露による胎児への影響を解明する目的で、ウイスター今道近交系ラットに妊娠中期(15日)および初期(3日)に他段階の用量のTCDDを単回経口投与し、胎児および生後の雄の生殖機能に対する影響を調べた結果、今回の成績は一部 Wilker ら(1996)の報告を再現するとともに、妊孕能の喪失に関して新知見をもたらした。交尾行動の変化は妊娠15日のTCDD投与が雄ラットの脳の性分化には影響を示さないこと、および成熟時の性行動を引き起こすに必要な量のテストステロン産生にも影響を示さないが、副生殖器重量を維持するには不十分である可能性があることを示唆している。今回の実験系の中ではLOAELは $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ であったが、これを確定するためにはさらに低用量での実験が必要である。妊娠初期に $0.5$ 、 $1.0$ 、 $2.0$ および $4.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ のTCDDを単回経口投与して胎児の発生に及ぼす影響を調べた結果、いずれの用量群でも体軸形成異常などの変異原の初期投与に特有な重篤な奇形は認められず、この時期、この用量範囲ではTCDDに突然変異誘発性はないと考えられた。 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の群で用量相関的な腎盂の拡張および尿管の拡張の発生が認められ、特に $4.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 群では胎児の約6割が発症した。この影響は妊娠初期に投与されたTCDDがその半減期が長いために、母

体内に貯留したTCDDが器官形成期になって胎児に影響した結果であると考えられた。 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 群での低頻度の腎臓の異常の発生は、遺伝的に均一と考えられる近交系ラットにおいてもなお、TCDDに対する感受性に個体差があることを示唆している。今回の実験により、妊娠初期一回投与でのTCDDのラット(母親、胎児)に対するNOAELは $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ であることが判明した。

### ④高度ケミカルハザード対応動物施設

大型暴露実験の必要性から、実験施設の充実が必須である。高度ケミカルハザード対応動物施設建設にあたっては、作業者の暴露防止法や漏出防止法、廃棄物の処理・保管法について配慮する必要がある。

### ⑤ダイオキシン類の毒性学的研究、規制における国際動向の調査研究

AhR自体の解析では、TCDDに対する感受性が、C末側の転写調節領域の構造に関係しているという状況証拠も揃いつつあるようである。このあたりの研究は、AhRと各種の核内Co-factorとの相互作用により、どのように毒性が発現されているかを解析する上で、興味深いものである。さらに、毒性発現の分子学的アプローチとはべつに、毒性評価の上では体内動態に関する知見も必要である。この意味において、今回のシンポジウムで、授乳経路による胎児の各臓器におけるTCDD体内動態の解析結果は、生殖器毒性を評価する上で重要な知見であると考えられる。

### E. 結論

マウスにおける口蓋裂の検討においては、P53欠失により雌の口蓋裂の発生が増加す

る傾向があり、雄にはこれが見られなかったが、口蓋の閉鎖過程で起こるアポトーシスが p53 dependent であるかどうかについては、結論づけられなかった。ddY マウスにおける TCDD による口蓋裂は、C57BL/6 マウスに比べて嫌発性であった。口蓋裂発症には AhR を介する機構と、グルココルチコイド系を介する機構とが存在することが確認された。また、ダイオキシンの発がんプロモーター作用の検出系として Tg.AC マウスおよび Bhas42 細胞のような系を用いることにより、そのメカニズムの検討につながることを示唆され、いわゆるダイオキシソ類化合物の作用を検討する基礎となると考えられた。In vitro 及び in vivo の両面から TCDD 発がんプロモーションに関わっていることが示唆されている ras 遺伝子に焦点を当て、さらに Tg.AC マウス、同マウスとの AhR 欠失マウスとの掛け合わせ (C57BL/6 へのバッククロス中である) によるダブル変異マウスの作成、同マウス由来の MEF や v-Ha-ras 導入 3T3 細胞により多角的に発がんプロモーターとしての性質を検討しているところであるが、標的により反応が異なったり、また、in vitro においては逆転することが明らかとなった。さらに、そのメカニズムの詳細を解析することが、TCDD の生体影響の発がん促進標的選択制を含む多様性を解明する一助となると考える。

ダイオキシソの毒性が AhR を介するかどうかを検討する上で AhR 遺伝子欠失マウスの作製は非常に有効であり、ダイオキシソの奇形や 2-MC の発がん AhR が関与することが明らかになったように、毒性 やその発現機構の解明に役に立つと考えられており、ダイオキシソによる生体毒発現において

AhR は奇形の誘導や発癌に関与していることを AhR 欠失マウスを用いて明らかにすることができた。他のグループによって AhR は肝毒性、胸腺縮退にも関与していることなどが示されて来ているので、AhR はダイオキシソの毒性発現の殆どすべてに関与していることが推測される。AhR/Arnt による遺伝子発現系にフィードバック阻害の調節機構が働いていることや誘導的エンハンサー XRE に直接結合して遺伝子発現を活性させる機構の他に、Ah/Arnt ヘテロ2量体はコアクチベーターとしても働く機構が存在していることを発見した。

躁うつ病などの感情障害の一群では、視床下部 - 下垂体 - 副腎皮質 (hypothalamus- pituitary-adrenal、HPA) 系の feedback 機構の異常が認められているが、この feedback 機構に係っている神経細胞質内グルココルチコイド受容体は heat-shock proteins(HSPs)との重合によってステロイドホルモンへの親和性を維持しており、ステロイドと結合後、核内へ移行し核内遺伝子転写制御に関与しており、本研究において、胎生期の母体への軽微な慢性ストレス負荷が成熟後の神経内分泌機能に明らかな影響を与えたことが明らかとなり、従って胎生期においてはダイオキシソ類の暴露が仔ラットの中枢神経系の発達により大きな影響を与える可能性がある。今回の検討で胎生期のダイオキシソ類曝露は、不安関連行動の発達に障害を与え、危険に対し適切な行動をとる機構に影響を及ぼしている可能性が示唆された。今後さらに行動学的解析、さらに神経内分泌学的機能を評価していく予定である。

TCDD の暴露実験の結果、in vitro では

ウイスターハノーバーとウイスター今道ラットは AhR の感受性が鈍いとされているが、今回の in vivo のデータは感受性が鈍いと言うこともなく、標的臓器における異常も他の報告と類似しており、2回の実験で再現されていることから、これらの動物を TCDD の実験に用い得ることが判明した。また、今回の妊孕能の確認試験は、形態学では分からない機能異常を検出しており、発生生殖毒性の有用な試験法であることが確認された。特に、性的二型核への影響がない形での雄の生殖行動異常(性欲の亢進、交尾行動増加、妊孕能喪失)については、今回初めて把握された現象であり、今後さらにその機序の解明が必要になる。このエンドポイントとして 1 μg/kg の 1 回投与が現時点での LOAEL であり、さらに用量を低くして影響を見る必要も生じている。

高度ケミカルハザード対応施設の設計提案とダイオキシン研究に実績のあるカロリンスカ研究所(スウェーデン)の状況報告は、ダイオキシン研究施設の改善や新設に有用なものとなると考えられる。

3年間にわたる国内外のダイオキシン研究にかかる調査より、今後、我が国における TDI の再評価の必要性に係る検討に際して、留意すべきと考えられる点のひとつは、ヒトの感受性の個体差であると結論した。すなわち、マウスではダイオキシン感受性に大きな系統差があることが知られており、ヒトでも同様の幅広い個体差があるならば、不確実係数が10でよいのかが問題となる。なお、現時点ではヒトの感受性に10倍以上の個体差があることは確認されていない。

また、ダイオキシン類による子宮内膜症の発症に関しては、免疫系の関与が示唆さ

れているが、国際的な大きな流れとして、さらに増殖因子である TNF α が分子メカニズム的に関係していることが突き止められようとしている。さらに、Ah-レセプターと増殖因子との関係でいえば、Ah-レセプターの発現制御に各種の増殖因子が関わっていること明らかにされ、特に、Ah-レセプター遺伝子の 5' 上流の転写調節部位の解析が進んだようである。また、胎児期暴露による前立腺への影響に関しては、前立腺腹葉におけるアンドロゲンレセプター mRNA の発現抑制の関与が示唆されるなど、Ah-レセプターの発現制御の解析と共に、細胞特異的な毒性発現メカニズムの解析が、これからの大きな課題であると考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

B.-I Yoon, T.Inoue and T.Kaneko : Teratological effect of 2,3,7,8 - tetrachlorodibenzo-p- dioxin ( TCDD ) : induction of cleft palate in the ddY and C57BL/6 mouse.. J.Vet. Sci. 1(2), 113-119

B.-I Yoon, Y.Hirabayashi, T.Kaneko, Y.Kodama, J.Kanno, J.Yodoi, D.Y. Kim, and T.Inoue: Transgene Expression of Thioredoxin (TRX/ADF) Protects Against 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin(TCDD): Induced Hematotoxicity. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 41, 232-236, 2001

B.-I Yoon, Y.Hirabayashi, Y. Ogawa, J.Kanno, J.Yodoi, T.Inoue, and T.Kaneko: Hematopoietic cell kinetics after

intraperitoneal single injection of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD) in mice. *Chemosphere* 43, 819-822, 2001

Sai K, Kanno J, Hasegawa R, Trosko JE, Inoue T., Review Prevention of the down regulation of gap junction intercellular communication by green tea in the liver of mice fed pentachlorophenol., *Carcinogenesis*. 21(9):1671-6, 2000

Iwama T, Kamikawa J, Higuchi T, Yagi K, Matuzaki T, Kanno J, Maekawa A., Development of invasive adenocarcinoma in a long-standing diverted ileal J-pouch for ulcerative colitis: Dis Colon Rectum. 43(1): 101-4, 2000

Fujiwara M, Okayasu I, Oritsu M, Komatsu J, Yoshitsugu M, Katoh Y, Bandoh T, Toyoshima H, Kase Y, Sugihara K, Kanno J, Hayashi Y., Significant increase in prostaglandin E-main urinary Metabolite by laxative administration: comparison with ulcerative colitis., *Digestion*.;61(3):201-6, 2000

Takeo Iwata, Jiro Kamikawa, Tetsuro Higuchi, Kazuo Yagi, Tadashi Matsuzaki, Jun Kanno, Akihiko Maekawa Development of Invasive Adenocarcinoma in a Long-Standing Diverted Ileal J-Pouch for Ulcerative Colitis Dis Colon Rectum, January 2000 Vol 43.No.1 p101-104

菅野 純, 内分泌かく乱化学物質試験法-スクリーニング試験法、測定法、毒性試験: In vivo 系を用いた暴露試験による評価, *日本臨床*, 58, 12, 121-127, 2000

菅野 純 内分泌かく乱化学物質の生物影響 *ファルマシア* 3月号, 35:219-223, 1999

菅野 純 内分泌攪乱化学物質について-生物学的立場から- *有機合成化学協会誌* 57(1):35-39, 1999

菅野 純 内分泌かく乱化学物質について-生物影響の立場から- (特別講演の抄録) *ビルと環境* 84:10-15, 1999

菅野 純 内分泌攪乱のメカニズムを考慮した生物試験 *医学のあゆみ* 190(7-8): 751-752, 1999

Zhang, W., Shields, J.M., Sogawa, K., Fujii-Kuriyama, Y. & Yang, V.W. The gut-enriched kr pel-like factor suppresses the activity of the CYP1A1 promoter in an Sp1-dependent fashion. *J. Biol. Chem.*, 273, 17917-17925 (1998)

Takahata, S., Sogawa, K., Kobayashi, A., Ema, M., Mimura, J., Ozaki, N. & Fujii-Kuriyama, Y. Transcriptionally active Heterodimer formation of an Arnt-like PAS protein, Arnt3, with HIF-1 $\alpha$ , HLF, and clock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 248, 789-794 (1998)

Sogawa, K., Numayama-Tsuruta, K., Ema,

- M., Abe, M., Abe, H. & Fujii-Kuriyama, Y. Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activity by nitric oxide donors in hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **95**, 7369-7373 (1998)
- Zheng, Y-M., Fisher, M.B., Yokotani, N., Fujii-Kuriyama, Y. & Rettie, A.E. Identification of a meander region proline residue critical for heme binding to cytochrome P450: Implications for the catalytic function of human CYP4B1. *Biochemistry*, **37**, 12847-12851 (1998)
- Wang, F., Gao, J-x., Mimura, J., Kobayashi, A., Sogawa, K. & Fujii-Kuriyama, Y. Structure and Expression of the Mouse AhR Nuclear Translocator (mArnt) Gene. *J. Biol. Chem.*, **273**, 24867-24873 (1998)
- Mimura, J., Ema, M., Sogawa, k. & Fujii-Kuriyama, Y. Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev.*, **13**, 20-25 (1999)
- Ema, M., Hirota, K., Mimura, J., Abe, H., Yodoi, J., Sogawa, K. Poellinger, L. & Fujii-Kuriyama, Y. Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1  $\alpha$  in response to hypoxia : their stabilization and redox signal induced interaction with CBP/p300. *EMBO J.*, **18**, 1905-1914 (1999)
- Ema, M., Ikegami, S., Hosoya, T., Mimura, J., Ohtani, H., Nagao, K., Inokushi, K., Katsuki, M. & Fujii-Kuriyama, Y. Mild impairment of learning and memory in mice overexpressing the mSim2 gene located on chromosome 16: an animal model of a Down's syndrome. *Hum. Molec. Genet.*, **8**, 1409-1415 (1999)
- Denver, R.J., Quellete, L., Furling, D., Kobayashi, A., Fujii-Kuriyama, Y. & Puymirat, J. Basic transcription element binding protein (BTEB) is a thyroid hormone-regulated gene in the developing central nervous system : Evidence for a role in neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.*, **274**, 23128-23134 (1999)
- Shimizu, Y., Nakatsuru, Y., Ichinose, M., Takahashi, Kume, Y.H., Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y. & Ishikawa, T. Benzo[a] pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **97**, 779-782 (2000)
- Takahata, S., Ozaki, T., Mimura, J., Kikuchi, Y., Sogawa, K. & Fujii-Kuriyama, Y. Transactivation mechanisms of mouse clock transcription factors, mClock and mArnt3. *Genes to Cells*, **5**, 739-747 (2000)
- Nakayama, M., Takahashi, K., Kitamuro, T., Yasumoto, K., Katayose, K., Shirota, K., 13) Fujii-Kuriyama, Y. & Shibuhara, S.

Repression of heme oxygenase-1 by hypoxia in vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 271, 665-671 (2000)

Hosoya, T., Oda, Y., Takahashi, S., Morita, M., Kawauchi, S., Ema, M., Yamamoto, M. & Fujii-Kuriyama, Y. Defective development of secretory neurons in the hypothalamus of *Arnt2*-knockout mice. *Genes to Cells*. In print (2001)

Suzuki, H., M. Kokado, K. Saito, T. Kunieda and K. Suzuki (1999) A locus responsible for hypo-gonadism (hgn) is located on rat Chromosome 10. *Mammalian Genome* 10(11): 1106-1107.

Akimoto, T., H. Suzuki, Y. Arai, K. Nakama and K. Suzuki (2000) Locus of dominant hairless gene (Ht) causing abnormal hair and keratinization maps to rat chromosome 10. *Experimental Animal* 49(2): 137-140.

Suzuki H., S. Fukaya, K. Saito and K. Suzuki (2000) A locus responsible for osteochondro-dysplasia (ocd) is located on rat Chromosome 11. *Mamm. Genome*. 11(6): 464-465.

Uchibori, M., K. Saito, S. Yokoyama, T. Tsuji, H. Suzuki and K. Suzuki (2000) Monitoring and analysis of the EEG spikes frequency in El mice during sleep: A new

application of wavelet transform. *Physiol. Behav.* (in submission).

鈴木勝士(1999) エストロンの初期鶏胚の発生に及ぼす影響、内分泌攪乱物質学会ニューズレター、4: 2-3.

板垣昌志、阿部省吾、阿部栄、酒井 淳一、鈴木勝士(1999) 乳牛の潜在性乳房炎と乳頭口異常の関連、日本獣医師会雑誌 52(9) 561-564.

鈴木勝士、他 13 名(著)(2000)XIII. 遺伝性疾患、内藤喜久、浜名克己、元井霞子編、生産獣医療における牛の生産病の実際、p207-216、文永堂、東京

鈴木勝士、他 83 名(訳)(2000)第 114 章、臍臓内分泌部の外科的疾患、高橋貢、佐々木信雄監訳、スラッター小動物の外科手術：(Slatter, D: Textbook of Small Animal Surgery (2nd Ed.), WB Saunders Co., Philadelphia 1993)、文永堂、東京、p1667-1678.

鈴木勝士、他 44 名 (2000) 2.2.3. 子宮内暴露試験、2.2.4. 一世代繁殖試験、井上達監、今井清、長村義之、加藤正信、菅野純編、内分泌化学物質の生物試験研究法、シュプリンガー・フェアラーク東京、東京、p85-106

鈴木勝士(2000) ナイトセッション Dose-response. 森田昌敏、緊急企画 内分泌攪乱化学物質問題に関する国際シンポジウム'99-各座長による包括報告-