

資源環境対策 36(2):156-157.

高須正規、高橋純子、斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士(2000)マウス脳硬膜上からの聴覚脳幹誘発電位(第2報)、電子情報通信学会技術研究報告 MBE99-152:43-47

鈴木勝士(1999)環境ホルモンと獣医師の役割、アニマリタリオン、vol. 9:1.

黒川雄二;ダイオキシン問題雑感. ファルマシア, 34;419(1998)

黒川雄二;ダイオキシン類の毒性について. ビルと環境, 80;47-55(1998)

廣瀬明彦, 長谷川隆一, 黒川雄二;ダイオキシン類の生体毒性. J. Toxicol. Sci., 23; App. 93-106(1998)

黒川雄二:ダイオキシンのTDI(耐容一日摂取量)について. 食品衛生研究, 50:73-77 (2000)

黒川雄二, 井上達;ダイオキシン類のリスクアセスメント, 特に国内外の規制状況及び内分泌障害性物質としての作用. 国立衛研報告, 116;1-12(1998)

Heid SE, Pollenz RS, Swanson HI: Role of heat shock protein 90 dissociation in mediating agonist-induced activation of the aryl hydrocarbon receptor. Mol Pharmacol 2000 Jan;57(1):82- 92

Sai, K., Upham, B. L., Kang, K.-S.,

Hasegawa, R., Inoue, T., Trosko, J.E. (1998) Inhibitory effect of penta chlorophenol on gap junctional inter cellular communication in rat liver epithelial cells in vitro. Cancer Lett., 130, 9-17.

佐井君江:緑茶の肝発がん抑制過程における生物学的諸変化.放射線科学, 42, 113-119(1999)

T.Umemura, S.Kai, R.Hasegawa,K.Sai, Y.Kurokawa, G.M.Willoams. Penta chloro phenol (PCP) produces liver oxidative stress and promotes but does not initiate hepatocarcinogenesis in B6C3F1 mice. Carcinogenesis, 20, 1115-1120 (1999).

2. 学会発表

Byung-Il Yoon, Yoko Hirabayashi, Yukio Ogawa, Jun Kanno, Tohru Inoue, Toyozo Kaneko. The oscillating recovery in cellularity of the bone marrow and CFU-GMs after intraperitoneal 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin(TCDD) exposure, DIOXIN99, September 12-17, 1999, Venice, Italy. Organohalogen Compounds, 42:393-395, 1999.

Kimie Sai, Jun Knno, Tohru Inoue and Toyozo Kaneko: Effects of TCDD on GJIC and cell growth in v-ras-transfected rat liver epithelial cells. DIOXIN200, August 13-17, 2000, Monterey, USA. Organohalogen

Compounds, 49:307-309, 2000

B.-I Yoon , Y.Hirabayashi, T.Kaneko,
Y.Kodama, Jun Kanno, J.Yodoi and
T.Inoue, Transgene expression of
Thioredoxin (TRX/ ADF) protects against
2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCD
D -induced hematotoxicity Dioxin 2001,
September 9-14, 2001

Kanno J, Kato H, Inoue T, Uterotrophic
effect of dietary genistein/daidzein-
Modification of NIH-07open formula-
Hormones and Endocrine Disrupters in
Food and Water: Possible Impact on
Human Health Copenhagen, Denmark,
27-30 May 2000

Kimie Sai , Jun Kanno, Tohru Inoue, and
Toyozo Kaneko, Effects of TCDD on
GJIC and cell growth in v-ras-trans
fected rat liver epithelial cells. Dioxin
2000,August 13-17, 2000

Jun Kanno, Kimie Sai, Ryuichi Hasegawa,
James. E. Trosko and Tohru Inoue,
Prevention of the down-regulation of gap
junctional inter-cellular communication by
green tea in the liver of mice fed
pentachlophenol. The 2nd Congress of
Asian Society of Toxicology ASIATOX II,
August 23-25, 2000

A. Ono, J. Kanno and T. Inoue,
Conformational changes on ERα induced by
endocrine disrupting chemicals (EDCs).

Keystone symposia, 2000

松島裕子、菅野 純、宮城恵理、井上 達、
卵巣摘出ラットにおけるエストロゲン枯渇期
間と子宮肥大反応の関係について、日本
内分泌攪乱化学物質学会第2回研究発表
会 1999

Yasuda, M. et al: Palatal ruga
anomalies induced by dioxins in mice.
DIOXIN99, September 12-17, 1999,
Venice, Italy. Organohalogen
Compounds, 42: 389-392, 1999.

Sugihara, K., et al.: Induction of liver
xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase
by 2,3,7,8-TCDD and cobalt chloride.
DIOXIN 2000, August 13-17, 2000,
Monterey, California, U.S.A. Organo
halogen Compounds, 49: 247-250, 2000.

杉原数美 他:ダイオキシンおよびコバルト
の毒性とキサンチン酸化酵素誘導機構. 環
境ホルモン学会第3回研究発表会, 2000
年 12 月 15~16 日, 横浜. 環境ホルモン学
会第3回研究発表会要旨集, p. 379, 2000.

斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士(2000)電磁
場照射がマウスの繁殖と成長におよぼす影
響について 第 19 回宇宙エネルギーシン
ポジウム (pp.75-79)

高須正規、高橋純子、斉藤賢一、鈴木浩悦、
鈴木勝士(2000) マウス脳硬膜上からの聴
覚脳幹誘発電位(第2報)、電子情報通信
学会、MEとバイオサイバネティクス研究会、

小川実幸、岩間良子、日比佐知子、尼崎肇、鈴木浩悦、鈴木勝士、孫 偉勇、塩田邦郎(2000) マウスロ蓋ヒダ形成位置とブラコード形成・細胞増殖・アポトーシス・細胞周期関連因子の発現分布の関係、第 52 回日本動物学会、関東地方部会

徳力 剛、太田千春、高須正規、鈴木浩悦、斎藤賢一、鈴木勝士(2000)腎低形成症ラットにおける慢性腎不全進行過程の基礎的評価、第 129 回日本獣医学会

八木美央、鈴木浩悦、岡田美香、千純子、醍醐久美、中宮英次郎、尼崎 肇、斎藤賢一、鈴木勝士(2000)精巣形成不全症ラットの生後初期精巣の病理発生に関する調査:細胞の増殖と細胞死の観点から、第 129 回日本獣医学会

田村 啓、三森国敏、小野寺博志、高木久宜、森安眞津子、鈴木勝士、広瀬雅雄(2000)ラット甲状腺二段階発癌における下垂体除去の影響と外来性 TSH の修飾作用、第 129 回日本獣医学会

日比佐知子、岩間良子、小川実幸、尼崎肇、鷹巣雅峰、鈴木浩悦、鈴木勝士、孫偉勇、塩田邦郎(2000)マウスロ蓋ヒダ形成位置とブラコード形成・細胞増殖・アポトーシス・細胞周期関連因子の発現分布の関係、第 129 回日本獣医学会

秋元敏雄、鈴木浩悦、仲間一雅、鈴木勝士(2000) WBN/IIa-Ht rat のヘアレス遺伝子(Ht)のラット第 10 染色体上へのマッピング

およびヌードラットとの相補性試験、第 47 回日本実験動物学会

鈴木勝士(2000)動物の疾患の遺伝子、第 26 回日本比較臨床血液学会

鈴木勝士、斎藤賢一、鈴木浩悦、竹中基郎、八木未央(2000)エストロン投与による鶏胚での発生攪乱、第 40 回日本先天異常学会

斎藤賢一、内堀雅隆、横山修一、辻 隆之、鈴木浩悦、鈴木勝士(2000)先天性癲癇モデル動物(El Mouse)における睡眠時脳波の解析、第 40 回日本先天異常学会

鈴木勝士、斎藤賢一、鈴木浩悦、竹中基郎、八木未央、岡田美香(2000)エストロン投与による鶏胚での発生攪乱について、第 130 回日本獣医学会

秋元敏雄1)、鈴木浩悦2)、仲間一雅1)、鈴木勝士(2000)Hairless rat(WBN/IIa-Ht)の原因遺伝子 *Ht* とヌードラットとの相補性試験。(F1 および F2 の表現型について)、第 130 回日本獣医学会

丸ひろみ、鈴木浩悦、高橋純子、井出雅子、大村 彰、斎藤賢一、鈴木勝士(2000)骨軟骨形成不全症ラット病因遺伝子の探索:外交配系での表型調査と病因遺伝子座周辺の連鎖地図の作成、第 130 回日本獣医学会

竹中基郎、鈴木浩悦、石坂みゆき、斎藤賢一、鈴木勝士(2000) Wistar-Imamichi ラットクローズドコロニーで発見された神経症状を

伴う矮小ラット、第 130 回日本獣医学会

高橋純子、斉藤賢一、高須正規、鈴木浩悦、鈴木勝士(2000)El および ddY マウス脳硬膜上からの聴覚脳幹誘発反応(ABR)の解析、第 130 回日本獣医学会

鈴木浩悦、高橋純子、丸ひろみ、斉藤賢一、鈴木勝士(2000)骨軟骨形成不全症ラット病因遺伝子の探索:RH パネルでの連鎖マーカーの配列と系統内多型を用いたファインマップの作成、第 130 回日本獣医学会

千葉純子、中宮英二郎、鈴木浩悦、斉藤賢一、鈴木勝士(2000)ウイスターイマミチラット由来近交系統間での ocd 遺伝子座周辺の多型性、第 130 回日本獣医学会

尼崎 肇、小川美幸、日比佐知子、岩間良子、鈴木浩悦、鈴木勝士、孫 偉勇、塩田邦郎(2000)マウス口蓋ヒダ形成配列に関連する PAL31 の mRNA の発現分布、第 130 回日本獣医学会

岡田美香、鈴木浩悦、千葉純子、醍醐久美、中宮英二郎、八木未央、斉藤賢一、鈴木勝士(2000)ラット精巣形成不全症(hgn / hgn)の胎生期病態発生に関する検討、第 130 回日本獣医学会

鈴木勝士(2000)期鶏胚に及ぼすエストロジェンの発生障害作用を中心にして、第 130 回日本獣医学会

田村 啓、三森国敏、小野寺博志、那須昌弘、高木久宜、安原加壽雄、上田誠、鈴木勝士、広瀬雅雄(2000)ラット甲状腺二段階

発癌モデルにおける麩酸イニシエーション期投与の影響、毒性病理学会

“AhR(ダイオキシン)レセプターの作用機構と催奇形性における役割” 藤井義明 1998/5/22 第12回細胞生物学シンポジウム 愛知県がんセンター国際医学交流センター(名古屋)

“Ah(ダイオキシン)レセプターの機能と調節” 藤井義明 1998/6/20 日本薬学会北陸支部並びに第 98 回例会(金沢市)

“HLF-新しい低酸素応答性転写因子” 藤井義明、依馬正次、十川和博 1998/7/3-4 第 3 回 Vascular Medicine 学会 神戸国際会議場(神戸)

“Function and regulation of Ah(dioxin) receptor” Fujii-Kuriyama, Y., Mimura, J., Ema, M., Kobayashi, A., Sogawa, K., Yamashita, K. Takagi, T.N. & Yasuda, M. 1998/7-20-24 12th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations (Moutpellier, France)

“Regulation of Ah receptor (Dioxin receptor) activity in the inducible expression of drug metabolizing enzymes” Fujii-Kuriyama, Y., Mimura, J., Ema, M., Kobayashi, A. & Sogawa, K. 1998/7/26-31 XIIIth International Congress of Pharmacology (Germany)

“芳香族炭化水素受容体遺伝子欠損マウスを用いたベンゾピレン投与による発癌感受性の検討” 清水靖仁¹、中鶴陽子¹、三村純

正²、勝木元也³、藤井義明²、石川隆俊¹(¹東大・医・分子病理、²東北大・理・化学、³東大・医科研・人疾患セ)

“ハイポキシアで誘導される遺伝子の一酸化窒素放出試薬による転写抑制” 十川和博、藤井義明(東北大・理・化学) 1998/9/30-10/2 日本癌学会(横浜)

“bHLH-PAS 型転写因子 HLF による低酸素依存的遺伝子発現機構” 依馬正次、広田喜一、淀井淳司、藤井義明

“mRNA factory: 転写・プロセッシングを担う核内分子間ネットワークオーガナイザー” 荻原正俊、藤井義明、半田宏、梅園和彦

“PASタンパク質のイーストでの発現とDNA相互作用の解析” 十川和博、安田真規子、藤井義明、仁川純一

“Analysis of the Mouse Promoter” 王鋒、三村純正、十川和博、藤井義明(東北大院・理・化学)

“新しいタンパク質間相互作用ドメイン(PAS)の大腸菌による発現と精製” 菊池康夫、三村純正、依馬正次、十川和博、藤井義明(東北大院・理・化学)

“AhRRによるAhRのフィードバック制御機構” 三村純正、依馬正次、十川和博、藤井義明 1998/10/14-17 第71回日本生化学会大会(名古屋)

“遺伝子産物(タンパク質)の形を観る” 藤

井義明 1998/10/22-23 第13回「大学と科学」公開シンポジウム(東京)

“ダイオキシンリセプターの作用機構と催奇形性における役割” 藤井義明 1998/11/18-19 第12回日本動物実験代替法学会(仙台)

“Ah(ダイオキシン)リセプターの生物機能と調節機構” 藤井義明、三村純正、依馬正次、小林聡、十川和博 1998/12/4 第112回日本医学会シンポジウム(東京)

“Ah リセプターの機能及び調節の分子機構” 藤井義明¹、三村純正¹、依馬正次¹、小林聡²、守田匡伸¹(¹東北大・院理、²同・院医)

“bHLH-PAS 型転写因子 HIF-1 α 及び HLF による Tie2 遺伝子の低酸素依存的発現調節機構” 阿部学、依馬正次、藤井義明(東北大・院理・化学)

“mSim1、mSim2 の転写抑制ドメイン、及び細胞内局在性” 大野博道、依馬正次、藤井義明(東北大・院理・化学)

“新規 PAS タンパク質、Arnt3 のクローニングと転写活性” 高畑祥¹、小林聡²、十川和博¹、藤井義明¹(¹東北大・院理・化学、²同・院医・医化学)

“AhR 遺伝子の単球系分化に伴う転写調節” 渡辺潤子¹、角純子¹、生田統悟¹、林慎一¹、本間良夫¹、川西政史²、十川和博²、藤井義明²、川尻要¹(¹埼玉がんセ・研、²東北大・院理・化学)

“ヒト HL60 細胞のマクロファージへの分化時における Ah レセプター遺伝子の発現に必要な上流領域の解析” 川西政史¹、藤井義明¹、渡辺潤子²、生田統悟²、川尻要²、十川和博¹(¹ 東北大・院理・化学、² 埼玉がんセ・研)

“bHLH-PAS 型転写因子による低酸素依存的遺伝子発現機構” 依馬正次¹、杉林千晶¹、広田喜一²、淀井淳司³、藤井義明¹(¹ 東北大・院理・化学、² 京大病院・麻酔科、³ 京大・ウイルス研・生体応答)

“BCbox 結合転写因子 BYEB の発現解析” 守田匡伸^{1,2}、中島修²、高橋智²、島貫智匡¹、小林聡¹、山本雅之²、藤井義明¹(¹ 東北大・院理・化学、² 筑波大・TARA センター) 1998/12/16-19 日本分子生物学会(横浜)

“Ah(ダイオキシン)受容体(AhR)の機能と調節機構” 藤井義明 1999/4/2-4 第25回日本医学会総会(東京)

“Ah(ダイオキシン)受容体の生物作用の分子機構” 藤井義明 1999/5/22 第43回東北内分泌研究会(仙台)

“アリルハイトロカーボン(ダイオキシン)受容体の生物作用と機能制御” 藤井義明 1999/5/28 平成11年度日本環境変異原学会公開シンポジウム(東京)

“The Ah Receptor Regulatory mechanisms of Ah (Dioxin) Receptor Function” Fujii-Kuriyama, Y. 1999/8/29-9/2 11th International Conference on Cytochrome

P450 -Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology- (仙台)

“Loss of teratogenic and carcinogenic effects of environmental pollutants such as 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and benzo[a] pyrene in mice lacking the Ah (dioxin) receptor” Fujii-Kuriyama, Y. 1999/9/22-23 The First Fujihara International Seminar(東京)

“内分泌攪乱化学物質の生体毒発現におけるAhレセプターの役割” 藤井義明、三村純正、十川和博、依馬正次、小林聡

“生物の環境応答と bHLH/PAS 転写因子” 藤井義明 1999/10/6-9 第72回日本生化学会大会(横浜)

“ダイオキシン受容体(AhR)の生物機能とフィードバック調節機構” 藤井義明 第2回 RIBS バイオサイエンス・シンポジウム(岡山)

“ダイオキシン作用の分子機構と今後の研究の展開” 藤井義明 1999/10/22 第25回環境トキシコロジーシンポジウム・第3回衛生薬学フォーラム合同大会(名古屋)

“Clockを含むbHLH-PAS転写因子の転写調節メカニズムと機能” 藤井義明 1999/11/17

黒川雄二;医薬品の安全性試験の現状と問題点-ICHを中心として- 日本実験動物学会総会, 市川(1999.5)

黒川雄二;ダイオキシンの耐容一日摂取量について. 日本薬学会九州支部主催コロキウム「薬学と環境ホルモン」, 福岡(1999.10)

平林容子, 高木篤也, 児玉幸夫, 菅野 純, 黒川雄二, 井上 達: Mn-SOD 遺伝子導入マウス骨髄細胞での紫外線抵抗性, 第 58 回日本癌学会総会(1999.10)

Kurokawa,Y.;Risk assessment of dioxin in Japan, Symposium on Regulatory Aspects of Risk Assessment and Risk Management, The 2nd Congress of Asian Society of Toxicology, Cheju, Korea(2000.8)

Hirabayashi,Y., Saga,Y., Kanno,J., Kurokawa,Y.& Inoue,T.;Hematotoxicity by two oxidative stress agents, ultraviolet light(UV) and paraquat, in thioredoxin/ ADF transgenic and knockout mice: Comparison between in vitro and in vivo study. The 2nd Congress of Asian Society of Toxicology, Cheju, Korea(2000.8)

黒川雄二;医薬品及び動物用医薬品毒性試験ガイドラインの現況. 第 129 回日本獣医学会公衆衛生分科会シンポジウム, つくば(2000.4)

黒川雄二;オーバービュー. セミナー ICH ガイドラインの果たした役割と問題点. 第 28 回日本トキシコロジー学会学術年会, 横浜(2000.6)

黒川雄二;医薬品承認審査の国際的ハーモナイゼーション. 第 1 回日中医薬品安全

性評価学術シンポジウム. 北京, 中国(2000.10)

黒川雄二;ICH とはーその目的とこれまでの成果. 日本実験動物学会維持会員シンポジウム, 東京(2000.12)

西川秋佳, 佐井君江, 古川文夫, 孫 和永, 木苗直秀, 井上達, 黒川雄二, 広瀬雅雄: 水道水汚染物質 MX によるギャップ結合細胞間連絡阻害. 第 59 回日本癌学会総会(2000.10)

平林容子, 高木篤也, 尹 乗一, 児玉幸夫, 五十嵐勝秀, 菅野 純, 黒川雄二, 井上 達: Mn-SOD 遺伝子導入マウス骨髄細胞での γ 線照射に対する抵抗性. 第 59 回日本癌学会総会(2000.10)

K.Sai; Green tea: Its biologically suppressing effects during the hepato carcinogenesis induced by pentachloro phenol -A possible implication for interaction of green tea components with endocrine disruptors-The 5th International Symposium on green Team Seoul, Korea (May 7, 1999)

K.Sai, B.L.Upham, K.-S. Kang, R. Hasegawa, J.E.Trosko, T.Inoue: Penta chlorophenol inhibits gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells. 1999 International Gap junction Conference Gwatt, Switzerland (August 28 ~ September 2, 1999)

K.Sai, J.E.Trosko, T.Inoue: Pentachloro phenol-induced down-regulation of gap junctional intercellular communication was ameliorated by (-)-epigallocatechin gallate in rat liver epithelial cells. Epigenetic Toxicant-Induced Signal Transduction and Altered Cell-Cell Communication, Ann Arbor, Michigan (October 17 - 20, 1999)

B.L.Upham, G.Chen, A. Voges, K. Sai, J.E. Trosko: The inhibition of gap junctional intercellular communication and the activation of MAPK by methylated anthracenes with specific structures. Epigenetic Toxicant-Induced Signal Transduction and Altered Cell-Cell Communication, Ann Arbor, Michigan (October 17 - 20, 1999)

B.L.Upham, K.Sai, P.K.Tithol, G.Chen, W.R.Wilson, J.E.Trosko: Inhibition of gap junctional intercellular communication, activation of MAPK, and the release of arachidonic acid by specific isomers of methylated anthracenes. Society of Toxicology 39th Annual Meeting, Philadelphia, Pennsylvania (March 19 - 23, 2000)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生科学研究費補助金（生活総合研究事業）
分担研究総合報告書

口蓋裂の発生機序に関する研究

主任研究者 金子豊蔵

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部

研究要旨

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C57BL/6マウスの口蓋裂誘発について皮下投与による検討を、PCTs投与による口蓋裂の好発系であるddYマウスと併せ検討した。また、口蓋裂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。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。

A. 研究目的

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検討した。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。

B. 研究方法

C57BL/6Slc妊娠マウスの妊娠12日に2,3,7,8-TCDD, 0(Cont.), 20 μ g/kg, 40 μ g/kgを単回腹腔内投与し、1群2～3例について妊娠14日に母体の血漿C

S 量を測定するとともに、妊娠 18 日に母体を帝王切開して胎児外形検査を行い、口蓋裂の発生を比較した。Slc:ddY 及び C57BL/6Slc マウスの妊娠 10.5 日～14.5 日のいずれかに 1 回、2、3、7、8、
-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD, 0.2% acetone olive oil sol.) の 20,40 または 80 μ g/kg を背部に皮下注射し、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。

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の実験では、ヘテロ同士の掛け合わせで得た妊娠マウスの妊娠 10.5～14.5 日のいずれか一回、TCDD の 40 μ g/kg を皮下投与し、妊娠 18.5 日に母体を帝王切開して、胎児の外形検査を行い、その結果を genotyping ごとにまとめた。

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 μ g/kg、C57BL/6:Slc マウスでは、10、20、または 40 μ 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。

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。

次に、PCT s 1000ppm および 4000ppm 混餌飼料を対照として、PCT s 1000ppm 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。

また、PCT s 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 PCT s 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。

C. 研究結果

TCDD による口蓋裂の発生は用量にともなって増加したが、妊娠 14 日における母体血漿CS量は各群で差が見られなかった。TCDD の皮下投与における口蓋裂の発生頻度は経口投与で知られている頻度より低く、C57BL/6 マウスの妊娠 12.5 日の 40 μ g/kg 投与で 25.0%であった。80 μ g/kg 投与では 30%前後のあった。一方、ddY マウスでは、妊娠 11.5 日の 80 μ g/kg 投与で 2.0%の最大発現が見られ、それ以外ではほとんどが 0%であった。

P53 欠失マウスの口蓋裂の発生頻度を妊娠の 9.5 日から 13.5 日のいずれかに TCDD の 40 μ g/kg を皮下投与したマウスに見られた口蓋裂の発生頻度を総胎児数に対する割合で示すと雄では、+/+ : 5/24、+/- : 11/42、-/- : 3/18、雌では、+/+ : 4/32、+/- : 9/43、-/- : 4/13 で、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った。12.5 日投与についてのみの結果を見ると、雄では、+/+ : 3/8、+/- : 5/12、-/- : 0/6、雌では、+/+ : 3/11、+/- : 6/15、-/- :

3/4 で、ホモ欠失雌マウスの p53 の発現に伴う口蓋裂の発生はより顕著であった。

TCDD の経口投与マウスにおける口蓋裂の発生は、C57BL/6 マウスでは、10 μ g/kg と 20 μ g/kg の妊娠 11.5 日または 12.5 日投与でそれぞれ 37.5%、27.8%、94.3%、95.5%と最大となり、40 μ g/kg の投与では、妊娠 9.5 日の投与から 100% の口蓋裂発生を示した。ddY マウスでは、2 倍量の TCDD を投与したにもかかわらず口蓋裂の発生は低く、80 μ g/kg の妊娠 12.5 日投与でも胎児の 20%に発生を見たにすぎなかった。

CS による口蓋裂の発生は妊娠 13.5 日の 100mg/kg 以上で見られ、妊娠 12.5 日、CS 300mg/kg 投与時における発生率が他より明らかに高く 31.04%を示した。マウス母体に単回投与しても胎児口蓋裂が発生しない CS 量は 50mg/kg であり、CP に対する臨界 window は 12.5 日であった。

PCTs 1000ppm・4000ppm をそれぞれ妊娠 5.5 日から 18.5 日までの期間、母体に自由に摂餌させ、口蓋裂の発生を比較した結果、1000ppm で 5.26%、4000ppm で 29.94%の発生率が得られた。

粉末飼料に 1000ppm の PCTs を混じて、妊娠 5 日目から投与し、妊娠 10・14 日のいずれかに一回、胎児口蓋裂を発生させないと確認した CS の 50mg/kg を投与した結果、PCTs と CS の複合投与で胎児の口蓋裂発生に増加が認められ、その発生率は 1000ppm の PCTs 単独投与の 5.26%を越え妊娠 12 日目で 15.89%であった。

AhR 遺伝子欠失マウスに PCTs を投与

し、口蓋裂の発症率を比較した結果、それぞれ、AhR +/+ 37.8%、+/- 22.0%、-/- 27.6%で口蓋裂の発症に差が見られなかった。

D 考 察

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 (Lakshmanan : J.Pharmacol Exp Ther 239 : 673-677,1986) 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 (Salomon, D.S.: J.Cell. Physiol.,97, 315-325, 1976)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- β -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(金子、1988)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なつたと考えられる。

2,3,7,8- TCDD と PCTs は共に胎児 CP を発生させるが、その作用機序の詳細には不明な点が多い。PCTs による CP の好発系である ddY マウスは、2,3,7,8-TCDD 投与では嫌発系であり、2,3,7,8-TCDD の好発系である C57BL/6 は PCTs 投与では嫌発系で、逆の関係にあることから、両物質の CP 発現機序に相違があることが示されている (Byung-Il Yoon. *et al.* 2000)。

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 aryl hydrocarbon receptor (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 (Kenneth S.B. *et al.* 1985) 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える。

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。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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
2. 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
3. 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

2. 実用新案登録
なし

2. 学会発表

1. Byung-Il Yoon, Yoko Hirabayashi, Yukio Ogawa, Jun Kanno, Tohru Inoue, Toyozo Kaneko. The oscillating recovery in cellularity of the bone marrow and CFU-GMs after intraperitoneal 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin(TCDD) exposure, DIOXIN99, September 12-17, 1999, Venice, Italy. Organohalogen Compounds, 42:393-395, 1999.
2. Kimie Sai, Jun Knno, Tohru Inoue and Toyozo Kaneko: Effects of TCDD on GJIC and cell growth in v-ras-transfected rat liver epithelial cells. DIOXIN200, August 13-17, 2000, Monterey, USA. Organohalogen Compounds, 49:307-309, 2000
3. B.-I Yoon , Y.Hirabayashi, T.Kaneko, Y.Kodama, Jun Kanno, J.Yodoi and T.Inoue, Transgene expression of Thioredoxin (TRX/ ADF) protects against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCD D -induced hematotoxicity Dioxin 2001, September 9-14, 2001

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし

分子奇形学的検討

分担研究者 安田 峯生 広島大学医学部

研究要旨

ダイオキシン類のマウスでの 1) 口蓋裂誘発機序、及び 2) 毒性発現機序について検討した。1)について、従来の定説は、二次口蓋突起内側縁上皮の増殖継続、アポトーシス抑制により、癒合が阻害されるというものであったが、ダイオキシン曝露を受けたマウス胎児口蓋の細胞動態の観察により、二次口蓋突起内の間葉細胞、これを被う上皮細胞ともに増殖率が低下していることが明らかとなった。また、口蓋裂を免れた胎児でも、口蓋ヒダのパターン異常が見られることから、口蓋突起そのものの形成への影響があることが示された。2) 毒性発現機序の一つに脂質過酸化があるとされ、活性酸素類を生成するキサンチン酸化酵素およびキサンチンデヒドロゲナーゼが TCDD 投与を受けたマウス肝臓で上昇することを見出した。本活性増加はダイオキシン受容体(AhR)遺伝子欠損マウスでは認められないことから、AhRを介する作用であることが明らかになり、これらの酵素がダイオキシンの毒性発現に関与している可能性が示唆される。

A. 研究目的

ダイオキシン類の中で最も毒性が強いとされる 2,3,7,8-四塩化ジベンゾパラジオキシン (TCDD) は、マウス胎児に口蓋裂や水腎症を誘発する。口蓋裂の発生機序については、口蓋突起内側縁上皮細胞(MEE)の細胞死が抑制され、口蓋突起の癒合が阻止されるためであるという仮説が有力とされてきた。しかし、外脳のある胚子では、外脳の誘発方法に関係なく、TCDD に曝露されても口蓋裂を生じないことが見いだされた。本研究では TCDD による口蓋裂の誘発機序を知る目的で、癒合前後の時期の MEE と口蓋突

起間葉細胞の発達の指標として、挙上させた後の二次口蓋突起間の距離を測定した。また、その毒性発現機序にアリール炭化水素受容体(AhR)が介在していることを明らかにした。そこで AhR 以後の毒性発現メカニズムの解明を目的として、マウス肝臓における TCDD による新規酵素誘導を検索した。

B. 研究方法

1) 口蓋裂誘発機序：実験には Jcl:ICR マウスを用いた。終夜交配した後、膣栓発見日の午前0時を妊娠0日とし、妊娠12.5日にTCDD 40 μ g/kg を強制経口投与した。外脳誘発方法としては妊娠7.5

日に塩化カドミウム (CdCl_2) 6 mg/kg を腹腔内投与した。屠殺前 2 時間に 5-ブローモ-2'-デオキシウリジン (BrdU) 300 mg/kg を母体に腹腔内投与しておき、妊娠 13.5 日～14.5 日に母獣を経時的に屠殺して胚子を取り出し、ホルマリン固定した。その後、抗 BrdU 抗体を用いて免疫染色を施し、細胞増殖能を観察した。BrdU の取り込み率測定には、各発育段階につき、2 匹の胚子より採取した各 6 枚の口蓋突起前頭断切片を用い、デジタルカメラにて撮影後、写真上にて陽性細胞を数えた。結果の解析には t 検定を用いた。細胞死は TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) 法にて観察した。二次口蓋突起間距離測定には、各発育段階につき 2～3 体の母獣より得られた 23～43 匹の胚子を用い、固定を行わず下顎及び舌を切除、口蓋突起を挙上させた後、両口蓋突起間の最狭距離を計った。測定値は Wilcoxon の順位和検定法により解析した。

2) 毒性発現機序: 実験には野生型 C57BL/6J マウスと AhR 遺伝子欠如マウス (*Ahr*^{-/-})を用いた。成熟マウスにコーンオイルに溶解した TCDD 20～80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を 1 回強制経口投与した。対照マウスには溶媒のみを投与した。投与後 3 日、1、2、または 4 週後にマウスを屠殺し、肝臓を摘出した。肝臓は直ちに 1.15% KCl で灌流し、KCl 中でホモゲナイズ後、遠沈してサイトゾル分画を得、そのキサンチン酸化酵素 (XO)、キサンチンデヒドロゲナーゼ (XDH)、アルデヒド酸化酵素活性を調べた。さらに、マイクロゾーム分画でエトキシレゾルフィン-*O*-デアルキラーゼ (EROD)、メトキシレゾルフィン-*O*-デアルキラーゼ (MROD) およびペントキシレゾルフィン

-*O*-デアルキラーゼ (PROD) 活性を検索した。また、肝臓中の脂質の過酸化度を測定した。

(倫理面への配慮)

本実験は広島大学医学部附属動物実験施設の許可を得て倫理的に行われた。

C. 研究結果

ダイオキシン類のマウスでの口蓋裂誘発機序について、胎齢 13.5 日には、無処置対照群、TCDD のみ投与群ともに口蓋突起はまだ挙上しておらず、無処置対照群では多くの BrdU 陽性細胞が認められたが、TCDD 投与群では間葉細胞、基底細胞、周皮細胞ともに無処置対照群は胎齢 13.5 日に比べ間葉細胞、基底細胞、周皮細胞すべてにおいて陽性率の有意な低下が見られた。胎齢 14.5 日には、無処置対照群は口蓋突起の水平転位を起こしており、中央部より癒合を開始していた。癒合部の上皮索 (epithelial seam) には陽性細胞は極度に少なかったが、皆無ではなかった、非癒合部でも同様に陽性細胞は少なかった。TCDD 投与群では口蓋突起の水平転位を起こしていないものが多かったが、やはり BrdU 陽性細胞は無処置対照群同様極めて少なかった。CdCl₂ 投与により外脳を誘発された TCDD 投与群胚子では、この胎齢 14.5 日にすでに口蓋突起全長にわたり癒合し、一部では上皮索も消失していたが、TCDD のみ投与群との BrdU 取込率の差異は見られなかった。MEE の細胞死については、TCDD 投与、非投与に関わらず胎齢 14.5 日に TUNEL 陽性細胞が見られた。二次口蓋突起間距離は、胎齢 14.0 日には、無処置

対照群と TCDD 投与群の間に差は見られなかった。胎齢 14.25 日には、無処置対照群は胎齢 14.0 日に比し短縮していたが、TCDD 投与群は胎齢 14.0 日に比し変化が少なく、無処置対照群より有意差が広がった。従来の定説は、二次口蓋突起内側縁上皮の増殖継続、アポトーシス抑制により、癒合が阻害されるというものであったが、ダイオキシン曝露を受けたマウス胎児口蓋の細胞動態の観察により、二次口蓋突起内の間葉細胞、これを被う上皮細胞ともに増殖率が低下していることが明らかとなった。また、口蓋裂を免れた胎児でも、口蓋ヒダのパターン異常が見られることから、口蓋突起そのものの形成への影響があることが示された。

ダイオキシン類のマウスでの毒性発現機序について、野生型マウスでは TCDD40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与1週間後には XO と XDH 活性は対照群の 2.2~2.6 倍に増加した。XO と XDH に類縁のアルデヒド酸化酵素の活性も TCDD により増加したが、その増加程度は XO と XDH に比べて少なかった。EROD および MROD の活性はそれぞれ対照群の 59 倍、47 倍に増加した。これに反して PROD 活性は TCDD 投与により増強されなかった。各酵素の活性誘導は投与3日後には認められ、4週後でも維持されていた。これらの誘導には用量反応関係が認められ、EROD と MROD については 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ まで増加した。XO/XDH 活性も 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ までは増加したが、80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ではやや低下した。*Ahr*^{-/-}マウスでは TCDD による酵素活性誘導は認められなかった。遺伝子欠損ヘテロ個体では野生型と同様の誘導が認められた。肝臓中の過酸化脂質は、野生型マウスでは TCDD40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与により対照群の約3倍に

増加した。しかし、*Ahr*^{-/-}マウスでは TCDD 投与群と対照群の間に差は認められなかった。

D. 考察

口蓋裂は口蓋突起の①発達、②挙上、③接触、④癒合のいずれかが阻害された結果誘発されるが、TCDD によっては、①~③は阻害されず、④の阻害によるものと報告されてきた。さらに癒合阻害の機序としては MEE の細胞死の抑制が考えられてきたが、本研究における観察では、細胞の増殖はむしろ早期に低下していること、MEE の細胞死は予定時期に見られることが明らかにされた。また癒合前の TCDD 投与群での間葉細胞における BrdU 陽性率の低下、及び二次口蓋突起間距離の開離から、従来の仮説とは相違して TCDD 投与により二次口蓋突起の発達、挙上が阻害されることが示された。また、外脳誘発により二次口蓋突起を強制的に接触させると癒合を完了すること、その場合も細胞動態に差異は見られないことも明らかになった。

また、TCDD がマウス肝臓の XO/XDH 活性を誘導することが初めて示された XO/XDH はヒトを始め多くの哺乳類、鳥類、魚類に広く分布する。この酵素により活性酸素が生じる。活性酸素は脂質過酸化を起こし、これが種々の病的過程に関与する。本研究でも TCDD により肝臓の過酸化脂質が増加することが示され、TCDD の毒性発現に XO/XDH が関与している可能性が示唆された。われわれは *Ahr*^{-/-}マウスでは TCDD の発生障害作用が認められないことを示したが、*Ahr*^{-/-}マウスでは TCDD による XO/XDH の誘導も起こらず、この誘導が AhR 依存性であることが明らかとなった。

E. 結論

以上の所見は、TCDD 投与による口蓋裂誘発機序について、従来の定説を覆し、口蓋突起発達の阻害、挙上の遅延が主役を演じることを明らかにし、TCDD により AhR 依存性に誘導される XO/XDH が活性酸素産生、脂質過酸化の過程を通じて TCDD の毒性発現に関与している可能性があると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takagi, TN et al: Pathogenesis of cleft palate in mouse embryos exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). Teratogenesis, Carcinog. Mutag., 20: 2000 in press.
- 2) Sugihara, K., et al.: Aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated induction of xanthine oxidase/xanthine dehydrogenase activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. Biochem. Biophys. Res. Com., 281: 1093-1099, 2001.

2. 学会発表

- 1) Yasuda, M. et al: Palatal ruga anomalies induced by dioxins in mice. DIOXIN99, September 12-17, 1999, Venice, Italy. Organohalogen Compounds, 42: 389-392, 1999.
- 2) Sugihara, K., et al.: Induction of liver xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase by 2,3,7,8-TCDD and cobalt chloride. DIOXIN 2000, August 13-17, 2000, Monterey, California, U.S.A. Organo

halogen Compounds, 49: 247-250, 2000.

- 3) 杉原数美 他: ダイオキシンおよびコバルトの毒性とキサンチン酸化酵素誘導機構. 環境ホルモン学会第3回研究発表会, 2000年12月15~16日, 横浜. 環境ホルモン学会第3回研究発表会要旨集, p. 379, 2000.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)
分担研究総合報告書

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

分担研究者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

ダイオキシン類の生体影響のメカニズム解析の一環として、発がんプロモーター作用にも感受性を示すとされる 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 指標の検討を行った。そのための系として Tg.AC マウスと AhR 遺伝子欠失マウスとを交配して双方の遺伝子変異を持つマウス生産に向けての戻し交配をさらに進め、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中である。その前段階として、AhR 遺伝子欠失マウスの背景である C57BL/6 マウスと背景が FVB である Tg.AC マウスの形質が維持されるか否かを確認した。その結果、AhR 遺伝子欠失マウスの背景である C57BL/6 マウスと背景が FVB である Tg.AC マウスとの F1 について、陽性対照として用いた DMBA+TPA の 2 段階皮膚がん実験において、ケラチノサイト由来の乳頭腫は、Tg.AC 背景に依存して高頻度に誘発されたが、メラノサイト由来の腫瘍(melanocytic tumor)は、Tg.AC 背景には依存せず DMBA+TPA 処置にのみ依存することが判明した。このことは、同一系内に Tg.AC 依存性と非依存性の 2 系統の陽性対照が同定された。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。

A 研究目的

本研究班が掲げるところの、1) 発がん性遺伝子改変動物を用いた多くの発がん研究の実績に応じてダイオキシンによる発がんの決定要因を解明し、閾値の問題に立ち入って検討すること、また、2) AhR ノックアウトマウスの作製に成功した背景に基づいて、これに関連するエンハンサーやリプレッサー等の AhR の調節機構を明らかにすることを目的とし、その両方に関連した系として、ダイオキシン類の発がん作用の高感度検出系に、発がんにおけるプロモーター作用にも感受性を示すとされる Tg.AC マウスを用いると共に、このものと AhR 遺伝子欠失マウスとを交配して双方の遺伝子変異を持つマウスを生産し、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。この時、誘導される代謝酵素の検討も併行して行う。以ってこの知見の応用として、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する。

B. 研究方法

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リ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と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、GJICと増殖への影響を観察した。

C. 研究結果

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マウスをTg.ACマウスの背景であるFVBマウスのF1において、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)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(scraper 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。

D. 考察

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/3T 細胞及び Tg.ACB6F1 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 (gap junctional intercellular communication)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。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sai K, Kanno J, Hasegawa R, Trosko JE, Inoue T., Reciew 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

- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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-Tetrachloro dibenzo-p-Dioxin (TCDD): Induced Hematotoxicity. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 41, 232-236, 2001
- 5) 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
- 6) 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 Rectim, January 2000 Vol 43.No.1 p101-104
- 7) 菅野 純, 内分泌かく乱化学物質試験法-