

平成11年度 厚生科学研究費補助金（生活総合研究事業）

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

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)
	鈴木 勝士	(日本獣医畜産大学)
	佐井 君江	(国立医薬品食品衛生研究所)
	菅野 純	(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)
	三国 雅彦	(群馬大学医学部)
	黒川 雄二	(国立医薬品食品衛生研究所)
	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)

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）=92,000,000

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）
鈴木 勝士（日本獣医畜産大学）
佐井 君江（国立医薬品食品衛生研究所）
菅野 純（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）
三国 雅彦（群馬大学医学部）
黒川 雄二（国立医薬品食品衛生研究所）
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）

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し、奇形の誘発、発がん性、障害発現への AhR の関与の3点に焦点を絞り研究を行う。①奇形の誘発：TCDD の C57BL/6 マウスの口蓋裂誘発について皮下および経口投与による検討を、PCTs による口蓋裂の好発系である ddY マウスと併せ行った。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てアポトーシスの修飾影響を検討した。TCDD の口蓋裂誘発作用に対し ddY マウスは嫌発系であることが明らかになった。口蓋閉鎖過程のアポトーシスが p53 dependent であるかどうかは、結論づけられなかった。（金子） TCDD のマウス口蓋裂誘発における口蓋突起内側縁上皮（medial edge epithelium、以下 MEE）及び間葉の細胞動態の解析により、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、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。（安田） 妊娠中に TCDD を子宮内暴露した雄ラットは成熟後の生殖器重量が減少し、妊孕能が低下することが明らかになった。（鈴木） ②発がん性：TCDD 類の発がんプロモーター作用機構解明の一環として、TCDD による肝培養細胞株のギャップ結合細胞間連絡(GJIC)阻害性・細胞

増殖を指標に、Ras 蛋白の関与、ならびに変異型 ras 導入細胞におけるそれらの増強性を検討し、野生型細胞では一過性の阻害が起こり、その後 Ras の誘導と関連した細胞増殖が起きた。変異型 ras 導入細胞では著しい細胞増殖が起きた。このことから、TCDD による増殖シグナルは、ras の活性化と GJ 機能の低下した細胞において増強されることが示唆された。(佐井) 発がんプロモーター作用に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発がん性について検討を行った。また、このマウスと AhR 遺伝子欠失マウスと交配し、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。(菅野) ③障害発現への AhR の関与：ハムスターとモルモットの AhR の全構造を決定した。また、CYP1A2 の 3MC あるいは TCDD による誘導に必要な塩基配列を決定し、その DNA に結合する因子の存在を示した。さらに AhR/Arnt はこの因子に結合して転写を活性化し、新しい作用メカニズムの存在を示した。AhR の AhR 活性の抑制はヒストンデアセチラーゼによることを示唆した(藤井)。ラット前頭前野における糖代謝においては、慢性可変ストレス、さらにダイオキシン類の慢性投与および慢性可変ストレスとの複合処置のいずれも明瞭な影響がなかった(三国)。④ダイオキシン規制とダイオキシン研究の国際動向について調査を行った。(黒川、長谷川、広瀬)

A. 研究目的

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、②成熟期における発がん性の如何、及び③障害発現への芳香族炭化水素（アリア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）関与の如何の3点に焦点をしばって、「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る。また、ダイオキシン規制とダイオキシン研究の国際動向について調査を行う。

B. 研究方法

① 奇形誘発

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。口蓋裂の頻度を上げるべく経口投与に切り替えて ddY と C57BL/6 マウスで口蓋裂の発現を比較した。(金子) また、ダイオキシン類のマウスでの口蓋裂誘発機序を検討する目的で、Jcl:ICR マウスの妊娠 12.5 日に TCDD 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を強制経口投与し、マウス胎児口蓋の細胞動態の観察を行った。(安田)

TCDD の妊娠中期のラットへの 1 回暴露が、雄の出生児の副生殖器、精子産生

に影響を及ぼすとの Wilker ら(1996)の報告について、系統を Wistar Imamichi 妊娠ラットに TCDD を投与し、再現性が見られるか否か検討した。(鈴木)

②発がん性

成熟期における発癌性の *in vitro* 指標: TCDD 類の発がんプロモーター作用の機構解明の一環として、本年度は、GJIC 阻害における Ras 蛋白の関与、ならびに変異型 ras 導入細胞におけるそれらの増強性を検討した。ラット肝由来の細胞株(WB 細胞)を野生型細胞とし、変異型 ras 導入細胞としては、v-Ha-ras を導入した WB 細胞株(WB-RAS2a 細胞)の培養過程で得られた、表現系の変化した(spindle 型)細胞株(以下、WB-RAS と略する)を用い、GJIC (scrape loading/dye transfer assay; SL/DT 法)、細胞増殖(DNA content)、pan-Ras の誘導(Western blotting)、MAPK(Erk)活性(Western blotting)について解析した。(佐井)

Tg/AC マウスと 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癌性の検討、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)を用いて、その発がんプロモーター作用の *in vitro* 検出系の検討とその分子生物学的メカニズムの解析を試みた。(菅野)

③ 障害発現への AhR の関与

ダイオキシンの生物作用を Ah 受容体による仲介作用を中心に分子レベルで明

らかにすることを目的とし、3メチルコラントレン処理した動物(ハムスター、モルモット及びマウス)の肝及び肺から poly(A)RNA を調製し、cDNA ライブラリーを作製する。5'及び3'RACE 法により5'末端及び3'末端の cDNA の塩基配列を決定し AhR 及び AhRR の構造を決定した。これらの cDNA ベクターを発現ベクターに組み込んで、培養細胞にリン酸カルシウム共沈殿法によって導入して種々の動物種の AhR 及び AhRR を発現させて 3MC との結合活性や遺伝子発現活性化能、および CYP1A2 のプロモーター領域を Hep3B 細胞に導入し発現活性を検討した。発現に必要な DNA 断片を用いて Gel Mobility Shift Assay (GMSA) を行い、この DNA 配列に結合する因子を同定し、さらにこの結合因子をアフィニティークロマトグラフィー等により精製する。AhR/Arnt ヘテロ 2 量体を用いて、この因子との相互作用を検討した。(藤井)

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。

④ダイオキシン規制とダイオキシン研究の国際動向

1990 年の WHO による TDI の設定から我が国における 1999 年の TDI の設定まで各

国のダイオキシン規制を調べた。ダイオキシン研究の国際動向については、Dioxin' 99に参加して、情報を収集すると共に、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を訪問し意見交換を行った(黒川、長谷川、広瀬)。

倫理面への配慮

使用する動物の屠殺にあたっては、麻酔薬の使用ないしは頸椎脱臼法など苦痛の少ない方法を用いるといった、各研究施設の実験動物取り扱い倫理規定に準拠した対応を行っている。

C. D. 結果と考察

①奇形誘発

TCDDの口蓋裂誘発作用に対しddYマウスは嫌発系であることが明らかになった。口蓋閉鎖過程のアポトーシスがp53 dependentであるかどうかは、結論づけられなかった(金子)。ダイオキシン曝露マウス胎児口蓋の細胞動態観察により、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の低下が明らかであった。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た(安田)。

マウスにおける口蓋裂の検討においては、ダイオキシン類による奇形発現に至る生体内での反応カスケードの一端が明らかになり、実験動物での所見をヒトに外挿して危険性を評価するための基礎的情報が得られることが期待される。

TCDDの雄胎児副生殖器の発生かく乱については、ウイスター今道ラットでも精巣重量低下、精巣上体の萎縮等を引き

起こし、Wilker(1996)の成績とほぼ同様の結果を得た。また、TCDDの用量にともない発情雌への乗駕行動は増え、挿入と射精の回数は減少し、妊孕能が低下した(鈴木)。

②発がん性

in vitro 指標：野生型細胞ではTCDDにより一過性のGJIC阻害が起き、Rasの誘導と関連した細胞増殖が引き続いた。変異型ras導入細胞は、元来GJICが低く、TCDDにより著しい細胞増殖が起きた。このことから、TCDDによる増殖シグナルは、rasの活性化とGJ機能の低下した細胞において増強されることが示唆された。(佐井)

in vivo 指標：Tg/ACマウスおよびC57BL/6のF1、Tg/ACマウスおよびC3HのF1を作成した。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および、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。今後遺伝子発現を含む遺伝子解析について作業を進めることにより、in vivoにおけるイニシエーション作用の有無を含む発がん修飾メカニズムの解明が期待される。(菅野)

③障害発現へのAhRの関与

AhRの機能解析：ハムスターとモルモットのAhRの全構造を決定した。また、CYP1A2の3MCあるいはTCDDによる誘導に必要な塩基配列を決定し、そのDNAに結合する因子の存在を示した。さらにAhR/Arntはこの因子に結合して転写を活性化し、新しい作用メカニズムの存在を示した。AhRRのAhR活性の抑制はヒストンデアセチラーゼによることを示唆し

た。(藤井)

ラット前頭前野における糖代謝においては、慢性可変ストレス、さらにダイオキシン類の慢性投与および慢性可変ストレスとの複合処置のいずれも明瞭な影響がなかった(三国)。

④ ダイオキシン規制とダイオキシン研究の国際動向

1990年にWHOによりはじめてダイオキシンのTDI(一日耐容摂取量)が、 $10\text{ pgTCDD/kg bw/day}$ とされてから、世界各国・機関はそれぞれに毒性・暴露等の評価を行い、TDI等を設定してきた。日本では、厚生省が1996年に当面のTDIとして、 $10\text{ pgTCDD/kg bw/day}$ を公表し、1997年に環境庁はダイオキシン類の健康リスク評価指針値を 5 pg/kg/day とした。その後、98年5月のWHOによる再評価で、TDIがコプラナーPCBを含んで、 $1-4\text{ pg TEQ(毒性等量)/kg bw/day}$ となった。その後、環境庁及び厚生省が専門家会合(中央環境審議会環境保健部会ダイオキシンリスク評価小委員会及び生活環境審議会・食品衛生調査会ダイオキシン類健康影響評価特別部会)を組織し、その合同会合においてTDIの見直しが行われ、1999年6月にコプラナーPCBを含め、 4 pgTEQ/kg/day を当面のTDIとすることが適当であるとした。(黒川)

Dioxin99'では、TDIの設定根拠にもなっている生殖発生毒性のメカニズムの解析や、Ahレセプター依存性を示唆する結果や、ダイオキシン類の混合投与によるTEQを検証した実験から、ダイオキシン類によるほとんど

の毒性がAhレセプター依存性であるという今までのコンセプトを補強し、そのメカニズムに関しては、ダイオキシン類による細胞増殖能への影響の他に、アポトーシスを介した系の重要性も強調された。また、ドイツ訪問では、低容量域での児に対するダイオキシン類の影響に注目しつつ、全国的な暴露状況をより詳細に把握するためのデータベースシステムの開発とより迅速なモニタリングシステムの改良に力を注いでいた。(長谷川・広瀬)

E. 結論

マウスにおける口蓋裂の検討においては、ダイオキシン類による奇形発現に至る生体内での反応カスケードの一端が明らかになり、実験動物での所見をヒトに外挿して危険性を評価するための基礎的情報が得られることが期待される。

近年発がんプロモーター作用との関連性が広く認識されつつあるGJIC阻害作用の解析が有用であると考えられ、TCDDによる肝培養細胞株のGJIC阻害性・細胞増殖を指標に、GJIC阻害におけるRas蛋白の関与、ならびに変異型ras導入細胞におけるそれらの増強性を検討した。野生型細胞ではTCDDにより一過性のGJIC阻害が起こり、その後Rasの誘導と関連した細胞増殖が引き続いた。変異型ras導入細胞は、元来GJICが低く、TCDDにより著しい細胞増殖が起きた。このことから、TCDDによる増殖シグナルは、rasの活性化とGJ機能の低下した細胞において、特に増強されることが示唆された。

このGJIC阻害作用がいわゆる

epigenetic な作用で起こる点でこの阻害機構の検討が TCDD 等の環境化学物質による発がんプロモーター作用の分子機構の解明に有用であると考えられた。

(佐井)

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事が示唆され、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。(菅野)

ダイオキシンに対して感受性の大きな違いがあるモルモットとハムスターについて、Ah 受容体と Ah 受容体リプレッサーの cDNA クローニングにより、その構造と性質を明らかされ、ヒト及びマウスで得られた結果も考慮して、動物のダイオキシンに対する感受性とこれらの生体内因子がどのように関連しているか、さらに AhR 欠失マウスにこれらの動物の AhR 遺伝子を knock-in して、マウスのダイオキシン感受性がどのように変化するか、Ah 受容体リプレッサーについても、遺伝子欠失マウスを作製し、Ah 受容体で計画されている実験を行い、ダイオキシンの生物作用発現へこの因子がどのように関わっているかを今後、明らかにする。

毒性の発現には、どのような遺伝子の発現を促進するために起こるのか、その標的遺伝子については今後の検討を待たねばならないと考えられた。

胎生期のストレス負荷や dexamethasone 処置は、胎生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投与量を変動させることにより明らかにし、これによって胎生期や新生児期のストレス刺激が神経系の発達に

直接影響し、ダイオキシン類の暴露に対する脆弱因子を形成していることが明らかにできれば、治療法や予防法を確立するための対応が可能となる。

TDI 設定に受容体原生障害としてのリスクマネジメントがジュネーブ会議で合意に達したことからみても、ダイオキシン問題はすべからず分子毒学的課題の中心にあると言って過言ではない。AhR 遺伝子欠失マウスなどを用いた機構研究の成果に期待されるのは大きい。更に、AhR 遺伝子欠失マウスを用いた種々の化学物質の暴露によって、AhR を介するものとしからざるものとの障害発生が峻別されることも期待され、同時にその結果は、これら化学物質のリスクマネジメントに資する今日の実利的な情報となることも期待される。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に鑑みて、奇形、発がん性などに関連した健康影響に関する科学的基盤の整備に資することも期待される。

F. 研究発表

1. Takagi, TN. Et al (2000) in press Pathogenesis of cleft palate in mouse embryos exposed to 2,3,7,8-terachloro-dibenzo-p-dioxin (TCDD). Teratogenesis, Carcinog. Mutag., 20
2. 佐井君江 (1999) 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
3. T. Umemura, S. Kai, R. Hasegawa, K. Sai, Y. Kurokawa, G.M. Willoams. (1999)

Pentachlorophenol (PCP) produces liver oxidative stress and promotes but does not initiate hepatocarcinogenesis in B6C3F1 mice. Carcinogenesis, 20, 1115-1120

4. T. Iwata, J.Kamikawa, T.Higuchi, K.Yagi, Development of Invasive T.Matsuzaki, J.Kanno, A.Maekawa(2000) Adenocarcinoma in a Development of Invasive Adenoanocarcinoma a in a Long-Standing Diverted Ileal J-Pouch for Ulcerative Colitis Dis Colon Rectim, Vol 43.No.1 p101-104

5. 菅野 純 (1999) 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

6. 菅野 純 (1999) 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

7. 菅野 純 (1999) 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

8. Y.shimizu, Y.Nakatsuru, M.Ichinose, Y.Takahashi, J.Mimura, Y.Fujii-Kiryama and T.Ishikawa(in press) Benzo[a] pyrene carcinogenicity is lose in mice lacking the arylhydrocarbon receptor Proc. Natl. Acad.Sci. USA

9. R.J.Denver, L.Quellete, Dfurling, A. Kobayashi, Y.Fujii-Kuriyama and

J.Puymirat(1999) Basic Transcription Element Binding Protein (BTEB) is a Thyroid Hormone-Regulated Gene in the Developing Ventral Nervous System : Evidence for a Role in Neurite Outgrowth. J. Biol. Chem. 274: 23128-23134

10. M.Ema, S.Ikegami, T.Hosoya, J.Mimura, H.Ohtani, K.nagao, K.Inokushi, M.Katsuki, And Fujii-Kuriyama (1999) Mild impairment of learning and memory in mice over-expressing mSim2 gene located in chromosome

11. M.Ema, K.Hirota, J.Mimura, H.Abe, J.Yodoi, K.Sogawa and Y.Fujii-Kuryama(1999)Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1a in response to hypoxia : their stabilization and redox signal induced interaction with CBP/p300. EMBO J. 18:1905-1914

12. J.Mimura, M.Ema, K.Sogawa and Y.fujii-Kuriyama(1999) Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. Genes Dev. 13: 20-25

13. H.Suzuki, S.Fukaya, K.Saito, and K.Suzuki (2000) (in submission) Mapping of a locus on rat chromosome 11 responsible for osteochondrodysplasia(ocd). Mammalian Genome

14. T. Akimoto, H.Suzuki, Y.Arai, K.Nakma, and K.Suzuki (1999) A locus responsible for dominant hairless gene (Ht) is located on rat chromosome 10. Experimenta

15. 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.

16. H.Suzuki, M.Kokado, K.Saito, T.Kunieda and K.Suzuki (1999) A locus responsible for hypogonadism (hgn) Mammalian Genome 10(11):1106-1107.

17. 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

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

19. Byung-Il Yoon, Tohru Inoue and Toyozo Kaneko (in submission) Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin(TCDD): Induction of Cleft Palate in the ddY and C57BL/6 mouse. J Vet Sci.

20. Byung-Il Yoon, Yoko Hirabayashi, Yukio Ogawa, Junn Kanno, Tohru Inoue and Toyozo Kaneko (1999) 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

G. 知的所有権の取得状況
なし

厚生科学研究費補助金（生活総合研究事業）
分担研究報告書

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

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。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。口蓋裂の頻度を上げるべく経口投与に切り替えて 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 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ており、この変化についても解析を開始した。今後、AhR 遺伝子欠失マウスを用いた検討を行うべく、既に当該遺伝子欠失マウスを分担班員の藤井教授から供与を受け、交配維持を行っている。

A. 研究目的

TCDD の C57BL/6 マウスの口蓋裂誘発に最適な皮下投与の時期と投与量を明らかにする目的で、PCTs 投与による口蓋裂の好発系である ddY マウスと併せ比較検討した。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。また、皮下投与では、口蓋裂の発現頻度が低かったため、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た。

B. 研究方法

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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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。

C. 研究結果

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%前後の発現率でほぼ天井値に達しているようであった。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。

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。

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、この点についても解析を開始した。今後、AhR 遺伝子欠失マウスを用いた検討を行うべく、既に当該遺伝子欠失マウスを分担班員の藤井教授から供与を受け、交配維持を行っている。

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Byung-Il Yoon, Tohru Inoue and Toyozo 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. (in submission)

2. 学会発表

1. Byung-Il Yoon, Yoko Hirabayashi, Yukio Ogawa, Jun Knno, 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.

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

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

分子奇形学的研究

分担研究者 安田 峯生 広島大学医学部教授

研究要旨

ダイオキシン類のマウスでの口蓋裂誘発機序について、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。

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。

B. 研究方法

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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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 χ^2 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。

(倫理面への配慮)

本実験は広島大学医学部附属実験動物施設の許可を得て倫理的に行われた。

C. 研究結果

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、無処置対照群ではおおくのBrdU陽性細胞がみとめられたが、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日に比し間葉細胞、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、一部では上皮素も消失していたが、TCDD のみ投与群との BrdU 取込率の差異はみられなかった。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 陽性細胞がみられた。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が広がった。

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る結果誘発されるが、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、上記の観察では、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み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、およ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みられないことも明らかになった。

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た。

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. 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.

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

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

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性副生殖器の発生歪曲の
分子機序に関する研究

分担研究者 鈴木 勝士 日本獣医畜産大学教授

研究要旨

TCDD の妊娠中期のラットへの 1 回暴露が、雄の出生児の副生殖器、精子産生に影響を及ぼすとの Wilker ら(1996)の報告について、ラットの系統を変えて再現性が見られるか否か追試した。設定された 0, 1, 2, または $4\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量の内、最高用量では胎児の生存性と分娩に悪影響が見られた。哺育中、および育成期に及んで投与群の動物は体重増加抑制を示し、その影響は雌の方が強かった。1, または $2\mu\text{g}/\text{kg}$ を子宮内暴露された、雄ラットは成熟後生殖器の重量に用量相関的な減少を示し、インタクトな発情雌と同居すると対照ラットより著しく多い交尾行動を示すが、射精はまれにしか起こらず、射精したとしても雌を妊娠させることができず、妊孕能を喪失した。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。今後、子宮内暴露以後の副生殖器で起こる発生遺伝的修飾について明らかにする必要がある。

A. 研究目的

妊娠 15 日の母ラットに 2,3,7,8-テトラクロロ-p-ダイオキシン(TCDD)、0, 0.5, 1.0 または $2.0\mu\text{g}/\text{kg}$ 1 回経口投与すると、 $2.0\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の雄の出生児のうち約 1/4 に精巣上体体部の欠損が生じたり、用量依存性の精巣上体重量の減少が見られたり、精子の精巣上体輸送速度が遅くなるなどの影響があると Wilker (1996)により報告されている。彼らの実験に用いた腹数が少なく、1 回の投与で顕著な子宮内暴露の影響が生じる点について再現性の点で疑問がある。この報告が事実であれば、TCDD が胎児の脱雄性化に関わるメカニズムが調べられるモデルになる可能性がある。すなわち、精巣上体の体部欠損が Ah レセプターを介する変化なのか、アンドロゲンレセプターはどのように関わるのか、アポトーシスが起こるために欠損が生じるのか、そこに至るシグナルトランスダクションの系は何かなどの点について新規の情報が得られる可能性がある。

今回は、遺伝的背景が均一と考えられる

Wistar Imamichi rat の近交系を用い、妊娠 15 日に 0, 1, 2 または $4\mu\text{g}/\text{kg}$ の TCDD を 1 回経口投与して、出産哺育させ、雄の出生児に同様な影響が生じるのか否かを確認するのが目的である。確認された場合には、前出の論文で調べられていない雄の性行動に関してどのような影響が見られるのかについて検討する。

B. 研究方法

TCDD(RADIAN Corp: lot #15091-55)の $20\mu\text{g}/\text{ml}$ (2% アセトン -コーン油溶液)を保存溶液とし、1, 2, または $4\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で、妊娠 15 日の近交系 Wistar Imamichi ラットに 1 回経口投与し、分娩させ F1 を得た。対照群には溶媒を投与した。再現性を確認する予備試験であるので、各群 3 匹の妊娠ラットを用いた。母動物については、毎日の臨床観察と妊娠 0, 7, 14, 21 日および哺育 0(分娩日), 7, 14, 21 日の体重測定を実施した。新生児については分娩日もしくは翌日出生児数、異常の有無、性別、体重を記録した。F1 動物について、生

後4日で、雄を全て残し全体で1腹10匹に調整した。F1動物の哺育中毎日臨床観察を実施し、生後0, 4, 7, 14, 21日に体重を測定した。

F1動物の離乳後、母動物を解剖し、肉眼的異常の有無、肝臓と内分泌関連臓器の摘出秤量を行った。子宮については、着床痕数を数えた。F1雌動物に関しては離乳時に剖検した。同雄については全て11週まで飼育した。10週齢で、インタクトな発情期の雌と夕方1時間同居させ、乗駕、挿入、射精など交尾行動について観察した。翌週、雄を剖検し、左精巣上体尾部から精子を採集し、活力、数、形態について観察した。肝臓と内分泌関連臓器、生殖器を摘出秤量し、精巣と精巣上体はブアン液、他は中性ホルマリンにて固定保存し、後の組織学的観察に備えた。

本実験は(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。

(倫理面への配慮)

TCDD汚染物質の拡散を防ぐため、無毒化できる消却法が開発されるまで、動物を含む汚染物を凍結保存した。

C. 研究結果

母動物に関する成績の概要を表1に示す。妊娠期間中、いずれの群もほぼ同等の体重増加を示したが、4 μ g/kg投与群では、1腹のみが生存児を出産した。同群で生存児を出産した母ラットの妊娠期間は24日まで遅延した。離乳後に剖検して調べた着床数では群間に差はなかった。平均生存出産児数は1および2 μ

g/kg群では対照と比較して差はなかったが、4 μ g/kg群では生存児を分娩した1腹で3/4匹であり、他の2腹では生存児数は確認されなかった。胎児死亡率は用量を増すに連れ上昇する傾向があった。性比には群間で差はなかった。いずれの出生児にも外表奇形は認められなかった。

最高用量群では1腹のみ哺育したが、哺育児3匹のうち2匹は生後7日から20日の間に死亡し、最終的に1匹のみ離乳まで育った。2 μ g/kg群では4日の選抜までに約15%の哺育児が死亡したがその後死亡はほとんどなかった。哺育期間中、1 μ g/kg群の雄に対照群と同等の体重増加が見られたものの、雌ではいずれの群も有意な体重増加抑制を示し、抑制の程度には用量相関関係が認められた。

母ラットの臓器重量に関して、肝臓重量の増加、下垂体重量の低下、雌性生殖器重量の増加傾向があるように見えるが、例数が少ないため断定できない。これらに関しては、現在追加実験が行われているので、それらと併せて評価する予定である。

F1雄に関する試験成績の概要を表2に示す。4 μ g/kg群の1匹については、消耗が激しく実験には用いなかったので、F1雄については、1および2 μ g/kg群の2群で構成された。2 μ g/kg群では育成中、13匹中4匹が自発運動の低下、立毛、赤色の眼脂などの症状を示し、途中で切迫屠殺した。11週齢で、インタクトで発情期の雌ラットと夕刻同居させ、交尾行動を観察した。その結果用量相関的に雌への乗駕回数の増加が観察された。対照のラットは1時間に約8回程度の乗駕を示したが、1 μ g/kg群では約74回、2 μ g/kg群では約125回と著しい増加を示した。これに反して、挿入回数は用量と逆相関的に見られたにもかかわらず、TCDD投与群の雄は、雌ラットを妊娠させることができなかった。射精回数は同様に減少し、2 μ g/kg群では射精は認められな

かった。乗駕、および挿入の潜時は回数の増加を反映して TCDD 投与群では短縮した。これらの交配の結果、交尾と射精が精巣上体尾部から得た精子数、精子活性、形態には群間差はなかった。剖検時に認められた生殖器の異常には精巣萎縮、精巣上体萎縮、精嚢萎縮、前立腺萎縮などが含まれていた。雄の生殖器重量の群間の変動は上述の表 2 に示されているが、特に焦点を合わせるべき器官なので、実重量の変化を表 3 に示しておく。その結果、精巣、精巣上体、前立腺、精嚢の重量は、用量相関的な減少を示しているように見えた。組織学的な観察の結果、精巣上体の形成不全が多数に認められた。

D. 考察

今回の近交系ウィスター今道ラットでの実験は、Wilker (1996) により報告された妊娠ラットへの TCDD (0.5, 1.0, 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$) の妊娠 15 日の 1 回投与が、子宮内暴露を受けた雄の F1 の精巣重量低下、精巣上体の萎縮等を引き起こすという成績を、同じではないが類似した変化を生じるという点で再現したと考えることができる。また、TCDD 子宮内暴露を受けた雄ラットの交尾行動ならびに妊孕能についての報告は、今回が初めてのものであり、きわめて興味深い知見が得られた。TCDD の子宮内暴露の用量が増えるにつれて、発情雌に対する乗駕行動は増えるが、挿入と射精の回数は減少し、2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群では射精しなかった。さらに、1 および 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群ともに雄は交尾した雌を妊娠させることができなかった。このことは、母親の妊娠 15 日での TCDD 1 回投与が、雄の精巣と副生殖器の低形成もしくは分化異常を引き起こすが、萎縮した精巣はなおその雄に性行動を起こすことのできるテストステロンを分泌し、かつその雄の脳については雄型に分化させることを示している。射精不能については、外部生殖器の低形成に起因する印象もあり、現在実施している追加試験の中

でさらに詳しく観察する予定である。

今回の実験では、TCDD が胎生期に分化中の生殖器あるいは副生殖器に到達しているはずであり、生後の生殖器分化に異常な運命付けをしているように見え見える。これらの詳細なメカニズムについて、Ah レセプターの活性化以降、未知の遺伝子発現があるのか、テストステロンの合成系の攪乱のために、二次的にその後の分化が影響を受けるのかなどの観点からアプローチする必要がある。

E. 結論

- 1, または 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の TCDD を妊娠 15 日に 1 回子宮内暴露された、雄ラットは成熟後生殖器の重量に用量相関的な減少を示し、インタクトな発情雌と同居すると対照ラットより著しく多い交尾行動を示すが、射精はまれにしか起こらず、射精したとしても雌を妊娠させることができず、妊孕能を喪失した。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。今後、子宮内暴露以後の副生殖器で起こる発生遺伝的修飾について明らかにする必要がある。

研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki H, Fukaya S, Saito K, and Suzuki K (2000) Mapping of a locus on rat chromosome 11 responsible for osteochondrodysplasia(ocd). Mammalian Genome (in submission)

2. Akimoto T, Suzuki H, Arai Y, Nakama K and Suzuki K (2000) A locus responsible for dominant hairless gene (Ht) is located on rat chromosome 10. Experimental Animal (accepted)

3. 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スレター、4: 2-3.

4. Suzuki H, Kokado M, Saito K, Kunieda T and Suzuki K (1999) A locus responsible for hypogonadism (hgn) Mammalian Genome 10(11):1106-1107.

5. 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.

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

2. 学会発表

1. 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ックス研究会

2. 斉藤賢一、雑賀寿和、鈴木浩悦、鈴木勝士、横山修一(1999)マイクロ波照射がウサギおよびサル之眼におよぼす影響、電気学会計測研究会 IM99-66 p39-42

3. 高橋純子、高須正規、斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士、横山修一(1999)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、電気学会計測研究会 IM99-65 p.33-37

4. 斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士、内堀雅隆、横山修一、辻 隆之(1999)先天性癲癇モデル動物(El Mouse)の睡眠時

脳波における加齢に伴う変化、第31回成長談話会大会(抄録 p22)

5. 高須正規、高橋純子、斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士(1999)El および ddY マウスの脳硬膜上からの短潜時聴覚脳幹誘発反応(ABR)の解析、第127回日本獣医学会

6. 深谷幸代、鈴木浩悦、高橋純子、丸ひろみ、井出雅子、新井豊、斉藤賢一、鈴木勝士(1999)骨軟骨形成不全症(ocd/ocd)ラットの原因遺伝子は第11染色体上に存在し D11Mgh3 と連鎖している、第127回日本獣医学会

7. 醍醐久美、鈴木浩悦、中宮英次郎、八木未央、岡田美香、新井豊、斉藤賢一、鈴木勝士(1999)ラット精巣形成不全症病因遺伝子の探索:hgn 遺伝子の雌表現型におよぼす影響の評価、第127回日本獣医学会

8. 太田千春、徳力剛、高須正規、平林美紀、鈴木浩悦、斉藤賢一、鈴木勝士(1999)腎低形成症の腎不全状態の基礎的評価、第127回日本獣医学会鈴木勝士、斉藤賢一、鈴木浩悦、新井豊、八木未央、竹中基郎(1999)鶏胚でのエストロンによる発生かく乱とエストロゲンレセプターmRNAの発現、第127回日本獣医学会

9. 鈴木浩悦、中宮英次郎、醍醐久美、岡田美香、斉藤賢一、国枝哲夫、鈴木勝士(1999)ラット精巣形成不全病因遺伝子の探索:連鎖するマーカーの整列化とマウス11番染色体上での位置の推定、第127回日本獣医学会

10. 尼崎肇、鷹栖雅峰、岩間良子、小川実幸、日比佐知子、鈴木浩悦、鈴木勝士(1999)マウス口蓋ヒダ形成過程におけるテネイシンと NCAM の発現分布、第 127 回日本獣医学会
11. Saito, K., H. Suzuki and K. Suzuki (1999) Adverse developmental effects of low intensity radio frequency radiation at 428MHz on chick embryo. 2nd joint international symposium of Congenital Anomalies in Korea. (10/1~10/2: chunchon)
12. 鈴木浩悦、斉藤賢一、国枝哲夫、鈴木勝士(1999)ラット精巣形成不全症病因遺伝子の探索、日本アンドロロジー学会
13. 鈴木勝士、斉藤賢一、鈴木浩悦、竹中基郎、八木未央(1999)鶏胚でのエストロゲンレセプター mRNA の発現とエストロンによる発生かく乱、第 39 回日本先天異常学会
14. 斉藤賢一、醍醐久美、横山修一、鈴木浩悦、鈴木勝士(1999)直流磁場照射のマウス胎子におよぼす影響、第 39 回日本先天異常学会
15. 小川実幸、尼崎肇、鷹栖雅峰、岩間良子、日比佐知子、鈴木浩悦、鈴木勝士(1999)B. 研究方法マウス口蓋ヒダ形成過程にみられる上皮細胞の増殖とアポトーシス、第 2 回日本組織工学会
16. 鈴木浩悦、斉藤賢一、国枝哲夫、鈴木勝士(1999)ラットの第 10 染色体上に存在する精巣形成不全症病因遺伝子の探索：高度に連鎖するマーカーの検索とマウス第 11 染色体上での位置の推定、第 46 回日本実験動物学会
17. 中宮英次郎、鈴木浩悦、醍醐久美、八木美央、平林美紀、斉藤賢一、鈴木勝士(1999)ラット 10 番染色体上に存在する精巣形成不全症病因遺伝子の探索：病因遺伝子周辺のマップ作成、第 126 回日本獣医学会
18. 松倉克仁、鷺巣 誠、倉繁裕美、尼崎肇、中條真二郎、清水一政、浦川紀元、鈴木勝士(1999)犬糸状虫感染犬の肺動脈病変形成に対するアンギオテンシン変換酵素阻害薬およびアンギオテンシン・受容体拮抗薬の効果、第 126 回日本獣医学会
19. 岩間良子、小川実幸、日比佐知子、尼崎肇、鷹栖雅峰、福島正則、鈴木浩悦、鈴木勝士(1999)マウス口蓋ヒダ形成過程における上皮プラコード領域での上皮細胞の増殖と移動、第 126 回日本獣医学会
20. 高橋純子、高須正規、斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士(1999)マウスの脳硬膜上からの聴覚脳幹誘発電位、ME とバイオサイバネティクス研究会、信学技報 Technical Report of IEICE, MEB98-126
- 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

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

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
～変異型 Ras 導入細胞に対する作用特性～

分担研究者 佐井 君江 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

研究要旨

TCDD 類の発がんプロモーター作用機構説明の一環として、TCDD による肝培養細胞株の GJIC 阻害性・細胞増殖を指標に、本年度は、GJIC 阻害における Ras 蛋白の関与、ならびに変異型 ras 導入細胞におけるそれらの増強性を検討した。野生型細胞では TCDD により一過性の GJIC 阻害が起こり、その後 Ras の誘導と関連した細胞増殖が引き続いた。変異型 ras 導入細胞は、元来 GJIC が低く、TCDD により著しい細胞増殖が起きた。このことから、TCDD による増殖シグナルは、ras の活性化と GJ 機能の低下した細胞において、特に増強されることが示唆された。

A. 研究目的

TCDD の発がんプロモーター作用機構の理解の上で、GJIC 阻害機構の解析が有効であると考えられる。TCDD による GJIC 阻害機構は不明であるが、TCDD には、GJIC 阻害要因となる Ras 蛋白の誘導能のあることが知られる。一方、v-Ha-ras 遺伝子導入マウス(Tg/AC)は、TCDD による皮膚発がん好発性であることが知られる。この TCDD に対する発がん高感受性には、①Ras 蛋白の活性化による GJIC の低下、②TCDD による GJIC 阻害の増強、③引き続く細胞増殖の亢進が、この現象の要因として関与している可能性が考えられる。

そこで、本研究では、上記の仮説をラット肝培養細胞株を用いた invitro 培養系で検討する。すなわち、変異型 ras 導入細胞では TCDD による GJIC 阻害ならびに細胞増殖作用が、野生型細胞に比較し増強されることを明らかとする。

B. 研究方法

ラット肝由来の細胞株(WB細胞)を野生

型細胞として用いた。変異型 ras 導入細胞としては、v-Ha-ras を導入した WB 細胞株(WB-RAS2a細胞)の培養過程で得られた、表現系の変化した(spindle型)細胞株(以下、WB-RASと略する)を用いた。それぞれの細胞を5%ウシ胎児血清存在下でconfluentまで培養後、TCDD(～10 μM)を添加し、72時間後までのGJIC(scrape loading/dye transfer assay; SL/DT法)、細胞増殖(DNA content)、pan-Rasの誘導(Western blotting)、MAPK(Erk)活性(Western blotting)について解析した。

C. 研究結果

実験1. TCDDによるWB細胞のGJIC阻害と細胞増殖

変異型 ras 導入細胞との比較における基礎データとして、野生型細胞の GJIC 及び細胞増殖に対する TCDD の作用様式を検討した。ここでは特に Ras 蛋白誘導性との関連に着目した。