

ダイオキシン類の生殖・発生毒性に関する評価に関する研究

分担研究者 江馬 眞 国立医薬品食品衛生研究所大阪支所 生物試験部室長
協力研究者 原園 景 国立医薬品食品衛生研究所大阪支所 生物試験部

研究要旨

生殖発生毒性においては、TCDDの投与により高用量でラット、マウスで口蓋裂や水腎症が誘発される。母動物よりも胎児及び出生後の児動物への影響が強く、ラットでの繁殖性試験で、次世代以降に受胎率の低下が認められる。また、母ラットにTCDDを投与した場合の児動物における精子数の減少などが見られるが、わが国での追試では再現性は認められていない。妊娠15日に母ラットに投与した場合の児動物における雌性生殖器の形態異常が、172 ng/kgの体内負荷量から認められている。アカゲザルを用いた実験では、母動物にTCDDを4年間投与後、10年後に子宮内膜症を誘発し、また、交配前7または26ヶ月前から離乳期(出生後4ヶ月)まで母動物に投与した場合の児動物には、学習能力の低下が観察されている。これらの実験から投与終了後の体内負荷量はそれぞれ69と42 ng/kgとなる。しかし、本実験には科学的に見て不確定要素があり、絶対的数値として採用することは困難である。

A. 序

TCDD類の消失半減期ラットで約24日であるのに対してヒトは約8年と、ヒトと動物との間にはTCDD類の消失半減期に大きな差がある。従って、同じ量のTCDDを摂取しても、体内における蓄積量には大きな差が生じる。一方、多くの化学物質の毒性は投与量と毒性との関係よりも、毒性発現における標的部位に存在する量と毒性との間により密接な関係がある。TCDDにおいても毒性発現におけるcriticalな時期において体内に存在する量に応じて毒性が発現するものと思われる。そこで、本研究においては、実験動物におけるTCDDの毒性試験において毒性の現れた用量における体内負荷量(Body Burden)を計算するとともに、それに達するに必要なヒトにおける一日摂取量を計算し、一日耐容摂取量(TDI)設定ための材料とした。

B. 結果および考察

ダイオキシン(TCDD)の実験動物における生殖発生毒性に関する主要な論文を主要論文評

価シート(1)から(9)にまとめた。さらに、これらの論文で認められた毒性指標を表-1に要約した。

TCDDの催奇形性については、マウスでの検討がよく行われており、口蓋裂及び水腎症が誘発されることが報告されている(CourtneyとMoore, 1971; Coutureら, 1990)。また、ラットにおいて腎形成異常(CourtneyとMoore, 1971)が報告されている。

ラット3世代試験でTCDDを交配前90日から3世代を通じて混餌により与えたとき、受胎率の低下が100 ng/kg/dayでは親世代に、10 ng/kg/dayでは次世代以降に認められ、10 ng/kg/dayで同腹児数の減少、児の生後の生存率及び体重増加抑制が観察されている

(Murrayら, 1978)。TCDDの胚致死作用は投与時期に依存し、マウスでは妊娠6日の投与に顕著に発現する(Coutureら, 1990)。また、母動物へのTCDD投与による児動物の生殖への影響も観察されている。

妊娠15日のラットにTCDDを単回経口投与

したとき、64 ng/kg/day で雄児動物において精巣上体重量 及び精巣上体における精子数の減少 (Mably ら、1992a)、性行動の脱雄性化及び雌性化現象が観察され (Mably ら、1992b)、200 ng/kg/day で雌児動物において生殖器の形態異常 (陰核裂・膣糸形成) が認められている (Gray ら、1997b)。1000 ng/kg/day で生児分娩率の低下が認められている (Gray ら、1995a) が、これ未満の投与量では生殖能に対する影響は観察されていない。環境研究所の実験ではラットの妊娠 15 日に 800 ng/kg までの TCDD を投与したときには 1 日当たり精子産生数及び精巣重量に対する影響は観察されず、50 ng/kg の投与でオス児の肛門生殖突起間距離の短縮がみとめられている (Ohsako ら、1999)。ラットの交配前 2 週から交配中、妊娠中及び授乳中を通じて TCDD を皮下投与 (25 ng/kg/day を初回投与し、その後 5 ng/kg/week を投与 : 0.8 ng/kg/day に相当) したとき、児動物における肝臓及び精巣中の TCDD 濃度はそれぞれ 0.24 及び 0.25 ng/g であり、精巣上体の精子数及び 1 日当たりの精子産生数の減少、異常精子数増加、性行動の変化が観察されている (Faqi ら、1998)。このように、母動物への TCDD 投与による毒性は児動物の雄生殖器系により強く発現し、精巣上体における精子数の減少はマウス (Theobald と Peterson、1997) 及びハムスター (Gray ら、1995a) においても観察されている。

5 ppt の TCDD を含む飼料で 4 年間飼育したアカゲザルでは、その 10 年後に子宮内膜症を誘発することが報告されている (Rier ら、1993)。この実験では飼育条件等の技術面における不備が指摘されている。5 ppt の TCDD を含む飼料を交配前 7 または 26 ヶ月間、妊娠中及び授乳中に与えた母ザルから得た児動物において学習能力の低下が観察されている (Schantz と Bowman、1989)。この影響は訓練のより回復可能な軽度なものと考えられ、神経化学的、組織学的検索は実施されていない。

以上のように、TCDD の生殖発生毒性は母動

物よりも胎児及び出生後の児動物への影響が強く現れ、妊娠中及び授乳中の投与により成熟動物では予見できない毒性が発現する。サルを用いて行われた二つの実験については、技術面の不備による不確実性を伴っているため、絶対的な評価を与える資料として採用することは困難と考えられる。最少の投与量で認められた影響は精巣中の精子細胞数の減少である (Faqi ら、1998) が、TCDD の精子に対する影響は各々の実験によって結果が異なり、また、他のオス生殖器系に対する影響についても暴露レベルと影響発現との関係がそれぞれの実験によって異なっている。低投与量でのオス生殖器に対する影響についてはそれらの毒性学的意義を含めて、さらに調査研究を進めることが重要である。

C. 参考文献

- Bjerke DL, Peterson RE (1994) Reproductive toxicity of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male rats: Different effects of in utero versus lactational exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 127, 241-249.
- Couture LA, Harris MW, Birnbaum LS (1990) Characterization of the peak period of sensitivity for the induction of hydronephrosis in C57BL/6N mice following exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 15, 142-150
- Courtney KD, Moore JA (1971) Teratology studies with 2, 4, 5-trichlorophenoxyacetic acid and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 20, 396-403
- Faqi AS, Dalsenter PR, Merker HJ, Chahoud I (1998) Reproductive

- toxicity and tissue concentrations of low doses of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male offspring rats exposed throughout pregnancy and lactation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 150, 383-392
- Gray LE Jr, Kelce WR, Monosson E, Ostby JS, Birnbaum LS (1995a) Exposure to TCDD during development permanently alters reproductive function in male Long Evans rats and hamsters: Reduced ejaculated and epididymal sperm numbers and sex accessory gland weights in offspring with normal androgenic status. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 131, 108-118
- Gray LE Jr, Kelce WR, Monosson E, Ostby JS, Birnbaum LS (1995b) Exposure to TCDD during development permanently alters reproductive function in male Long Evans rats and hamsters: Reduced ejaculated and epididymal sperm numbers and sex accessory gland weights in offspring with normal androgenic status. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 131, 108-118
- Gray LE Jr, Ostby JS (1995) In utero 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters reproductive morphology and function in female offspring. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 131, 285-294
- Gray LE Jr, Ostby JS, Kelce WR (1997a) A dose-response analysis of the reproductive effects of a single gestational dose of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male Long Evans hooded rat offspring. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 146, 11-20
- Gray LE Jr, Wolf C, Mann P, Ostby JS (1997b) In utero exposure to low doses of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters reproductive development of female Long Evans hooded rat offspring. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 146, 237-244
- Mably TA, Moore RW, Peterson RE (1992a) In utero and lactational exposure of male rats to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 1. Effects on androgenic status. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 114, 97-107
- Mably TA, Moore RW, Goy RW, Peterson RE (1992b) In utero and lactational exposure of male rats to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 2. Effects on Sexual behavior and the regulation of luteinizing hormones secretion in adulthood. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 114, 108-117
- Mably TA, Bjerke DL, Moore RW, Gendron-Fitzpatrick A, Peterson RE (1992c) In utero and lactational exposure of male rats to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 3. Effects on spermatogenesis and reproductive capability. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 114, 118-126
- Murray FJ, Smith FA, Nitschke KD, Humiston CG, Kociba RJ, Schwetz BA (1979) Three-generation reproduction study of rats given 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in the diet. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 50, 241-252

- Ohsako S, Miyabara Y, Sakaue M,
Kurosawa S, Nishimura N, Aoki Y,
Tohyama C, Sone H, Ishizuka M,
Jana NR, Sarkar S, Yonemoto J
(1999) Effects of 2, 3, 7,
8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
(TCDD) on the development of male
reproductive organs in the rats.
Organohalogen Compounds, 42,
19-21.
- Rier SE, Martin DC, Bowman RE, Dmowski,
WP, Becker JL (1993) Endometriosis
in rhesus monkeys (*Macaca
mulatta*) following chronic exposure
to 2, 3, 7,
8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin.
Fundam Appl. Toxicol., 21, 433-441
- Schantz SL, Bowman RE (1989) Learning
in monkeys exposed perinatally to 2,
3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
(TCDD). Neurotoxicol. Teratol., 11,
13-19
- Theobald HM, Peterson RE (1997) In utero
and lactational exposure to 2, 3, 7,
8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin:
Effects on development of the male
and female reproductive system of
the mouse. Toxicol. Appl.
Pharmacol., 145, 124-135

D. 研究業績

中央環境審議会、生活環境審議会、食品衛生調
査会（平成11年6月）：ダイオキシンの
耐容一日摂取量（TDI）について

表-1 ダイオキシンの実験動物における生殖発生毒性

反復投与			
5ppt diet (0.126 ng/kg/day, po に相当) 交配前7または26カ月から離乳まで	アカゲザル	児動物学習能低下	Schantz & Bowman 1989
5 ppt diet (0.126 ng/kg/day, po に相当) 4年間 25 ppt diet (0.63 ng/kg/day, po に相当)	アカゲサル	子宮内膜症 出生児死亡率増加	Rier et al. 1993
25 ng/kg/week その後 5 ng/kg/week, sc 交配前2週から離乳まで (0.8 ng/kg/day に相当)	ラット	1日精子産生数減少 (児動物)	Faqi et al. 1998
ラット妊娠15日に1回経口投与			
50 ng/kg	児開眼促進 オス児 AGD 短縮		Gray et al. 1997a Ohsako et al. 1999
64 ng/kg	オス児：挿入までの時間延長 精巣上体及び精巣上体尾重量低下、1日精子産生数及び精巣上体尾精子数減少		Mably et al. 1992b Mably et al. 1992c
160 ng/kg	オス児：AGD短縮、精巣下降遅延、精囊重量及び腹部前立腺重量低下 マウント及び射精までの時延長、交尾率低下		Mably et al. 1992a Mably et al. 1992b
200 ng/kg	オス児：包皮分離遅延、陰茎龟头重量低下、精巣上体精子数及び精巣上体尾精子数減少、メス児：泌尿生殖器形態異常 (Vaginal thread, Cleft phallus, Urethral slit 延長等)		Gray et al. 1997ab
400 ng/kg	出生児体重増加抑制、LH 分泌変化		Mably et al. 1992ab
800 ng/kg	児生存率低下、下垂体重量低下、射精精子数減少 メス児：膈開口遅延、妊娠成立までの日数延長 800ng/kg まで1日精子産生数及び精巣上体精子数に影響なし		Gray et al. 1997a Gray et al. 1997b Ohsako et al. 1999
1000 ng/kg	生児分娩率低下 マウント回数増加、精巣重量低下、交配メスの着床数減少 血漿テストステロン低下		Mably et al. 1992a Gray et al. 1995a Bjerke&Peterson 1994

主要論文評価シート (1)

1. Mably, T. A., Moore, R. W., Peterson, R. E. (1992a). In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 1. Effects on androgenic status *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 114, 97-107.

2. 方法

動物種 Holtzman ラット

実験 1.

動物数 1 群 12-20 匹

投与量 1000 ng/kg

投与方法 経口投与

投与期間 妊娠 15 日、単回投与

観察 妊娠 17-21 日の雄胎児、生後 0-5 日の雄新生児

実験 2.

動物数 1 群 9 匹

投与量 64, 160, 400, 1000 ng/kg

投与方法 経口投与

投与期間 妊娠 15 日、単回投与

観察 生後 32, 49, 63, 120 日齢の雄児

3. 論文内容の概要

実験 1.

妊娠 20、21 日における胎児の生存率の減少、新生児の生存率の減少
0-5 日齢での雄新生児の平均体重の減少

妊娠 18-21 日における雄胎児のテストステロン濃度の減少

出生時のテストステロンピーク濃度の減少

5 日齢における雄新生児の肛門生殖器間距離の短縮

以上 1000 ng/kg

実験 2.

腹側前立腺重量の減少 (生後 36 日齢 64 ng/kg、生後 49 日齢 160 ng/kg、生後 63 日齢 160 ng/kg、生後 120 日齢 1000 ng/kg)

生後 1 および 4 日目の雄児の肛門生殖突起間距離の短縮 (160 ng/kg)

精嚢重量の減少 (生後 36、63 日齢 160 ng/kg、生後 49 日齢 400 ng/kg)

精巣下降遅延 (160 ng/kg)

生後 1-21 日雄児の体重の減少 (400, 1000 ng/kg)

生後 28-56 日における一日摂餌量の減少 (400, 1000 ng/kg)

開眼促進 (1000 ng/kg)

生後 32 日齢での黄体形成ホルモンの減少 (1000 ng/kg)

4. 評価

(1) 試験方法の信頼性に関する事項

単一用量の実験では1群 12-20 匹、用量依存性実験では、1群 9 匹の結果が示されており、実験方法、実験管理、統計処理等についても適切に行われていると考えられる。

(2) 実験結果の科学的評価に関する事項

肛門生殖突起間距離の短縮、精巣下降遅延、精嚢重量および腹側前立腺重量の減少には、量—反応関係が認められる。

(3) エンドポイントの毒性学的意義に関する事項

精嚢重量の減少が、120 日齢では回復しているのに、毒性学的意義については不明。

(4) その他、問題点、留意点

妊娠 17-21 日の雄胎児のテストステロン濃度が有意に減少したと記述されているが、図では、妊娠 17 日では差がないように見える。(1000 ng/kg)

5. 他の実験結果との関連

(1) データの再現性に関する事項

64 ng/kg での腹側前立腺重量の低下は一過性であった。

160 ng/kg では、肛門生殖突起間距離の短縮、精嚢重量の減少、精巣下降遅延が認められる。

(2) 体内負荷量の算出に関する事項

Mably (1992b,c) と同一実験

6. 総合評価

LOAEL : 64 ng/kg (前立腺)

体内負荷量 : 55 ng/kg

7. その他特記すべき事項

なし

FIG. 5. Effects of *in utero* and lactational TCDD exposure on AGD (top), CRL (middle), and AGD/CRL (bottom) of male (circle) and female (diamond) rats on postnatal Days 1 and 4. Pregnant rats were given graded doses of TCDD (solid symbols) or vehicle (open symbols) on Day 15 of gestation. Each point is the mean \pm SE of the litter mean for nine litters. *Significantly different from control; $p < 0.05$.

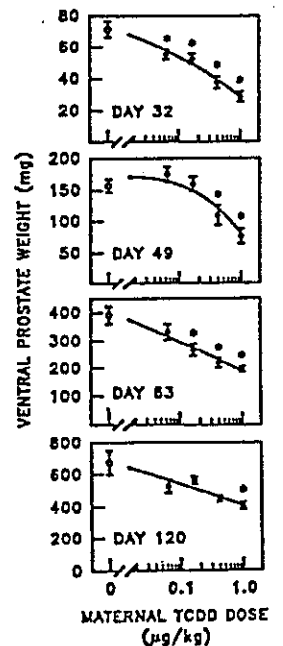
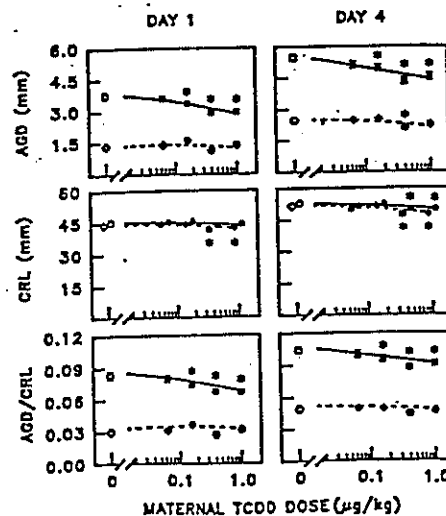


FIG. 7. Effects of *in utero* and lactational TCDD exposure on ventral prostate weights of juvenile, pubertal, postpubertal, and sexually mature male rats. Pregnant rats were given graded doses of TCDD (●) or vehicle (○) on Day 15 of gestation. Each point is the mean \pm SE of male offspring from nine different litters (one male/litter). Note that ordinate scales are different for each panel. *Significantly different from control; $p < 0.05$.

作成者 原園 景、江馬 眞

主要論文評価シート (2)

1. Mably, T. A., Moore, R. W., Goy, R. W., Peterson, R. E. (1992b). In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 2. Effects on sexual behavior and the regulation of luteinizing hormone secretion in adulthood. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 114, 108-117.

2. 方法

動物種 Holtzman ラット

実験 1.

動物数 1 群 9 匹

投与量 64, 160, 400, 1000 ng/kg

投与方法 経口投与

投与期間 妊娠 15 日、単回投与

観察 生後 56-63、70-77、112-119 日齢での雄の雄性性行動及

び

その後性腺を摘出し、170-185 日齢の雄にエスラジオール、
プロゲステロンを投与したときに誘導される雌性性行動

3. 論文内容の概要

○雄性性行動に対する影響

挿入までの時間の延長 (64 ng/kg)

射精までのマウント回数の増加 (64 ng/kg 112-119 日齢のみ) (テストを繰り返すと減少していく、特にコントロール。統計的に不安定)

マウントまでの時間の延長 (160 ng/kg)

射精までの時間の延長 (160 ng/kg)

一分当たりの交接回数の減少 (160 ng/kg)

射精までの挿入回数の増加 (1000 ng/kg 70-77 日齢のみ)

射精から次の挿入までの時間の増加 (1000 ng/kg 56-63 及び 70-77 日齢、400 ng/kg 112-119 日齢)

○性腺摘出雄ラットの雌性性行動誘導に対する影響

卵巣ステロイドホルモンによる黄体化ホルモン産生の誘導 (400 ng/kg)

(雌型生殖内分泌系の誘導)

4. 評価

(1) 試験方法の信頼性に関する事項

1群9匹の結果が示されており、実験方法、実験管理、統計処理等についても適切に行われていると考えられる。

(2) 実験結果の科学的評価に関する事項

マウントまでの時間の延長、射精までの時間の延長、射精までの時間の延長には、量-反応関係が認められる。

(3) エンドポイントの毒性学的意義に関する事項

マウント、挿入、射精をするまでにかかる時間、射精までのマウントおよび挿入回数の毒性学的意義については現在議論中。

(4) その他、問題点、留意点

5. 他の実験結果との関連

(1) データの再現性に関する事項

(2) 体内負荷量の算出に関する事項

6. 総合評価

LOAEL : 64 ng/kg

体内負荷量 : 55 ng/kg

7. その他特記すべき事項

なし

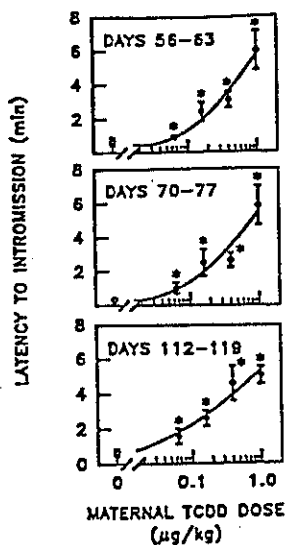


FIG. 2. Effects of *in utero* and lactational TCDD exposure on intromission latency of male rats at 56-63 (top), 70-77 (middle), and 112-119 (bottom) days of age. All other conditions are as described in the legend to Fig. 1.

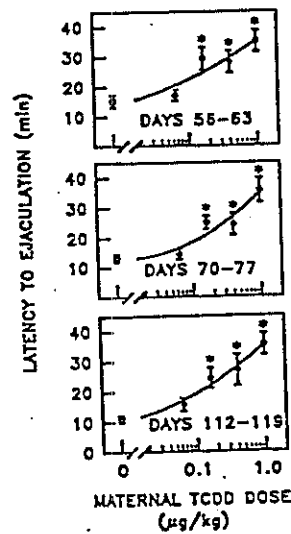


FIG. 3. Effects of *in utero* and lactational TCDD exposure on ejaculation latency of male rats at 56-63 (top), 70-77 (middle), and 112-119 (bottom) days of age. All other conditions are as described in the legend to Fig. 1.

作成者 原園 景、江馬 眞

主要論文評価シート (3)

1. Mably, T. A., Bjerke, D. L., Moore, R. W., Gendron-Fitzpatrick, A. and Peterson, R. E. (1992c). *In utero* and lactational exposure of male rats to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzeno-p-dioxin. 3. Effects of spermatogenesis and reproductive capability. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 114, 118-126.

2. 方法

動物種	Holtzman ラット
動物数	9 匹 (妊娠ラット) / 群
投与量	0, 64, 160, 400 or 1000 ng/kg in corn oil/acetone, 19:1, v/v (2 ml/kg)
投与日	妊娠 15 日に 1 回経口投与
観察	オス児 (離乳後個別飼育) 生後 32, 49, 63 or 120 日に litter 当たり 1 匹のオス児を剖検

3. 論文内容の概要

1 日精子産生数 (精巣の精子細胞数) 及び精巣上体尾部精子数減少、精巣上体及び精巣上体尾部重量低下 (64 ng/kg 以上)
オス児の生殖能及び次々世代の生存・成長には影響なし。

4. 評価

(1) 試験方法の信頼性に関する事項

1 群 7-9 例の観察結果であり、若干例数が少ないと考えられるが、実験方法、実験管理、統計処理等について適切に行われていると考えられる。

(2) 実験結果の科学的評価に関する事項

1 日精子産生数及び精巣上体尾部精子数減少、精巣上体及び精巣上体尾部重量低下には、投与量-反応関係が認められる。

(3) エンドポイントの毒性学的意義に関する事項

生殖器及び副生殖器重量、精子数減少の毒性学的意義については現在議論中。

(4) その他、問題点、留意点

5. 他の実験結果との関連

(1) データの再現性に関する事項

1 日精子産生数は、0.8 ng/kg 以上 (Faqi et al., 19998) 及び 800 ng/kg (Gray et al., 1997a) で観察されている。精巣上体尾部の精子数減少は 200 ng/kg 以上 (Gray et al., 1997a) で観察されている。しかし、Ohsako et al. (1999) は 800 ng/kg でも精子数への影響は認められなかったとしている。また、ラット、マウス、ハムスターで共通してみられる生殖のエンドポイント

、ハムスターで共通してみられる生殖のエンドポイントは精巣上体精子数の減少であり (Theobald and Peterson, 1997)、Gray et al. (1995a)は精巣の精子産生は TCDD の影響を受け難いと述べている。

(2) 体内負荷量の算出に関する事項

Mably et al. (1992abc)とは同じ実験である。

Gray et al. (1995ab, 1997ab)とは投与日が同じである。

6. 総合評価

LOAEL: 64 ng/kg (1日精子産生数及び精巣上体尾部精子数減少、精巣上体及び精巣上体尾部重量低下)

LOAEL に対応する体内負荷量: 55 ng/kg

7. その他特記すべき事項

なし

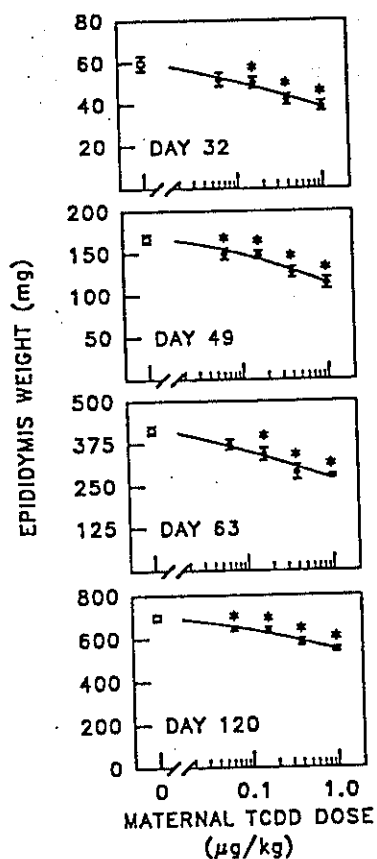


FIG. 2. Effects of *in utero* and lactational TCDD exposure on right epididymis weights of juvenile (32-day-old), pubertal (49-day-old), postpubertal (63-day-old), and sexually mature (120-day-old) male rats. Note that the ordinate scales are different for each panel. All other conditions are as described in the legend to Fig. 1.

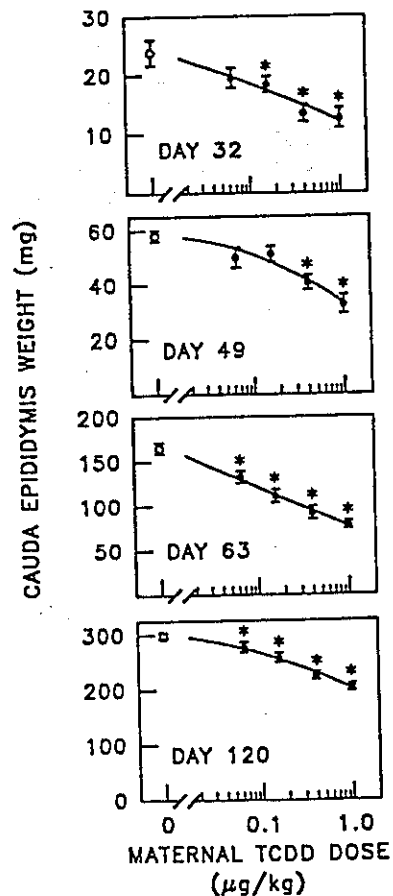


FIG. 3. Effects of *in utero* and lactational TCDD exposure on right cauda epididymis weights in juvenile (32-day-old), pubertal (49-day-old), postpubertal (63-day-old), and sexually mature (120-day-old) male rats. Note that the ordinate scales are different for each panel. All other conditions are as described in the legend to Fig. 1.

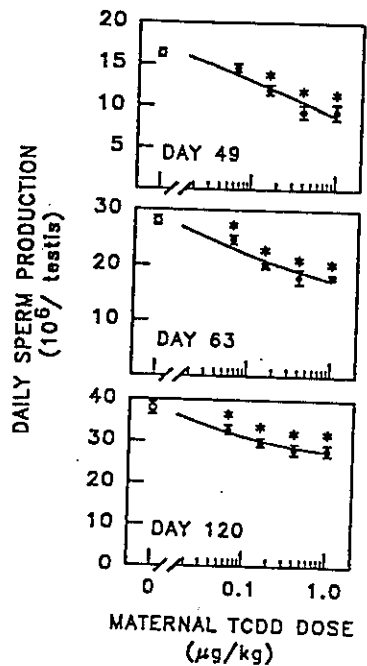


FIG. 4. Effects of *in utero* and lactational TCDD exposure on daily sperm production per right testis in pubertal (49-day-old), postpubertal (63-day-old), and sexually mature (120-day-old) male rats. Note that the ordinate scales are different for each panel. All other conditions are as described in the legend to Fig. 1.

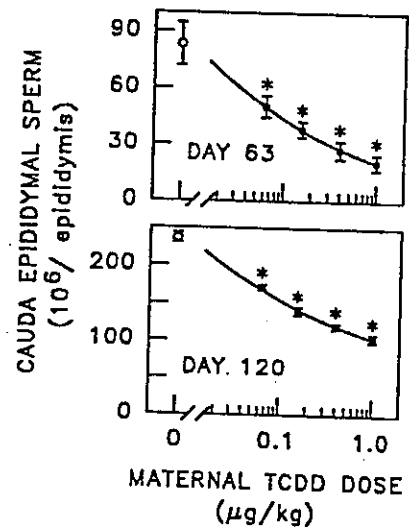


FIG. 5. Effects of *in utero* and lactational TCDD exposure on right cauda epididymal sperm numbers in postpubertal (63-day-old) and sexually mature (120-day-old) male rats. Note that the ordinate scales are different for each panel. All other conditions are as described in the legend to Fig. 1.

主要論文評価シート (4)

1. Rier, S. E., Martin, D. C., Bowman, R. E., Dmowski, W. P. and Becker, J. L. (1993). Endometriosis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following chronic exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzeno-*p*-dioxin. *Fundam. Appl. Toxicol.* **21**, 433-441.

2. 方法

動物種	アカゲザル
動物数	8 匹 / 群
投与量	0, 5 or 25 ppt (0, 126 or 630 pg/kg/day に相当)
投与日	4 年間
投与方法	混餌投与
観察	投与終了から 10 年後 (生存していた 17 例及び途中死亡で子宮内膜症の 3 例についての観察)

3. 論文内容の概要

子宮内膜症発症率：33% (対照群)、71% (5 ppt)、86% (25 ppt)
子宮内膜症の重篤度は投与量に応じて上昇。

4. 評価

(1) 試験方法の信頼性に関する事項

アカゲザルでは子宮内膜症の自然発症率が高い (304 例中 30%)。
実験例が少ない (実験成績は、対照群：6 例、5 ppt 群：7 例、25 ppt 群：7 例、で集計されている)
飼育管理が十分でない。

(2) 実験結果の科学的評価に関する事項

投与終了から 10 年間の飼育条件が不明。
25 ppt 投与群では 2 種類の異なった処置を受けたサルが含まれているが、これに関する記載がない。
統計処理に一貫性を欠く。
等の科学的に不確実な要素がある。

(3) エンドポイントの毒性学的意義に関する事項

TCDD 由来の影響は無視できない。

(4) その他、問題点、留意点

特になし。

5. 他の実験結果との関連

(1) データの再現性に関する事項

(2) 体内負荷量の算出に関する事項

Schantz and Bowman (1989)のアカゲザルの学習実験と投与量、投与方法は同じ。

6. 総合評価

LOAEL: 5 ppt (126 ng/kg/day) (子宮内膜症)

LOAEL に対応する体内負荷量: 40 ng/kg

7. その他特記すべき事項

なし

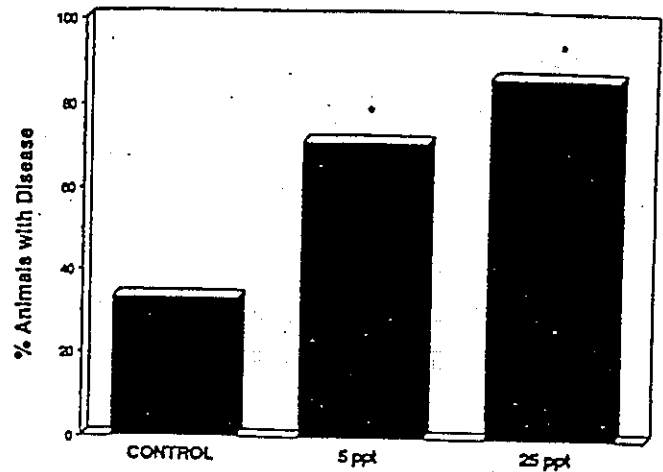


FIG. 1. Incidence of endometriosis in dioxin-exposed rhesus monkeys. Disease was evaluated at the time of diagnostic laparoscopy ($n = 17$) or from autopsy notes ($n = 3$). χ^2 analysis demonstrated significant differences between groups in absolute percentages of animals exhibiting endometriosis. * $p < 0.17$, comparing control and 5 ppt animals. ** $p < 0.05$, comparing control and 25 ppt animals.

TABLE 2
Severity of Endometriosis in Dioxin-Treated Rhesus Monkeys^a

Group	Acosta				AFS					rAFS ^{b,c}				
	None	Mild	Moderate	Severe	None	I	II	III	IV	None	I	II	III	IV
Control	4	1	1	0	4	2	0	0	0	4	2	0	0	0
5 ppt	2	0	2	3	2	2	0	3	0	2	2	0	2	1 ^d
25 ppt	1	0	0	6	1	0	1	3	2	1	0	1	1	4 ^e

^a Severity of disease was assessed according to the Acosta, AFS, and rAFS classification systems.
^b Data were analyzed according to the rAFS classification system.
^c $p < 0.001$, 5 and 25 ppt animals compared with corresponding values for control animal group.
^d $p < 0.05$, 5 ppt animals compared with corresponding values for control animal group.
^e $p < 0.025$, 25 ppt animals compared with corresponding values for 5 ppt animal group.

主要論文評価シート (5)

1. Gray, L. E., Jr., Kelce, W. R., Monosson, E., Ostby, J. S. and Birnbaum, L. S. (1995a). Exposure to TCDD during development permanently alters reproductive function in male Long Evans rats and hamsters: Reduced ejaculated and epididymal sperm numbers and sex accessory gland weights in offspring with normal androgenic status. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131, 108-118.

2. 方法

動物種	Long Evans ラット
動物数	8 匹 (F ₀ メスラット) / 群
投与量	1000 ng/kg in corn oil (2.5 ml/kg)
投与日	妊娠 8 日または妊娠 15 日に 1 回経口投与
動物種	シリアンハムスター
動物数	4 匹 (F ₀ メスラット) / 群
投与量	2000 ng/kg in corn oil (5 ml/kg)
投与日	妊娠 11 日 (ラットの妊娠 15 日に相当) に 1 回経口
観察	オス児

3. 論文内容の概要

LE ラット

妊娠 15 日投与：精巢上体尾部精子数減少、射精精子数減少、肛門生殖突起間距離の短縮、包皮分離遅延、精巢・精巢上体尾部重量低下、体重増加抑制、交配メスの着床数減少、マウント数増加、射精までの時間延長

妊娠 8 日投与：射精精子数減少、包皮分離遅延、体重増加抑制

シリアンハムスター

精巢上体尾部精子数減少、射精精子数減少、包皮分離遅延、精巢・精巢上体尾部重量低下

4. 評価

(1) 試験方法の信頼性に関する事項

群当たりの Fo メスが少数であるが、本実験で観察された所見は Gray et al. (1997a) の実験で確かめられている。実験方法、実験管理、統計処理等についても適切に行われていると考えられる。

(2) 実験結果の科学的評価に関する事項

精子数減少の毒性学的意義については現在議論中。

(4) その他、問題点、留意点

開眼促進が観察されているが、有意差はない。

精巣の精子産生は TCDD に対して影響され難いと記述している。

5. 他の実験結果との関連

(1) データの再現性に関する事項

ラットの妊娠 15 日投与で児の開眼促進が観察されているが、有意差ない。開眼促進に関しては、妊娠 15 日の Holtzman ラット (Mably et al., 1992a) 及び LE ラット (Gray et al., 1997b) で観察されている。

(2) 体内負荷量の算出に関する事項

Gray et al. (1995b) とは同じ実験条件である。

Gray et al. (1997ab) とは同じ実験条件である。

Mably et al. (1992abc) とは投与日が同じ。

6. 総合評価

LOAEL: 1000 ng/kg (精巣上部尾部精子数減少、射精精子数減少)

LOAEL に対応する体内負荷量: 1000 ng/kg

7. その他特記すべき事項

なし

TABLE 3

Effects of Gestational TCDD to LE (GD 15 or 8) Rats at 1 µg/kg (8-11 months of age) or 140-Day-Old Syrian Hamsters (GD 11) at 2 µg/kg on Testicular and Epididymal Weight and Sperm Numbers, Ejaculated Sperm Counts, and Age at Puberty (Preputial Separation)

Species/strain, treatment	Paired testes weight (g)	Cauda epididymal weight (mg)	Testis spermatid numbers (×10 ⁶)	Cauda epididymal sperm numbers (×10 ⁶)	Ejaculated sperm count (×10 ⁶)	fmol androgen receptors/g caput epididymis	fmol androgen receptors/g cauda epididymis	Fertility: no. implants/female	Age at preputial separation (days)
Rat, control	3.96 ± 0.11	337 ± 20	240 ± 10	202 ± 13	147 ± 13	2157 ± 168	1700 ± 251	10.4 ± 2.7	40.2 ± 0.7
Rat, TCDD GD 15	3.34** ± .30	276** ± 19	189 ± 28	125*** ± 19	62*** ± 14	1750 ± 338	2256 ± 223	4.5** ± 2.8	43.8*** ± .7
Rat, TCDD GD 8	3.81 ± .08	313 ± 23	229 ± 5	166 ± 9	111* ± 14	2443 ± 212	1692 ± 490	8.6 ± 3.5	42.3** ± .8
Hamster data									
Syrian hamster, control	3.89 ± .12	430 ± 11	289 ± 19	251 ± 4	250 ± 20	—	—	—	37.3 ± 1.1
Syrian hamster, TCDD GD 11	3.35* ± .16	304*** ± 13	267 ± 16	171*** ± 16	87** ± 79	—	—	—	40.9* ± 0.8

Note. Fertility and androgen receptor levels were also measured in LE rats. Values are means ± SE. Data were analyzed using litter means. Values differ significantly from control by * $p < .05$ (one-tailed t test), ** $p < 0.05$ (two-tailed t test), or *** $p < 0.01$.

主要論文評価シート (6)

1. Gray, L. E., Jr., and Ostby, J. S. (1995). *In utero* 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzeno-*p*-dioxin (TCDD) alters reproductive morphology and function in female rat offspring. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **131**, 285-294.

2. 方法

動物種	Long Evans ラット
動物数	妊娠ラット：8 匹 (control)、4 匹 (両 TCDD 群)
投与量	1000 ng/kg in corn oil (2.5 ml/kg)
投与日	妊娠 8 日または妊娠 15 日に 1 回経口投与

動物種	Holtzman ラット
動物数	妊娠ラット：5 匹 (control)、3 匹 (TCDD 群)
投与量	1000 ng/kg in corn oil (2.5 ml/kg)
投与日	妊娠 15 日に 1 回経口

観察 メス児

3. 論文内容の概要

LE ラット

妊娠 15 日投与：cleft pallus, vaginal thread, urethral slit 延長、urethral-vagina distance 短縮、distance of urethral opening from tip of phallus 延長、膣開口遅延、肛門生殖突起間距離の短縮、

体重増加抑制、無処置オスとの交配実験（初回交配妊娠率低下、交配時の出血、マウント数増加、射精までの時間延長）

妊娠 8 日投与：cleft pallus & vaginal thread（頻度は低い）、肛門生殖突起間距離の短縮、体重増加抑制

Holtzman ラット

cleft pallus, vaginal thread, urethral slit 延長、urethral-vagina distance 短縮、distance of urethral opening from tip of phallus 延長、膣開口遅延、肛門生殖突起間距離の短縮、体重増加抑制、

4. 評価

(1) 試験方法の信頼性に関する事項

群当たりの妊娠ラットが少数であるが、本実験で観察された所見は Gray et al. (1997b) の実験で確かめられている。実験方法、実験管理、統計処理等についても適切に行われていると考えられる。

(2) 実験結果の科学的評価に関する事項

単一投与量の実験である。

(3) エンドポイントの毒性学的意義に関する事項

無処置オスとの交尾の際に、交尾困難により、妊娠率低下、挿入なしのマウント数の増加、射精までの時間の延長、膣出血頻度の上昇が認められている。cleft pallus, urethral opening の尾側へのズレはメス齧歯類の尿道下劣を示している。cleft pallus は DES, RU2858, estradiol の妊娠後期投与のラットのメス児で観察されている。

(4) その他、問題点、留意点

特になし

5. 他の実験との関連

(1) データの再現性に関する事項

Gray et al.(1995b)により、本実験の所見は再現されている。

(2) 体内負荷量の算出に関する事項

Gray et al.(1997ab, 1995a)とは同じ実験条件である。

Mably et al.(1992abc)とは投与日が同じ。

6. 総合評価

LOAEL : 1000ng/kg (メス児の生殖器形態異常)

LOAEL に対応する体内負荷量 : 1000ng/kg

7. その他特記すべき事項

なし

TABLE 2
The Effects of Gestational (GD 15 or GD 8) Administration of 1 µg TCDD/kg on Pubertal Development and Morphology of the External Genitalia of the Female Progeny

Strain of rat:	Long Evans females			Holtzman females	
	Treatment group:	GD 15 TCDD	GD 8 TCDD	Control	GD 15 TCDD
Age at vaginal opening (days)	33.1 ± 1.9 ^a	58.8 ± 5.0 ^b	33.9 ± 2.1	33.8 ± 0.7	35.2 ± 0.8 ^c
Weight at vaginal opening (g)	129.4 ± 11	137.5 ± 16	122.0 ± 14	121.3 ± 3.8	111 ± 0.46
Urethral slit (mm)	1.43 ± 0.09	3.30 ± 0.23 ^b	2.04 ± 0.19 ^a	1.76 ± 0.10	4.92 ± 0.35 ^c
Urethral-vaginal distance (mm)	11.0 ± 0.15	7.4 ± 0.44 ^b	9.5 ± 0.54 ^a	9.8 ± 0.34	3.58 ± 0.53 ^c
Distance of urethral opening from tip of phallus (mm)	0.87 ± 0.08	2.57 ± 0.28 ^b	1.41 ± 0.15	1.08 ± 0.09	4.21 ± 0.48 ^c
Percentage with vaginal "thread"	0	99.2 ± 18.8 ^b	14.4 ± 27	0	83.3 ± 16.7 ^c
Percentage of constant estrus by					
125 days	0	0	10.5		
154 days	6	14	16		
384 days	16	16	47 ^a		
480 days	53	50	79		
Pups produced by continuous breeding	30.5 ± 4.2	23.8 ± 7.0	18.8 ± 7.0		
Fertility rate					
Litter 1	82 ± 6	83 ± 17 ^a	64 ± 16		
Litter 2	78 ± 9	72 ± 15	51 ± 13 ^a		
Litter 3	76 ± 10	72 ± 15	47 ± 14 ^a		
Litter 4	61 ± 10	72 ± 15	28 ± 16 ^a		
Litter 5	61 ± 10	17 ± 17 ^a	19 ± 11 ^a		

Note. For L.E rats the data for the running wheel and continuous breeding cohorts were pooled because the cohorts did not differ from one another.

^a p < 0.05.

^b p < 0.01.

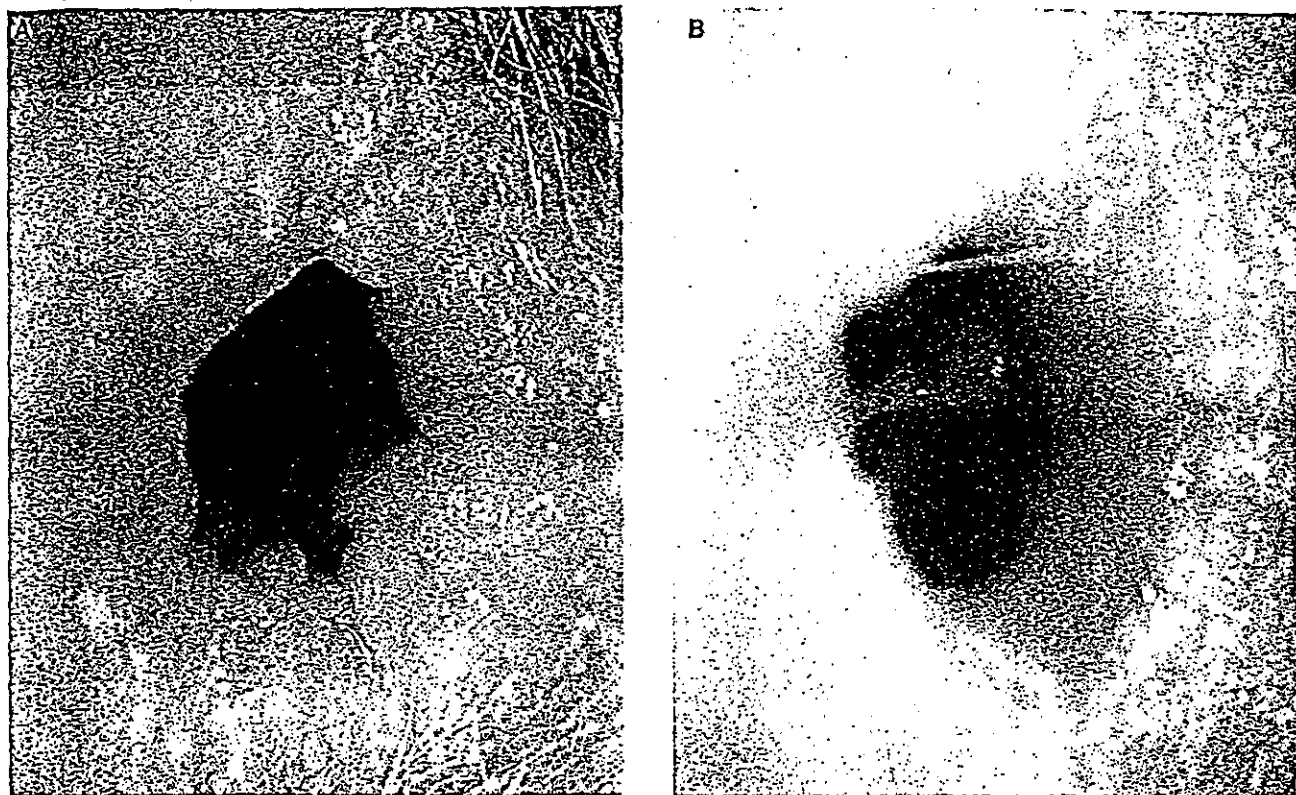


FIG. 1. Vaginal opening in an adult control female (A) compared to a female whose mother was exposed to 1 µg TCDD/kg on Gestational Day 15 (B). The treated female offspring exhibits a permanent "thread" of tissue across the vaginal orifice.

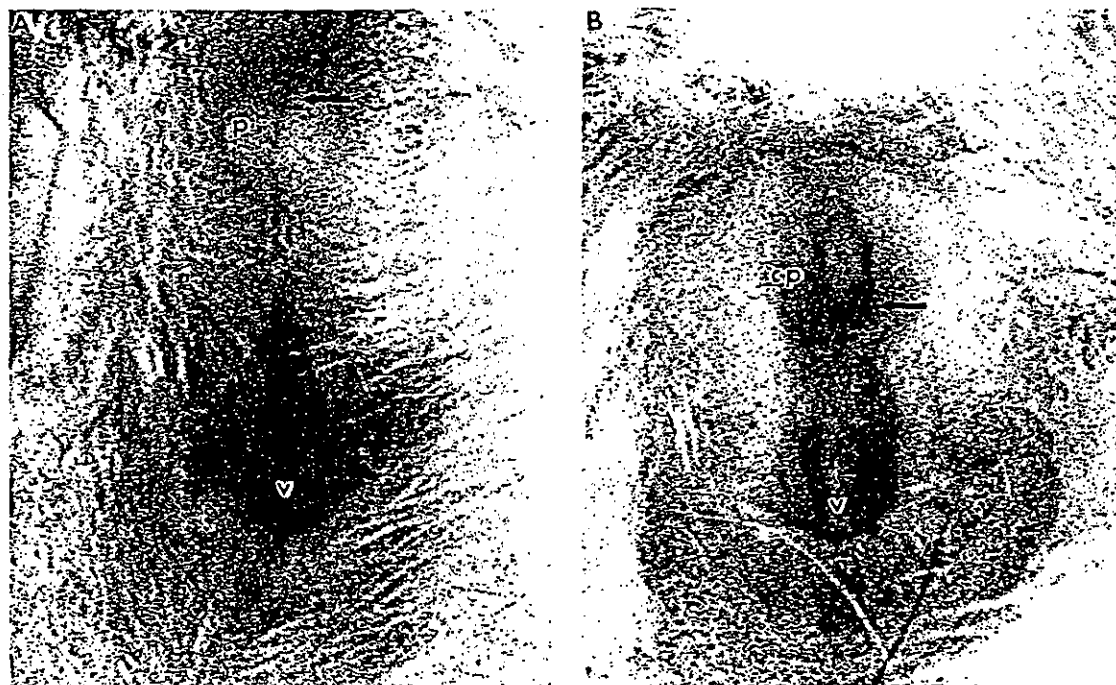


FIG. 2. The external genitalia and vaginal opening of an adult control female (A) is contrasted to the malformations displayed by a female whose mother was exposed to 1 µg TCDD/kg on Gestational Day 15 (B). In the control female rat the urethral opening (arrow) is at the tip of the phallus (p), similar to a small penis, but in female offspring, exposed to 1 µg TCDD/kg on Gestational Day 15, the urethral opening (arrow) is located near the caudal base of a cleft phallus (cp). The urethral orifice was always separate from the vaginal orifice (v). Similar malformations were seen in female offspring of dams treated with 1 µg TCDD/kg on Gestational Day 8, but the incidence and severity of these alterations was less than that seen in the group dosed on Day 15 of gestation.

作成者 江馬 眞

主要論文評価シート (7)

1. Gray, L. E., Jr., Ostby, J. S. and Kelce, W. R. (1997a). A dose-dependent analysis of the reproductive effects of a single gestational dose of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzeno-*p*-dioxin in male Long Evans hooded rat offspring. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 146, 11-20.

2. 方法

動物種	Long Evans ラット
動物数	12 匹 (F ₀ メスラット) / 群
投与量	50, 200, 800 or 1000 ng/kg in corn oil (2.5 ml/kg)
投与日	妊娠 15 日に 1 回投与
投与方法	経口投与
観察	生後 49 及び 63 日齢、15 カ月齢のオス児 (1000 ng/kg については 49 日齢のみ検査) 離乳後性別に 2-3/cage で飼育。

3. 論文内容の概要

開眼促進 (50 ng/kg 以上)

オス児包皮分離遅延、精巣上体精子数減少、陰茎亀頭重量低下、精巣上体及び精巣上体尾部精子数減少 (15 カ月齢) (200, 800 ng/kg)

精巣上体精子数減少 (49 及び 63 日齢)、精巣上体尾部精子数減少 (63 日齢)、生存率低下及び体重増加抑制、腹側前立腺及び精囊重量低下 (49 日齢)、射精精子数減少 (15 カ月齢) (800 ng/kg)

1 日精子産生数低下 (49 日齢) (1000 ng/kg)

テストステロンレベルに影響なし。

4. 評価

(1) 試験方法の信頼性に関する事項

1 群 10-12 または 15-24 例の結果が示されており、実験方法、実験管理、統計処理等についても適切に行われていると考えられる。

(2) 実験結果の科学的評価に関する事項

開眼促進、包皮分離遅延、精巣上体精子数減少、陰茎亀頭重量低下、精巣上体及び精巣上体尾部精子数減少には、量-反応関係が認められる。

(3) エンドポイントの毒性学的意義に関する事項

開眼促進の毒性学的意義については不明。

精子数減少の毒性学的意義については現在議論中。

(4) その他、問題点、留意点

15 カ月齢における射精精子数について、ABSTRACT には 50 ng/kg 以上で減少したと記述されているが、本論文の実験中で有意差が認められたのは 800 ng/kg 群だけである。50 及び 200 ng/kg 群の値に関しては Gray et al.