

の実験結果と併せて、本論文の対照群に対する%値として比較すると、50 ng/kg 以上で有意差がみられる。

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

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., 1995a) に1000 ng/kgを経口投与したときに、観察されている。Gray et al., 1995aでは有意差なし。

(2) 体内負荷量の算出に関する事項

Gray et al. (1997b)とは同じ実験である。

Gray et al. (1995ab)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: 50 ng/kg (開眼促進)

LOAELに対応する体内負荷量: 妊娠16日で31 ng/kg

妊娠21日で26 ng/kg

7. その他特記すべき事項

なし

TABLE 1
The Effects of Gestational Day 15 Administration of Low Doses of TCDD on Growth and Viability of the Offspring during Lactation

Dose of TCDD to the Dam	0.00	0.05	0.20	0.80
No. of pups: Day 0	10.3 ± 1.0	11.5 ± 0.8	11.4 ± 0.6	10.9 ± 1.0
No. of pups: Day 3	9.8 ± 1.3	11.5 ± 0.8	10.5 ± 1.1	10.5 ± 0.9
% Pup survival: Days 3 to 8	100	100	99 ± 1.1	93 ± 3.1**
% Pup survival: Days 3 to 15	99 ± 1.1	98 ± 2.5	91 ± 6.3	84 ± 5.9*
% Pup survival: Days 3 to 22	99 ± 1.1	98 ± 2.5	90 ± 6.3	82 ± 6.6*
Body weight (g): Day 0	6.48 ± 0.23	6.27 ± 0.13	6.09 ± 0.09	5.80 ± 0.28*
Body weight (g): Day 3	9.44 ± 0.21	9.69 ± 0.42	9.42 ± 0.25	8.60 ± 0.40*
Body weight (g): Day 8	20.4 ± 0.46	20.35 ± 0.61	20.1 ± 0.58	17.5 ± 1.1**
Body weight (g): Day 15	36.6 ± 1.0	36.4 ± 0.8	37.3 ± 1.3	33.4 ± 1.5
Body weight (g): Day 22	63.2 ± 1.2	63.3 ± 1.2	62.9 ± 1.5	57.8 ± 2.1*
% Eye opening: Day 12	2.3 ± 2.3	0	0	2.4 ± 1.6
% Eye opening: Day 13	5.7 ± 4.6	3.5 ± 2.0	1.7 ± 1.7	12.7 ± 6.5
% Eye opening: Day 14	21.6 ± 6.3	49.8 ± 11*	50.9 ± 11*	79 ± 6.6**
% Eye opening: Day 15	90 ± 5.6	100*	100*	99.3 ± 0.6*

Note. All values were calculated and analyzed using litter means. Shaded areas differ significantly from control.

*p < 0.05.

**p < 0.01.

主要論文評価シート (8)

1. Gray, L. E., Jr., Wolf, C., Mann, P. and Ostby, J. S. (1997b). *In utero* exposure to low doses of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzeno-*p*-dioxin alters reproductive development of female Long Evans hooded rat offspring. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **146**, 237-244.

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 or 800 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	メス児、cross-fostering 実験 (0 または 1000 ng/kg) 有り

3. 論文内容の概要

メス児生殖器形態異常 (vaginal thread, urethral slit 増大、pallus 先端一尿道口距離延長、尿道一膣口間距離短縮) (200 ng/kg 以上)
cleft pallus 増加、膣開口遅延、妊娠成立までの日数延長 (800 ng/kg)
繁殖能には影響なし。
子宮内暴露で児に vaginal thread 発現 (授乳中の暴露では発現なし)。

4. 評価

(1) 試験方法の信頼性に関する事項

vaginal thread については全メス児の検査結果、その他の生殖器異常については litter 当たり 1 例の結果が示されている。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

メス児生殖器形態異常 (vaginal thread, urethral slit 増大、pallus 先端一尿道口距離延長、尿道一膣口間距離短縮) については 200 ng/kg 以上で量-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

vaginal thread を有するメスとの交尾の際に、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 (Gray et al., 1995b)。cleft pallus, urethral opening の尾側へのズレはメス齧歯類の尿道下裂を示している。cleft pallus は DES, RU 2858, 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。

(1) データの再現性に関する事項

メス児の生殖器の形態異常 (vaginal thread, cleft phallus 等) は、妊娠 15 日の Holtzman 及び LE ラット (Gray et al., 1995b) に 1000 ng/kg を経口投与したときに観察されている。vaginal thread は組織学的検査により出生時にすでに観察される (Flaws et al., 1997)。

(2) 体内負荷量の算出に関する事項

Gray et al. (1997a) とは同じ実験である。

Gray et al. (1995ab) 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: 200 ng/kg (メス生殖器形態異常)

NOAEL: 50 ng/kg (メス生殖器形態異常)

LOAEL に対応する体内負荷量: 妊娠 16 日で 97 ng/kg

妊娠 21 日で 76 ng/kg

7. その他特記すべき事項

なし

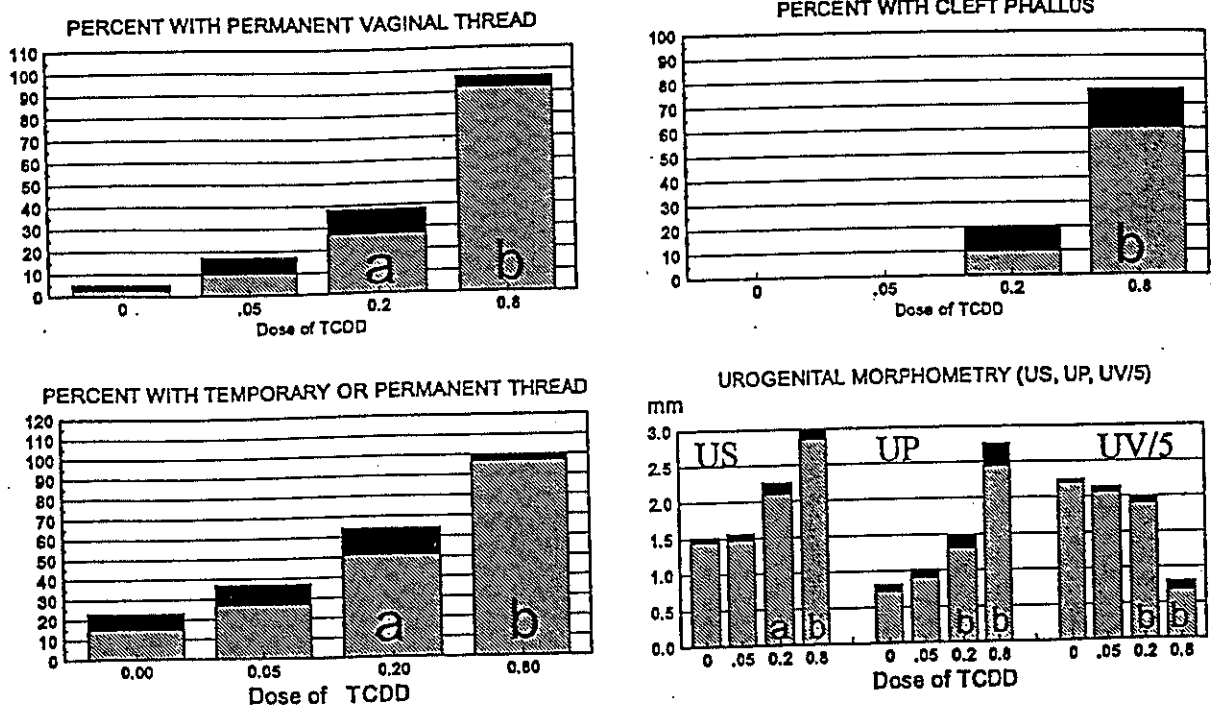


FIG. 1. Gestational Day 15 maternal administration of low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) increases the incidences of temporary and permanent vaginal threads (significant at 0.2 and 0.8 µg TCDD/kg) and cleft phallus (significant at 0.8) and alters morphometric measures of female external genitalia. US refers to the size of the urethral slit (mm), UP is the distance in mm from the tip of the phallus to the urethral opening and UV/5 is the distance in mm from the urethral to the vaginal opening (divided by 5 to allow the data to be displayed on the same scale as US and UP). Mean values are the gray columns and the standard errors are the black columns stacked on top of the gray columns. An "a" in the gray column indicates that the value differs significantly from the control value at $p < 0.05$, while "b" indicates $p < 0.01$.

TABLE 3
The Effects of Gestational Day 15 Administration of 0, 0.05, 0.20, or 0.80 mg of TCDD on Body and Organ Weights and Epididymal and Ejaculated Sperm Counts in Adult Male Offspring, Necropsied at 15 Months of Age

Dose of TCDD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.00	0.05	0.20	0.80
Body weight (g)	741 \pm 23	742 \pm 22	729 \pm 27	677 \pm 24
Testes weight (mg)	3993 \pm 76	4193 \pm 68	3770 \pm 119	4004 \pm 104
Ventral prostate weight (mg)	463 \pm 38	529 \pm 37	456 \pm 30	478 \pm 30
Seminal vesicle weight (mg)	1807 \pm 130	2001 \pm 100	1613 \pm 64	1743 \pm 79
Glans penis weight (mg)	145 \pm 2.8	141 \pm 2.1	134 \pm 3.0*	130 \pm 1.8*
Paired epididymal weight (mg)	1430 \pm 35	1440 \pm 28	1295 \pm 31*	1369 \pm 27
Cauda epididymal weight (mg)	324 \pm 15	308 \pm 7.1	281 \pm 7.6*	302 \pm 6.2
Epididymal sperm numbers $\times 10^6$	238 \pm 9.6	237 \pm 8.7	210 \pm 9.1**	208 \pm 7.8**
Caput/corpus epididymal sperm numbers $\times 10^6$	93.5 \pm 2.9	99.5 \pm 4.7	89.2 \pm 4.3	88.8 \pm 2.8
Cauda epididymal sperm numbers $\times 10^6$	144.8 \pm 8.3	137 \pm 6.2	120 \pm 8.2**	119 \pm 7.5**
Ejaculated sperm numbers $\times 10^6$	137 \pm 19	101 \pm 17	103 \pm 12	73 \pm 13*
Number of copulatory plugs	5.4 \pm 0.5	4.3 \pm 0.3	4.4 \pm 0.4	4.6 \pm 0.3
Total testis sperm numbers $\times 10^6$	256 \pm 7.6	241 \pm 14.0	247 \pm 6.7	259 \pm 8.3
Serum testosterone (ng/ml)	1.29 \pm 0.16	1.27 \pm 0.14	1.24 \pm 0.10	1.40 \pm 0.19
Pituitary weight (mg)	17.2 \pm 3.0	15.3 \pm 0.9	21.9 \pm 7.7	19.3 \pm 5.3

Note. Values in each group are litter means and SEs of 15–24 males, with 10–11 litters. Shaded areas differ significantly from control.

* $p < 0.01$.

** $p < 0.05$.

作成者 江馬 真

主要論文評価シート (9)

1. Faqi, A. S., Dalsenter, P. R., Merker, H. J. and Chahoud, I. (1998). Reproductive toxicity and tissue concentrations of low doses of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzeno-*p*-dioxin in male offspring rats exposed throughout pregnancy and lactation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 150, 383-392.

2. 方法

動物種	Wistar ラット
動物数	25 匹 (F ₀ メスラット) / 群
投与量	25, 60 or 300 ng/kg (initial loading dose) 5, 12 or 60 ng/kg/week (maintenance dose) (25/5 ng/kg は 0.8 ng/kg/day に相当)
投与期間	交配前 2 週間、交配中 (最長 14 日)、妊娠中及び授乳中
投与方法	皮下投与
観察	生後 70 及び 170 日のオス児

3. 論文内容の概要

1 日精子産生数 (精巣の精子細胞数) 70 及び 170 日齢 (25/5 ng/kg 以上で投与量に依存して低下)

精巣上体尾部精子数減少 70 日齢 (25/5, 300/60 ng/kg)
170 日齢 (25/5 nkg 以上)

テストステロンレベル低下 170 日齢 (300/60 ng/kg)

交尾行動の変化 (マウント、挿入までの時間延長) (25/5, 300/60 ng/kg)

精巣の組織学的変化 生後 70 及び 170 日齢 (300/60 ng/kg)

TCDD 濃度は生後 22 日児の肝で 0.24 (25/5 群), 0.39 (60/12 群), 1.78 (300/60 群) ng/kg、精巣で 0.25 (25/5, 60/12 群), 0.28 (300/60 群) ng/kg。肛門生殖突起間距離、精巣下降、精巣・精巣上体・前立腺及び精嚢重量、生殖能に影響なし。

4. 評価

(1) 試験方法の信頼性に関する事項

精子検査等に関しては 1 群 20 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

1 日精子産生数の減少 (生後 70 及び 170 日齢) 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

本論文に関する問題点は特にない。

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、64 ng/kg 以上 (Mably et al., 1992c) 及び 800 ng/kg (Gray et al., 1997a) で観察されているが、Ohsako et al. (1999) は 800 ng/kg でも観察さ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

ラットにおける TCDD の半減期を 3 週間として上記の投与方法を採用している。

6. 総合評価

LOAEL: 25/5 ng/kg (0.8 ng/kg/day に相当) (1日精子産生数)

LOAEL に対応する体内負荷量: 27 ng/kg

7. その他特記すべき事項

なし

TABLE 3

Effect of *In Utero* and Lactational TCDD Exposure on Sperm Number/Cauda Epididymis, Daily Sperm Production, Sperm Transit Rate, Sperm Morphology, and Serum Testosterone Concentration Investigated at Days 70 and 170 Postnatally

Parameters	Control	TCDD 25/5	TCDD 60/12	TCDD 300/60
PND 70				
Number of animals	20	20	20	20
Sperm number from cauda epididymis ($\times 10^6$)	209 \pm 43	176 \pm 38*	203 \pm 42	172 \pm 52*
Daily sperm production ($\times 10^6$)	34.4 \pm 4.3	28 \pm 5.7*	25.2 \pm 5.6*	23.1 \pm 4.9*
Sperm transit rate (days)	6.1 \pm 1.5	6.5 \pm 2.0	8.4 \pm 2.7**	7.8 \pm 3.0**
Testosterone concentration (ng/ml)	2.08 \pm 1.1	2.1 \pm 1.0	2.92 \pm 1.6	2.7 \pm 1.5
PND 170				
Number of animals	20	20	20	20
Sperm number from cauda epididymis ($\times 10^6$)	326 \pm 75	270 \pm 61*	235 \pm 44*	257 \pm 86*
Daily sperm production ($\times 10^6$)	45.6 \pm 6.2	27.5 \pm 7.2*	24.8 \pm 5.9*	23.4 \pm 5.6*
Sperm transit rate (days)	7.4 \pm 2.3	10.6 \pm 4.0**	10.0 \pm 3.6**	12.1 \pm 4.3**
Percent of abnormal sperm	7.3 \pm 2.1	10.9 \pm 3.3*	14.1 \pm 3.5*	12.4 \pm 4.2*
Testosterone concentration (ng/ml)	2.2 \pm 1.1	2.3 \pm 1.6	1.7 \pm 1.1	1.2 \pm 0.7*

Note. Values are means \pm SD. *Values are significantly decreased from control values. **Values are significantly increased from control values.

作成者 江馬 眞

厚生科学研究費補助金分担研究報告書

(ダイオキシン類の生体毒性の生化学的評価に関する研究)

平成 1 1 年度厚生科学研究費
生活安全総合研究事業

分担研究者 広瀬明彦
(国立医薬品食品衛生研究所)

ダイオキシン類の生体毒性の生化学的評価に関する研究

分担研究者 広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室 主任研究官

研究協力者 長谷川隆一 国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室長

研究協力者 黒川 雄二 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長

研究要旨

ダイオキシン類の毒性は、細胞内にあるアリール炭化水素受容体 (arylhydrocarbon receptor、以下 Ah レセプター) という蛋白を介して発現すると考えられてきた。近年 Ah レセプターを欠くマウスを用いた実験により、主な毒性である肝臓や胸腺への毒性や発生毒性が Ah レセプター依存性であることが証明されている。ダイオキシンが Ah レセプターに結合すると、さらにいくつかの蛋白と共同して、遺伝子の発現を変化させ、その結果としていろいろな毒性が引き起こされる。ダイオキシンと Ah レセプターの親和性には動物種、系統により違いがあり、ヒトのレセプターはマウスの感受性の低い系統のものに類似している。TCDD による発がん性は直接遺伝子を傷をつけることによるのではなく、発がんを促進するプロモーション作用によるとされている。この作用や、内分泌かく乱作用も Ah レセプターが仲介していると考えられている。

また、暴露評価にあたっては、ダイオキシン類 (PCDD と PCDF) およびコプラナー PCB (co-PCB) の毒性発現は共通の作用機構として Ah レセプターを介するメカニズムを想定し、それぞれの同族体の毒性強度を毒性等価係数 (TEFs: Toxicity Equivalency Factors) として表す。通常、これらの物質は混合して環境中に存在するので、その毒性の強さは各物質の TEF に存在量を乗じたものを総和した毒性等量 (TEQ : Toxic Equivalents) として表すことができる。TEF は毒性の最も強い 2,3,7,8-TCDD を 1 としたときの値で、各種の実験から長期毒性、短期毒性、in vivo および in vitro の生化学反応の順でそれらの結果を採用・比較し、設定されたものである。現在までにダイオキシン同族体についての数多くの追加研究が行われ、概ねそれぞれの同族体の TEF は適正であることが支持されており、現時点では 1997 年に WHO で再評価された最新の TEF をもとに、TEQ を算出してダイオキシン類の暴露評価に用いることが妥当であると考えられる。

A. 研究目的

ダイオキシン類の生体影響を評価するためには、その作用メカニズムを詳細に検討する必要がある。近年、特に Ah レセプターを介した作用メカニズムの解明が進んできている。これを受け、国際機関等においても、平成 9 年には、WHO 欧州事務局においてダイオキシン類の毒性評価に用いられる毒性等価係数 (TEF) の見直し (Van den Berg ら 1998)、平成 10 年

には、WHO 欧州事務局においてダイオキシンの耐容一日摂取量 (TDI) が再評価された (WHO/IPCS 1999)。我が国においても、各省庁が連携してダイオキシン類に対する総合的な調査研究を実施するとともに、厚生省と環境庁が合同で、我が国のダイオキシンの TDI の見直しに関する検討を行ったところである。本研究では、ダイオキシン類の作用メカニズムや同族体の毒性作用に焦点を絞って、ダイオキシン類の

生化学的影響に関する情報を収集し、評価することを目的としている。

B. 研究方法

本年度は、ダイオキシン類の生体影響に関する生化学的評価を行うため、ダイオキシン類の Ah レセプターを介した毒性発現に関する研究や同族体の毒性評価の基準となる TEF に関する最新の情報を収集し、整理した。

C. 研究結果と考察

(1) ダイオキシンと Ah レセプター

核内レセプターファミリーに分類される Ah レセプターを介した生体反応は、さまざまな遺伝子発現の調節に関与し、薬物や生体成分の代謝に影響を与えると共に、ダイオキシン類の毒性発症のメカニズムに深く関わっていると考えられている (Hankinson, 1995; Sogawa and Fujii-Kuriyama, 1997; Whitlock et al, 1997)。Ah レセプターは、動物に 3-メチルコラントレンやダイオキシン類などの多環芳香族化合物を投与した場合に、CYP1A1 (P450 1A1) などの薬物代謝酵素の誘導を仲介する因子であり、これらの誘導酵素遺伝子のエンハンサー部位に結合するタンパクとして同定された。また、DNA 結合の補助因子として Arnt が同定され、両因子とも MyoD や Myc などの転写調節因子と類似のモチーフ構造を持つことも明らかにされた。この Ah レセプターが結合するエンハンサー領域は XRE と呼ばれ、ダイオキシン類などのリガンドを結合した Ah レセプターと Arnt とがヘテロダイマーとなって XRE に結合し、RNA ポリメラーゼ II を含む遺伝子の転写因子を活性化して、様々な遺伝子の発現を促進する。Ah レセプターは、リガンドを結合していないときは細胞質内に存在し、HSP 90 と結合しているが、細胞内にリガンドが入ってくるとこれと結合して HSP90 を放し、核に移行することが知られている。

Ah レセプターにより誘導されることが知ら

れている遺伝子は、CYP1A1 の他に、CYP1A2、CYP2A8、UDP-グルクロニルトランスフェラーゼ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ Ya サブユニット、NAD(P)H:キノン酸化還元酵素、アルデヒド脱水素酵素など数多く知られているが、いずれの遺伝子のエンハンサープロモーター領域にも共通性がある (Kobayashi et al, 1997)。CYP1A1 などの薬物代謝酵素の誘導は、発がん過程におけるプロモーション活性と深い関わりがあることは良く知られているが、上記のような多岐にわたる遺伝子発現の誘導が、Ah レセプターを介したダイオキシン類による様々な毒性発現に寄与しているものと考えられる。また、ダイオキシン類は、TGF、Fos、Jun 等の細胞増殖制御に関わる因子の mRNA の転写活性を増加することも知られている (Hankinson, 1995)。Ah レセプターが、直接これらの増殖制御因子の転写活性化機構に関与しているかについてはいまだ明らかではないが、ダイオキシン類による発がんのプロモーション活性に一役かっているものと思われる。

このように Ah レセプターを介した毒性発現の分子生物学的メカニズムが明らかになると共に、*in vivo* における Ah レセプターを介したダイオキシン類の毒性発現メカニズムの解析も進められている。Ah レセプター遺伝子が単離される以前は、主にマウスの系統差や系統間の掛け合わせによる手法により、ダイオキシン類や多環芳香族化合物の毒性に対する感受性を解析する実験が免疫機能や発がん性に関して行われてきており (厚生省, 1996; Whitlock et al, 1997)、特にダイオキシン類による胸腺萎縮や 3-メチルコラントレンによる発がん性は、Ah レセプター依存性であることが示されている (環境庁, 1996; Whitlock et al, 1997)。このことより、TCDD と Ah レセプターの結合活性が調べられているが、解離定数の解析から親和性の強さと *in vivo* での毒性の強さに正の相関関係があることが推定された。ヒトの Ah レセプターの TCDD との親和性の強さ ($K_d=1.58\text{nM}$) は、

マウスの高親和性系統(C57BL)の解離定数(Kd=0.27nM)よりも低親和性系統(DBA/2)のそれに近い値(Kd=1.66nM)であった(Ema et al, 1994)。

また、Ah レセプターノックアウトマウスの作製が 3 つのグループによって行われ(Fernandez-Salguero et al., 1995; Schmidt et al., 1996; Mimura et al., 1997)、より直接的にダイオキシン類の毒性発現における Ah レセプター依存性に関する研究も行われている。特に、肝障害や胸腺の萎縮、マウスの口蓋裂や水腎症が、ホモ欠失マウスでは TCDD によって誘発されなくなり、明らかに Ah レセプター依存性であることが示された(Mimura et al., 1997)。さらに、ヘテロ欠失マウスの解析から胸腺萎縮と口蓋裂は Ah レセプターの発現量に依存しているが、肝障害や水腎症はヘテロ型でも野生型と同様に誘発され(Fernandez-Salguero et al, 1996)、同じ Ah レセプター依存性の毒性でもその発現メカニズムに違いのあることが推定された。

一方、ダイオキシン類による内分泌障害性については、ホルモン合成や代謝亢進、ホルモンレセプターのダウンレギュレーションを引き起こすというような 2 次的な作用のためであると説明されてきた。しかし、最近では Ah レセプターとエストロゲンやプロゲステロンレセプターによるシグナル伝達系とがクロストークを行い、直接転写レベルで相互作用していることが明らかにされてきている(Kharat and Saatcioglu, 1996; Gillesby et al, 1997a, 1997b; Kuil et al, 1998)。良く知られている抗エストロゲン作用は、エストロゲンレセプターの転写調節領域への結合を、Ah レセプター複合体が直接的に抑制していることによるものであることが判明している(Krisnam et al, 1994) (図 2)。

以上に述べてきたように、ダイオキシン類の毒性発現のほとんどが Ah レセプターと関わりがあることが明らかになってきたが、本格的な

メカニズムの解析はこれからである。ノックアウト動物を用いる手法はかなり直接的な結果を示したが、ヒトに対する毒性を研究するには、さらに詳細な Ah レセプターによる転写調節やシグナル伝達などを解析する必要がある。

(2) TEF と TEQ

PCDFs とコプラナーPCBs は、共に TCDD を代表とする PCDDs と同様の毒性を示すことが、動物実験等で示されている。短期間投与の一般毒性試験や催奇形性試験、*in vivo* や *in vitro* での酵素誘導実験などで、TCDD 同様の毒性症状や酵素誘導パターンが認められている。また、これらの毒性発現は TCDD と同様にほとんどが Ah レセプターを介しているものと考えられている。そこで、TCDD 以外の PCDDs や PCDFs、コプラナーPCBs の毒性の強さを TCDD を 1 としたときの毒性強度：TEF として示すことが、一般に広く用いられている。

相対的な毒性強度である TEF を理想的に求めるには通常、*in vivo* における長期投与毒性試験や催奇形性試験が個々のダイオキシン類で行われている必要があるが、現実には、TCDD 以外の報告は、ほとんどない。TCDD 以外の PCDDs に関する発がん性試験は、先に述べた HCDD と 2,7-DCDD の他にはない。PCBs の発がん性試験は、PCB 混合物の投与により行われているが、ほとんどの試験で PCB の組成や不純物としての PCDFs の混入に関する情報が欠落している(WHO/IPCS, 1993)。その中でも、Aroclor 1260 と Clophen A60 でのみ、げっ歯類での肝発がんが確認されている。PCDFs の発がん性試験の報告はない。生殖発生毒性に関して、PCDFs のうち 2,3,4,7,8-PeCDF が、マウスで TCDD と同様に口蓋裂等を引き起こした報告がある(WHO/IARC, 1997)。PCBs では、3,3',4,4',5,5'-HxPCB を妊娠中のラットに投与した場合に、母体及び胎仔、新生仔の甲状腺ホルモンレベルの低下が起きている(Morse et al, 1992)。その他アカゲザルを用いた実験が行わ

れており、種々の Aroclor を母体に暴露した場合に子ザルの運動亢進が、Aroclor 1254 では受胎率の低下や胎仔死亡率の増加が認められている (Arnold et al, 1995)。このように、一部の物質についての知見はあるものの、特に PCB については Aroclor 等の混合物に対する実験がほとんどで、NO(A)EL や TEF を算出できる *in vivo* のデータは少ない。

TEF は、ダイオキシン類に共通の毒性発現に際し、その第 1 段階として Ah レセプターへの結合が起きているという前提条件にたって決定されている。実際には、TCDD 以外のダイオキシン類の TEF を求めるにあたり、長期投与毒性試験や催奇形試験以外の実験データも使用することになるが、原則として、TCDD を陽性対照とした実験（場合によっては、構造活性相関 (QSAR) で計算した値）を採用し、各エンドポイントごとの効力比 (REP) を算出する。次に、得られた様々なエンドポイントごとの REP を基に TEF を設定することになるが、その際には、*in vivo* のデータを *in vitro* あるいは QSAR のデータより優先し、さらに、*in vivo* のデータの中でも慢性、亜慢性、亜急性、急性の順にランク付けする。また、Ah レセプター特異的なエンドポイントがある場合でも生化学反応より毒性発現を重視する。以上のようなステップを踏んで、1997 年に WHO で再評価されたダイオキシン類のヒトを含む哺乳類に対する WHO-TEF 値を表 2 に示す。

このように設定された TEF は、ダイオキシン類による複合暴露の際の毒性強度算出に用いられる。先にも述べた Ah レセプターを介するメカニズムを根拠に、個々のダイオキシン類が相加的に生体反応を引き起こすと考えられることから、複合暴露の際の毒性強度は、暴露された各ダイオキシン類の TEF に個々の暴露量を乗算したものを総和して、TCDD の毒性強度に換算した TEQ を得ることで求められる。このような相加反応的モデルは、数多くの *in vivo* や *in vitro* 研究から十分にサポートされている

が、一部には、拮抗反応や相乗反応を示唆する報告もある。たとえば、TCDD とコプラナー PCB を同時に投与した短期間の実験において、TCDD による肝臓毒性や免疫抑制をコプラナー PCBs が拮抗することが観察されている (Van Birgelen et al, 1994a, 1994b; Harper et al, 1995a, 1995b)。逆に、非コプラナー PCB を TCDD と共に複合暴露した場合には、ラットにおいて肝臓のポルフィリン蓄積 (Van Birgelen et al, 1996) や甲状腺ホルモン減少 (Van Birgelen et al, 1997; Birnbaum et al, 1998) が、相乗的な反応を示したことが報告されている。しかし、これらの実験は、比較的高用量投与の実験であり、感受性の高いエンドポイントを指標として設定された TEF 値を用いて求められた TEQ に与える影響は小さいものと思われる。したがって、現時点では 1997 年に WHO で再評価された最新の TEF (表 1) をもとに、TEQ を算出してダイオキシン類の暴露評価に用いることが妥当であると考えられる。

一方、PCBs による Ah レセプター非依存性の神経毒性や内分泌障害が知られているが、これらの毒性に関しては、非コプラナー PCBs の方がコプラナー PCBs よりも強いと考えられている。特に甲状腺ホルモンの減少やレチノイドレベルへの影響は、PCBs の水酸化代謝物が関与していると考えられている (Brouwer and van den Berg, 1986)。また、PCBs の水酸化代謝物は、ダイオキシン類とは逆に、エストロゲン作用のあることも知られている (Fielden et al, 1997; Gierthy et al, 1997)。しかし、非コプラナー PCBs で認められるような Ah レセプター非依存性の毒性に関しては、ダイオキシン類の毒性とは別の毒性として扱う必要があり、非コプラナー PCBs による毒性発現メカニズムの解明が待たれる。

D. 参考文献

ATSDR (1998): Toxicological profile for Chlorinated dibenzo-p-dioxins (Update).

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Division of Toxicology/Toxicology Information Branch, Atlanta, GA
- Arnold, D. L.; Bryce, F.; McGuire, P. F.; Stapley, R.; Tanner, J. R.; Wrenshall, E.; Mes, J.; Fernie, S.; Tryphonas, H.; Hayward, S. and Malcolm, S. (1995): Toxicological consequences of aroclor 1254 ingestion by female rhesus (*Macaca mulatta*) monkeys. Part 2. Reproduction and infant findings. *Food Chem. Toxicol.*, 33: 457-474.
- Birnbaum, L. S., Visser, T. J., Kaptein, E., Kodavanti, P. R. S., Derr-Yellin, E. C., Klasson-Wehler, E., DeVito, M. J., and VAN Birgelen, A. P. J. M. (1998): Involvement of multiple mechanisms in thyroid hormone metabolism by a mixture of dioxin-like compounds in female Sprague Dawley rats. *The Toxicologist*, 42: 166.
- Brouwer, A., and van den Berg, K. J. (1986): Binding of a metabolite of 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl to transthyretin reduces serum vitamin A transport by inhibiting the formation of the protein complex carrying both retinol and thyroxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 85: 301-312.
- Ema, M., Ohe, N., Suzuki, M., Mimura, J., Sogawa, K., Ikawa, S. and Fujii-Kuriyama, Y. (1994): Dioxin binding activities of polymorphic forms of mouse and human arylhydrocarbon receptors. *J. Biol. Chem.*, 269: 27337-27343.
- Fernandez-Salguero, P., Pineau, T., Hilbert, D.M., McPhail, T., Lee, S.S., Kimura, S., Nebert, D.W., Rudikoff, S., Ward, J.M., Gonzalez, F.J. (1995): Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science*, 268: 722-726.
- Fernandez-Salguero, P.M., Hilbert, D.M., Rudikoff, S., Ward, J.M., & Gonzalez, F.J. (1996): Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 140: 173-179.
- Fielden, M. R., Chen, I., Chittim, B., Safe, S. H. and Zacharewski, T. R. (1997): Examination of the estrogenicity of 2,4,6,2',6'-pentachlorobiphenyl (PCB 104), its hydroxylated metabolite 2,4,6,2',6'-pentachloro-4-biphenylol (HO-PCB 104), and a further chlorinated derivative, 2,4,6,2',4',6'-hexachlorobiphenyl (PCB 155). *Environ. Health. Perspect.*, 105: 1238-1248.
- Gierthy, J. F., Arcaro, K. F. and Floyd, M. (1997a): Assessment of PCB estrogenicity in a human breast cancer cell line. *Chemosphere*, 34: 1495-1505.
- Gillesby, B. E., Stanostefano, M., Porter, W., Safe, S., Wu, Z. F. and Zacharewski, T. R. (1997b): Identification of motif within the 5' regulatory region of pS2 which is responsible for AP-1 binding and TCDD-mediated suppression. *Biochemistry*, 36, 6080-6089.
- Hankinson, O. (1995): The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 35: 307-340.
- Harper, N., Connor, K., Steinberg, M. and Safe, S. (1995a): Immunosuppressive activity of polychlorinated biphenyl mixtures and congeners: nonadditive

- (antagonistic) interactions. *Fund. Appl. Toxicol.*, 27: 131-139.
- Harper, N., Steinberg, M., Thomsen, J. and Safe, S. (1995b): Halogenated aromatic hydrocarbon-induced suppression of the plaque-forming cell response in B6C3F1 splenocytes cultured with allogenic mouse serum: Ah receptor structure activity relationships. *Toxicology*. 23: 199-206.
- Kharat, I. and Saatcioglu, F. (1996): Antiestrogenic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin are mediated by direct transcriptional interference with the liganded estrogen receptor. *J. Biol. Chem.*, 271: 10533-10537.
- Kobayashi, A., Sogawa, K. and Fujii-Kuriyama, Y. (1997): Cooperative interaction between AhR.Arnt and Sp1 for the drug-inducible expression of CYP1A1 gene. *J. Biol. Chem.*, 271: 12310-12316.
- Krishnan, V., Porter, W., Santostefano, M., Wang, X. and Safe, S. (1995): Molecular mechanism of inhibition of estrogen-induced cathepsin D gene expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in MCF-7 cells. *Mol. Cell. Biol.*, 15: 6710-6719.
- Kuil, C. W., Brouwer, A., Van der Saag, P. T. and Van der Burg, B. (1998): Interference between progesterone and dioxin signal transduction pathways. *J. Biol. Chem.* 273: 8829-8834.
- Mimura, J., Yamashita, K., Nakamura, K., Morita, M., Takagi, T. N., Nakao, K., Ema, M., Sogawa, K., Yasuda, M., Katsuki, M., & Fujii-Kuriyama, Y. (1997): Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells*, 2: 645-654.
- Morse, D. C.; Koeter, H. B.; Smits-van-Prooijen, A. E. and Brouwer, A. (1992): Interference of polychlorinated biphenyls in thyroid hormone metabolism: possible neurotoxic consequences in fetal and neonatal rats. *Chemosphere*, 25: 165-168.
- Schmidt, J.V., Su, G.H., Reddy, J.K., Simon, M.C. and Bradfield, C.A. (1996): Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 6731-6736.
- Sogawa, K. and Fujii-Kuriyama, Y. (1997): Ah receptor, a novel ligand-activated transcription factor. *J. Biochem.*, 122: 1075-1079.
- Van Birgelen, A. P., Van der Kolk, J., Fase, K. M., Bol, I., Poiger, H., Van den Berg, M. and Brouwer, A. (1994a): Toxic potency of 2,3,3',4,4',5-hexachlorobiphenyl relative to and in combination with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in subchronic feeding study in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 126: 202-213.
- Van Birgelen, A. P. J. M., Fase, K. M., Van der Kolk, J., Poiger, H., Brouwer, A., Seinen, W. and Van den Berg, M. (1996): Synergistic effect of 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on hepatic porphyrin levels in the rat. *Environ. Health. Perspect.*, 104: 550-557.
- Van Birgelen, A. P. J. M., Visser, T. J.,

- Kaptein, E., Kodavanti, P. R. S., Derr-Yellin, E. C., DeVito, M.J. and Birnbaum, L. S. (1997): Synergistic effects on thyroid hormone metabolism in female Sprague Dawley rats after subchronic exposure to mixtures of PCDDs, PCDFs, and PCBs. *Organohalogen Compounds*, 34: 370-375.
- Van Birgelen, A. P., Van der Kolk, J., Fase, K. M., Bol, I., Poiger, H., Brouwer, A. and Van den Berg, M. (1994b): Toxic potency of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl relative to and in combination with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in a subchronic feeding study in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 127: 209-221.
- Van den Berg, M., Birnbaum, L., Bosveld, A.T.C., Brunstrom, B., Cook, P., Feeley, M., Giesy, J.P., Hanberg, A., Hasegawa, R., Kennedy, S.W., Kubiak, T., Larsen, J.C., van Leeuwen, F.X.R., Liem, A.K.D., Nolt, C., Peterson, R.E., Poellinger, L., Safe, S., Schrenk, D., Tillitt, D., Tysklind, M., Younes, M., Warn, F. and Zacharewski, T., (1998) Toxic Equivalency Factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for Humans and Wildlife. *Environ. Health Perspect.*, 106, 775-792
- WHO/IARC (1997): Polychlorinated Dibenzo-para-dioxins and Dibenzofurans (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans; Volume 69), Geneva.
- WHO/IPCS (1989): Polychlorinated Dibenzo-para-dioxins and Dibenzofurans. (Environmental Health Criteria 88), Geneva.
- WHO/IPCS (1993): Polychlorinated Biphenyls and Terphenyls (Second Edition). (Environmental Health Criteria 140), Geneva.
- WHO/IPCS(1999) Executive Summary Report of "Assessment of the health risks of dioxins: re-evaluation of the Tolerable Daily Intake (TDI)
- Whitlock, Jr. J. P., Chichester, C. H., Bedgood, R. M., Okino, S. T., Ko, H. P., Ma, Q., Dong, L., Li, H. and Clarke-Katzenberg, R. (1997): Induction of drug-metabolizing enzymes by dioxin. *Drug Metab. Rev.*, 29: 1107-1127.
- 環境庁 (1996): : ダイオキシンリスク評価検討会中間報告, 1996.12.19.
- 厚生省 (1996): : ダイオキシンのリスクアセスメントに関する研究班 中間報告書, 1996.6.28.
- 廣瀬明彦、長谷川隆一、黒川雄二(1998): ダイオキシン類の生体毒性. *J.Toxicol.Sci.*, 23: App.93-106.

表 1. 人を含む哺乳類における WHO-TEF

化合物名	WHO TEF
PCDDs	
1,2,3,7,8-Pentachlorodibenzo-p-dioxin (1,2,3,7,8-PeCDD)	1
1,2,3,4,7,8-Hexachlorodibenzo-p-dioxin (1,2,3,4,7,8-HxCDD)	0.1
1,2,3,6,7,8-Hexachlorodibenzo-p-dioxin (1,2,3,6,7,8-HxCDD)	0.1
1,2,3,7,8,9-Hexachlorodibenzo-p-dioxin (1,2,3,7,8,9-HxCDD)	0.1
1,2,3,4,6,7,8-Heptachlorodibenzo-p-dioxin (1,2,3,4,6,7,8-HpCDD)	0.01
Octachlorodibenzo-p-dioxin (OCDD)	0.0001
PCDFs	
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzofuran (2,3,7,8-TCDF)	0.1
1,2,3,7,8-Pentachlorodibenzofuran (1,2,3,7,8-PeCDF)	0.05
2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran (2,3,4,7,8-PeCDF)	0.5
1,2,3,4,7,8-Hexachlorodibenzofuran (1,2,3,4,7,8-HxCDF)	0.1
1,2,3,6,7,8-Hexachlorodibenzofuran (1,2,3,6,7,8-HxCDF)	0.1
1,2,3,7,8,9-Hexachlorodibenzofuran (1,2,3,7,8,9-HxCDF)	0.1
2,3,4,6,7,8-Hexachlorodibenzofuran 2,3,4,6,7,8-HxCDF O	0.1
1,2,3,4,6,7,8-Heptachlorodibenzofuran (1,2,3,4,6,7,8-HpCDF)	0.01
1,2,3,4,7,8,9-Heptachlorodibenzofuran (1,2,3,4,7,8,9-HpCDF)	0.01
Octachlorodibenzofuran (OCDF)	0.0001
Non-ortho PCBs	
3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl (3,3',4,4'-TCB, PCB 77)	0.0001
3,4,4',5'-Tetrachlorobiphenyl (3,4,4',5'-TCB, PCB 81)	0.0001
3,3',4,4',5'-Pentachlorobiphenyl (3,3',4,4',5'-PeCB, PCB 126)	0.1
3,3',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl (3,3',4,4',5,5'-HxCB, PCB 169)	0.01
Mono-ortho PCBs	
2,3,3',4,4'-Pentachlorobiphenyl (2,3,3',4,4'-PeCB, PCB 105)	0.0001
2,3,4,4',5'-Pentachlorobiphenyl (2,3,4,4',5'-PeCB, PCB 114)	0.0005
2,3',4,4',5'-Pentachlorobiphenyl (2,3',4,4',5'-PeCB, PCB 118)	0.0001
2',3,4,4',5'-Pentachlorobiphenyl (2',3,4,4',5'-PeCB, PCB 123)	0.0001
2,3,3',4,4',5'-Hexachlorobiphenyl (2,3,3',4,4',5'-HxCB, PCB 156)	0.0005
2,3,3',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl (2,3,3',4,4',5,5'-HxCB, PCB 157)	0.0005
2,3',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl (2,3',4,4',5,5'-HxCB, PCB 167)	0.00001
2,3,3',4,4',5,5'-Heptachlorobiphenyl (2,3,3',4,4',5,5'-HpCB, PCB 189)	0.0001