

別添2

厚生科学研究費補助金実績報告書
生活安全総合研究事業

ダイオキシンの毒性発現機構に関する研究

平成11年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山下敬介

平成12年（2000年）4月

平成11年度 厚生科学研究費補助金
報告書
生活安全総合研究事業

目次

I. 総括研究報告書

ダイオキシンの毒性発現機構に関する
研究

山下敬介

II. 分担研究報告

組織再構築における細胞外マトリック
スとその受容体の相互作用

横崎恭之

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

別添 4

厚生科学研究費補助金

(生活安全総合研究事業)

総括研究報告書

ダイオキシンの毒性発現機構に関する研究

主任研究者 山下敬介

(広島大学医学部解剖学第一講座)

研究要旨

A. 研究目的

ダイオキシン類とは、ジベンゾパラジオキシン、ジベンゾフラン、ノンオルソ多塩化ビフェニールの総称である。ダイオキシン類は急性毒性、肝臓酵素誘導作用、生殖毒性、発生毒性（催奇形性）、免疫毒性などさまざまな毒性を有する。近年、ヒトの精子数減少とダイオキシンによる環境汚染との関連性について議論がされて、国民の間に、ダイオキシン類による汚染が将来ヒトの男性生殖機能へ重大な影響を及ぼす可能性があるのではないかとの不安が広がっている。

本研究は、ダイオキシン類の肝臓への影響、精巣毒性に焦点を絞り、これらの毒性発現機序について明らかにしようとするものである。ダイオキシンはダイオキシン受容体（別名：アリール炭化水素受容体、以下AhRと略）を介して毒性を発現すると考えられている。ダイオキシン類の肝臓への影響、精巣毒性に対するAhRの関与の有無について検討することも本研究の目的である。

本年度は3年計画の初年度にあたるため、マウスを用いて、基礎的実験を中心

に行った。

B. 研究方法

マウスの系統はダイオキシンに対する感受性が最も高いとされる系統のC57BL/6J（日本クレア）を用いた。

AhRの関与を見るため、AhR遺伝子欠損マウス(AhR^{-/-})マウス（Mimura et al., 1997）を使用した。ダイオキシンは、ダイオキシン類のうち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（2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, 以下TCDDと略、Cambridge Isotope Laboratories Japan, CIL Japan 取扱、CIL製造、製品番号 ED-901）をコーン油を溶媒として溶解した。溶媒投与（5,000 μ l/kg体重）を対照群とした。

1) 肝臓の変化発現機序：8週齢の雄マウスを用いて、実験を行った。肝臓への影響をみるため、C57BL/6JマウスにTCDDを40 μ g/kg体重の割合で1回強制経口投与した。投与後1・3・7・14・28日でマウスを頸椎脱臼により屠殺した。AhR遺伝子欠損マウスにも同量のTCDDを投与して7日後に屠殺し、AhRの関与を見た。

2) 精巣毒性発現機序：C57BL/6Jマウスの雄・雌を終夜交配した。膣栓発見日を妊娠0日（胎齢0日）とし、妊娠14.5日にTCDDを母体体重kg当たり0.625・2.5・10 μ gの割合で強制経口投与した。妊娠14.5日投与では、胎仔に口蓋裂は生じない。この理由で投与日を妊娠14.5日に設定した。出生後、仔をそのままダイオキシン投与母マウス（または、溶媒投与母マウス）に飼育させた。仔は胎生期（妊娠14.5日から出生まで）にダイオキシンに暴露される他、母乳を通じても暴露される。出生日を0週0日として、4

週で離乳した。10週齢に仔を屠殺した。

(倫理面への配慮) 実験はヒトを対象としないので、倫理問題は生じない。また、実験動物はマウスを使用した。ヘルシンキ条約に基づき、動物は愛護的に扱い、十分な麻酔下にて屠殺、あるいは頸椎脱臼により屠殺した。

C. 研究結果

1) 肝臓の変化: C57BL/6Jマウスの肝臓はTCDD投与1週後に腫張が認められた。組織像を見ると、肝小葉の中心静脈周辺に空胞が多数出現していた。空胞はズダン黒染色に染まることから、その本体は脂肪であることが確認された。AhR遺伝子欠損マウスでは、TCDD投与によっても腫張は認められず、組織像で、脂肪沈着も見られなかった。この結果より、TCDDによる肝臓への脂肪沈着はAhRを介すると言えた。

また、AhR遺伝子欠損マウスはC57BL/6Jマウスに比較して、肝臓の重量(肝臓の体重に対する比重量)が小さいことが認められた。これは、アメリカウィスコンシンのDr. Bradfieldの作出したAhR遺伝子欠損マウスと同様の所見であり、AhR遺伝子欠損による表現型の1つであった(Larvis et al., 2000)。

2) 精巣毒性発現の有無: TCDD10 μ g/kg母体体重投与群では、妊娠は継続し出産にいたるが、仔は出生後1-2日のうちに死亡した。死亡の原因については明らかにできなかった。TCDD2.5 μ g/kg母体体重投与群では、仔は出生し、10週まで成熟した。これを最高用量群とした。この精巣・精巣上体を取りだし、組織切片を作製し、投与群と対照群を比

較した。精巣にはTCDD投与による明瞭な変化を認めなかった。曲精細管内のセルトリ細胞、精祖細胞から精子にかけての細胞に明瞭な影響は観察できなかった。時に、精祖細胞から精子にかけての細胞に細胞死の像を見たが、実験条件を隠して、ブラインドで観察・比較したところ、どちらも正確にいい当てることはできなかった。

精巣上体をすりつぶし、精子数を血球計算盤で算出した。これもTCDD投与による精子数の変化を認めなかった。

さらに、精巣上体の精子についてHamilton-Thorneによる精子運動能検査による検討を加えた。しかし、運動能に与えるTCDD投与の影響を捉えることができなかった。

肛門陰門間距離 Anogenital distance (ARD)は測定しなかった。

D. 考察

精巣毒性については、アメリカ ウィスコンシンのDr. Richard Petersonらのグループ(Mably et al., 1992a, 1992b, 1992c; Bjerke and Peterson, 1994; Bjerke et al., 1994a, 1994b; Theobald and Peterson, 1997; Roman and Peterson, 1998; Roman et al., 1998a, 1998b)やドイツ ベルリンのDr. Diether NeubertとDr. Ibrahim Chahoudのグループ(Chahoud et al., 1989; Rune et al., 1991; Chahoud et al., 1992; Faqi et al., 1998)とアメリカ EPAのDr. Leon Earl Gray Jr.のグループ(Gray et al., 1995; Gray and Kelce 1997; Gray et al., 1997)が一連の実績を納め、世界の標準となっている。しかしながら、これらの仕事の大半はラットを用いて行われており、マウスで結果をだ

したのは、このうち、Theobald and Peterson (1997)のみである。雄のF1仔動物のダイオキシンによる影響のエンドポイントとして、彼等は、腹側前立腺の重量減少、凝固腺重量の減少、胸腺重量の減少、腎盂拡大と精巣上体の精子数減少を報告している。

こと、精巣毒性に関しては、一般にダイオキシン類による精巣毒性の感受性を種差の面から見ると、ラットが最も高く、マウスは低いとされる。しかしながら、精巣毒性の発現機序をAhRを手がかりに解明してゆこうとすれば、マウスを使用せざるを得ない。

E. 結論

肝臓の変化発現機序については、基礎的データをとることができたといえる。精巣毒性発現機序の項目については、初年度の結果では、うまくエンドポイントを捉えることができなかった。

参考論文

Bjerke DL and Peterson RE (1994) Reproductive toxicity of 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin in male rats: different effects of *in utero* versus lactational exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 127: 241-249.

Bjerke DL, Sommer RJ, Moore RW, and Peterson RE (1994a) Effects of *in utero* and lactational 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin exposure on responsiveness of the male rat reproductive system to testosterone stimulation in adulthood. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 127: 250-257.

Bjerke DL, Brown TJ, Maclusky NJ, Hochberg RB, and Peterson RE (1994b) Partial demasculinization and feminization of sex behavior in male rats by *in utero* and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachloro-

dibenzo-*p*-dioxin is not associated with alterations in estrogen receptor binding or volumes of sexually differentiated brain nuclei.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 127: 258-267.

Chahoud I, Krowke R, Schimmel A, Merker H-J, and Neubert D (1989) Reproductive toxicity and pharmacokinetics of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 1. Effects of high doses on the fertility of male rats.

Arch Toxicol. 63: 432-439.

Chahoud I, Hartmann J, Rune GM, and Neubert D (1992) Reproductive toxicity and toxicokinetics of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 3. Effects of single doses on the testis of male rats.

Arch. Toxicol. 66: 567-572.

Faqi AS, Dalsenter PR, Merker H-J, and Chahoud I (1998) Reproductive toxicity and tissue concentration 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, and Birnbaum LS (1995) 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 and Kelce WR (1997) 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 (1997)

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, and Peterson RE (1992a) *In utero* and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 1. Effects on anrogenic status. Toxicol. Appl. Pharmacol. 114: 97-107.

Mably TA, Moore RW, Goy RW, and 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 hormone secretion in adulthood. Toxicol. Appl. Pharmacol. 114: 108-117.

Mably TA, Bjerke DL, Moore RW, Gendron-Ritzpatrick A, and 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.

Larvis GP, Lindell SL, Thomas RS, McCuskey RS, Murphy c, Glover E, Bentz M, Southard J, Bradfield CA (2000) Portosystemic shunting and persistent fetal vascular structures in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 10442-10447.

Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, Morita M, Takagi TN, Nakao K, Ema M, Sogawa K, Yasuda M, Katsuki M, and Fujii-Kuriyama Y (1997) Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetra- chlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. Genes to Cells 2: 645-654.

Roman BL and Peterson RE (1998) *In utero* and lactational exposure of the male rat to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin impairs

prostate development. 1. Effects on gene expression.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 150: 240-253.

Roman BL, Pollenz RS, and Peterson RE (1998a) Responsiveness of the adult male rat reproductive tract to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin exposure: Ah receptor and ARNT expression CYP1A1 induction, and Ah receptor down-regulation. Toxicol. Appl. Pharmacol. 150: 228-239.

Roman BL, Timms BG, Prins GS, and Peterson RE (1998b) *In utero* and lactational exposure of the male rat to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin impairs prostate development. 2. Effects on growth and cytodifferentiation. Toxicol. Appl. Pharmacol. 150: 254-270.

Rune GM, de Souza Ph, Merker H-J, and Neubert D (1991) Morphological and histochemical pattern of response in rat testes after administration of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). Histol. Histopath. 6: 459-467.

Theobald HM and 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.

F. 健康危険情報

今回の実験から直ちにヒトへの影響を外挿することはできない。健康危険情報（国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす情報）として、厚生省に報告すべき事柄はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1)

著者：Mineo Yasuda, Kohji A. Matsui,

Toshio N. Takagi, and Keisuke Yamashita

論文の名称 : Palatal ruga anomalies induced by dioxins in mice.

発行所、発表雑誌等又は発表学会等の名称 : Dioxin '99, 19th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs.

Organohalogen Compounds 42: 389-392 (1999)

2)

著者 : Kazumi Sugihara, Kazuhiro Shimomiya, Shigeyuki Kitamura, Shigeru Ohta, Saori Okamura, Keisuke Yamashita, Mineo Yasuda, and Yoshiaki Fujii-Kuriyama

論文の名称 : Ah-receptor mediated induction of liver xanthine oxidase / xanthine dehydrogenase by 2,3,7,8-TCDD.

発行所、発表雑誌等又は発表学会等の名称 : Dioxin '99, 19th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs.

Organohalogen Compounds 42: 425-428 (1999).

3)

著者 : Toshio N. Takagi, Kohji A. Matsui, Keisuke Yamashita, Hiromitsu Ohmori, and Mineo Yasuda

論文の名称 : Pathogenesis of cleft palate in mouse embryos exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD).

発行所、発表雑誌等又は発表学会等の名

称 : Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis 20 (2): 73-86 (2000).

4)

著者 : Hiromitsu Ohmori, Hiroo Ogura, Mineo Yasuda, Shigenobu Nakamura, Tatsuo Hatta, Kano Kawano, Takayuki Michikawa, Keisuke Yamashita, and Katsuhiko Mikoshiba

論文の名称 : Developmental neurotoxicity of phenytoin on granule cells and Purkinje cells in mouse cerebellum.

発行所、発表雑誌等又は発表学会等の名称 : Journal of Neurochemistry 72 (4): 1497-1506 (1999).

5)

著者 : Tatsuo Hatta, Hiromitsu Ohmori, Teruo Murakami, Mikihisa Takano, Keisuke Yamashita, and Mineo Yasuda

論文の名称 : Neurotoxic effects of phenytoin on postnatal mouse development following neonatal administration.

発行所、発表雑誌等又は発表学会等の名称 : Neurotoxicology and Teratology 21 (1): 21-28 (1999).

6)

著者 : Keisuke Yamashita, Toshio N. Takagi, Toshiharu Yamashita, Setsuko Yamasaki, Saori Okamura, Yoshiaki Fujii-Kuriyama and Mineo Yasuda

論文の名称 : Involvement of Ah receptor on developmental toxicity of dioxin in mouse fetuses: sensitivity in

Ahr-mutant heterozygotes.
発行所、発表雑誌等又は発表学会等の名称：20th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs.
Organohalogen Compounds 49:
147-150 (2000).

7)

著者：Kazumi Sugihara, Tsuyoshi Yamada, Shigeyuki Kitamura, Shigeru Ohta, Saori Okamura, Yukari Kanou, Keisuke Yamashita, Mineo Yasuda, and Yoshiaki Fujii-Kuriyama
論文の名称：Induction of liver xanthine dehydrogenase / xanthine oxidase by 2,3,7,8-TCDD and cobalt chloride.

発行所、発表雑誌等又は発表学会等の名称：20th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs.
Organohalogen Compounds 49:
247-250 (2000).

2. 学会発表

1)

山下敬介、山崎せつ子、岡村さおり、安田峯生、藤井義明
マウス生殖器におけるダイオキシン受容体の発現
第104回日本解剖学会総会・学術集会
(1999年3月29-31日、東京都三鷹市)
解剖学雑誌 Acta Anatomica Nipponica
74 (1) 71 (1999) 2月号.

2)

大森啓充、山下敬介、安田峯生、中村重信、小倉博雄、御子柴克彦

新生仔期フェニトイン投与のマウス海馬の発達と行動学習に及ぼす影響
Neurotoxic effects of phenytoin on developing mouse hippocampus.
第40回日本神経病理学会総会学術研究会.

3)

Mineo Yasuda, Toshio Takagi, Kohji A. Matsui, and Keisuke Yamashita
Bases of variant patterns of palatal rugae in mice.
アメリカ毒性学会 Teratology Society, The 39th Annual Meeting. June 29-July 4, 1999. Colorado, USA.
Teratology 59(6): 405 (1999) June issue.

4)

山下敬介

ダイオキシンによるマウス発生毒性発現機構

シンポジウム 「内分泌攪乱物質（環境ホルモン）を考える」

第39回日本先天異常学会学術集会
(1999年7月14-16日、鹿児島市)

Congenital Anomalies 39 (3): 156-157
(1999) June issue.

Teratology 62 (3): 8A (2000)

September issue.

5)

向山敦子、大森啓充、八田達夫、山下敬介、御子柴克彦、安田峯生、奈良 勲
メチルアゾキシメタノール(MAM)の生後投与が生後初期の小脳に及ぼす影響の免疫組織化学的検討

第39回日本先天異常学会学術集会
(1999年7月14-16日、鹿児島市)

Congenital Anomalies 39 (3): 182
(1999) June issue.

Teratology 62 (3): 36A (2000)
September issue.

6)

安田峯生、岡村さおり、山下敬介、藤井
義明

ダイオキシン受容体欠損マウスにみられ
る脊柱後彎

第39回日本先天異常学会学術集会
(1999年7月14-16日、鹿児島市)

Congenital Anomalies 39 (3): 178
(1999) June issue.

Teratology 62 (3): 31A (2000)
September issue.

7)

安田峯生、松井浩二、高木敏男、山下敬
介

マウス口蓋ヒダパターンの形成機構

第39回日本先天異常学会学術集会
(1999年7月14-16日、鹿児島市)

Congenital Anomalies 39 (3): 178-185
(1999) June issue.

Teratology 62 (3): 38A-39A (2000)
September issue.

8)

加納由香利、沖田進司、松井浩二、岡村
さおり、安田峯生、山下敬介

2,3,7,8-四塩化ジベンゾパラジオキシン
によるマウス肝毒性

日本解剖学会 第54回中国・四国地方会
(1999年11月13-14日、広島市)

解剖学雑誌 Acta Anatomica Nipponica
75 (5): 477 (2000) 10月号.

9)

井上洋子、菅野理恵子、坂井るり子、山
下敬介、菅野雅元

ダイオキシンによる胸腺萎縮作用の解析
第29回日本免疫学会 (1999年12月1-3
日、京都市)

日本免疫学会総会・学術集会記録 第2
9巻 p.179 (1999).

10)

岡村さおり、森直樹、山下敬介、安田峯
生、藤井義明

AhR遺伝子欠損マウスの表現型解析
第22回日本分子生物学会 (1999年12月
7-10日、福岡市)

第22回日本分子生物学会プログラム・講
演予稿集 p.469 (1999).

11)

加納由香利、沖田進司、松井浩二、岡村
さおり、安田峯生、山下敬介

ダイオキシンによるマウス肝毒性：ダイ
オキシン受容体欠損マウスと野生型マウ
スの比較

Cytotoxicity of 2,3,7,8-tetrachloro-
dibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in the liver
of mice.

第105回日本解剖学会総会・学術集会
(2000年3月31日、横浜市)

解剖学雑誌 Acta Anatomica Nipponica
75 (1): 151 (2000) 2月号.

12)

岡村さおり、森直樹、沖田進司、松井
浩二、山下敬介、安田峯生

ダイオキシン受容体欠損マウスにおける
表現型解析

第105回日本解剖学会総会・学術集会
(2000年3月31日、横浜市)

解剖学雑誌 Acta Anatomica Nipponica

75 (1): 151 (2000) 2 月号.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

1)

著者：Mineo Yasuda, Kohji A. Matsui, Toshio N. Takagi, and Keisuke Yamashita

論文の名称：Palatal ruga anomalies induced by dioxins in mice.

発行所、発表雑誌等又は発表学会等の名称：Dioxin '99, 19th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs. Organohalogen Compounds 42: 389-392 (1999)

概要：ダイオキシンは妊娠マウスに強制経口投与すると妊娠末期胎仔に口蓋裂を誘発する。一方、口蓋の口腔粘膜側には、横走る8から9本のヒダがあり、これを口蓋ヒダと名付けた。口蓋裂を免れた胎仔の口蓋ヒダを観察すると、正常から逸脱したパターンが見られ、口蓋裂を誘発するよりも低用量で、口蓋に変化が起こっていることが明かとなった。

2)

著者：Kazumi Sugihara, Kazuhiro Shimomiya, Shigeyuki Kitamura, Shigeru Ohta, Saori Okamura, Keisuke Yamashita, Mineo Yasuda, and Yoshiaki Fujii-Kuriyama

論文の名称：Ah-receptor mediated induction of liver xanthine oxidase / xanthine dehydrogenase by 2,3,7,8-TCDD.

発行所、発表雑誌等又は発表学会等の名称：Dioxin '99, 19th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs. Organohalogen Compounds 42: 425-428 (1999).

概要：ダイオキシン類は肝臓に蓄積し、肝臓の解毒・代謝に関する酵素を強力に誘導する。肝臓モノオキシゲナーゼがダイオキシン受容体(Aryl hydrocarbon receptor, AhR)依存的に誘導を受けることを明らかにするとともに、キサンチン酸化酵素、キサンチン脱水素酵素も、AhR依存的に誘導されることを示した。

3)

著者：Toshio N. Takagi, Kohji A. Matsui, Keisuke Yamashita, Hiromitsu Ohmori, and Mineo Yasuda

論文の名称：Pathogenesis of cleft palate in mouse embryos exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD).

発行所、発表雑誌等又は発表学会等の名称：Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis 20 (2): 73-86 (2000).

概要：環境汚染物質として悪名高いダイオキシンのうち、最も毒性の強い2,3,7,8四塩化ジベンゾパラジオキシン (TCDDと略)は妊娠マウスの12.5日(膣栓発見日を妊娠0日とする)に強制経口投与すると、胎仔に口蓋裂と腎盂拡大という奇形を誘

発する。この論文では、口蓋裂の誘発機序を調べた。口蓋突起は左右の突起が相接しあうことにより、接触・癒合へと進んでゆくのが口蓋発生であるが、TCDD投与群では、TCDDが口蓋突起内の間葉細胞の増殖を抑制することにより、左右の突起の接触を阻害する。これがTCDDによる口蓋裂誘発の原因であることが判明した。

4)

著者：Hiromitsu Ohmori, Hiroo Ogura, Mineo Yasuda, Shigenobu Nakamura, Tatsuo Hatta, Kano Kawano, Takayuki Michikawa, Keisuke Yamashita, and Katsuhiko Mikoshiba

論文の名称：Developmental neurotoxicity of phenytoin on granule cells and Purkinje cells in mouse cerebellum.

発行所、発表雑誌等又は発表学会等の名称：Journal of Neurochemistry 72 (4): 1497-1506 (1999).

概要：抗てんかん薬のフェニトインは妊婦が服用すると、児に精神発達遅滞をおこすことがある。これに対応するマウスモデルを作製し、マウス小脳の発達を検討した。マウス新生仔期の小脳発達は、ヒトの胎児期後期のそれに対応するので、フェニトインをマウス生後2から4日（出生日を0日）に投与した。小脳の外果粒細胞の遊走とプルキンエ細胞の樹状突起の発達が障害され、運動面では協調運動の障害が見られた。

5)

著者：Tatsuo Hatta, Hiromitsu Ohmori, Teruo Murakami, Mikiyoshi Takano, Keisuke Yamashita, and Mineo Yasuda

論文の名称：Neurotoxic effects of phenytoin on postnatal mouse development following neonatal administration.

発行所、発表雑誌等又は発表学会等の名称：Neurotoxicology and Teratology 21 (1): 21-28 (1999).

概要：フェニトインがマウスの生後脳機能の発達に及ぼす影響を見る目的で、実験を行った。生後2、3、4日（出生日を0日）にフェニトインを10, 17.5, 25, 35 mg/kgの割合で新生仔に投与した。全脳・大脳・小脳重量を生後5日から21にかけて、溶媒投与群と比較したところ、実験群で重量の増加が低かった。生後初期の運動発達を評価したところ、実験群での運動発達が劣っていた。

6)

著者：Keisuke Yamashita, Toshio N. Takagi, Toshiharu Yamashita, Setsuko Yamasaki, Saori Okamura, Yoshiaki Fujii-Kuriyama and Mineo Yasuda

論文の名称：Involvement of Ah receptor on developmental toxicity of dioxin in mouse fetuses: sensitivity in Ahr-mutant heterozygotes.

発行所、発表雑誌等又は発表学会等の名称：20th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs. Organohalogen Compounds 49: 147-150 (2000)

概要：ダイオキシンは妊娠マウスに強制経口投与すると、末期胎仔に口蓋裂を誘発する。ダイオキシン受容体(Aryl hydrocarbon receptor, AhR)を欠失したマウスにおいては、同様の実験を行うと胎仔には口蓋裂が誘発されない。AhR^{+/-}のヘテロ型の遺伝子型を持つマウスにおいては、AhR^{+/+}マウス胎仔とAhR^{-/-}胎仔の中間型を示した。このことは、遺伝子用量依存性があることを物語っている。

7)

著者：Kazumi Sugihara, Tsuyoshi Yamada, Shigeyuki Kitamura, Shigeru Ohta, Saori Okamura, Yukari Kanou, Keisuke Yamashita, Mineo Yasuda, and Yoshiaki Fujii-Kuriyama

論文の名称：Induction of liver xanthine dehydrogenase / xanthine oxidase by 2,3,7,8-TCDD and cobalt chloride.

発行所、発表雑誌等又は発表学会等の名称：20th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs. Organohalogen Compounds 49: 247-250 (2000)

概要：ダイオキシン類は肝臓に蓄積し、肝臓の解毒・代謝に関する酵素を強力に誘導する。肝臓モノオキシゲナーゼがダイオキシン受容体(Aryl hydrocarbon receptor, AhR)依存的に誘導を受けることを明らかにするとともに、キサンチン酸化酵素、キサンチン脱水素酵素も、AhR依存的に誘導されることを示した。今回はさらに塩化コバルトがキサンチン酸化酵素、キサンチン脱水素酵素活性を誘導することを示した。

19990676

これ以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので P.173 の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

別添2

厚生科学研究費補助金実績報告書
生活安全総合研究事業

ダイオキシンの毒性発現機構に関する研究

平成11年度 分担研究報告書

組織再構築における細胞外マトリックスと
その受容体の相互作用

分担研究者 横崎恭之
(主任研究者 山下敬介)

平成12年(2000年)4月

分担研究報告書

組織再構築における細胞外マトリックスと
その受容体の相互作用

横 崎 恭 之
国立療養所広島病院

緒言

ダイオキシンの毒性の一つに催奇形性が、挙げられるが、奇形は発生異常の一つの形と考えられる。発生時には時間的連続性をもった組織の再構築が行われるが、この際細胞外マトリックス-マトリックス受容体の相互作用が、大きな役割を果たしていると考えられる。そこで、ダイオキシンの生物毒性機構の解明を目的とし、細胞外マトリックスとその受容体であるインテグリンの相互作用について検討した。1つのマトリックスに対して複数のインテグリンが受容体として機能しているが、多くのインテグリン欠損マウスは致死的で、この重複性は単に予備としての存在ではないようである。複数のインテグリンの使い分けの機序を知ることにより、組織の動的構築機構の解明に道が開かれるものと考えられる。RGD (Arg-Gly-Asp) 配列はインテグリンの認識する配列として良く知られているが、それ以外の配列を認識するインテグリンも存在する。我々は non-RGD 認識インテグリン $\alpha 9\beta 1$ のテネイシン-C 内の認識配列を同定したところ、立体構造上 RGD に最も近接した部位に存在した¹⁾。このことから、 $\alpha 9\beta 1$ はリガンド結合を RGD インテグリンと競合する可能性を考え、今回 RGD を持つもう一つのリガンド、オステオポンチンにおける認識部位を同定した。

方法

$\alpha 9\beta 1$ と結合するオステオポンチン N-末リコンビナント断片 (nOPN) は大腸菌により作成した。まず部位特異的変異導入により nOPN の変異体を作成し細胞接着アッセイの結果から接着部位を推定、次に同部位のアナログペプチドを作成し競合阻害とインテグリン

のリガンド結合依存的エピトープを認識する mAb 15/7 を用いて確認した。

結果

インテグリンの認識に重要とされる Asp、Glu 残基の種間で良く保存された部位を選び変異体を作成した。しかし 6 つの変異体はいずれも接着性を保持していた。そこで、 $\alpha 9\beta 1$ のオステオポンチンへの結合はトロンピンにより分子の中央部で切断された N-末断片にのみみられることから²⁾、切断による立体構造変化が影響する可能性を考え、切断部位周辺のアミノ酸配列に着目した。良く保存された残基 Tyr が存在し、Tyr-Ala 変異体は著明な接着性の現弱を呈した。そこで同部位のアナログペプチド SVVYGLR を作製したところ阻害効果を認め、また SVVYGLR と培養した $\alpha 9\beta 1$ 強制発現細胞は mAb 15/7 により認識された。

考察

nOPN 内の $\alpha 9\beta 1$ による認識配列・部位は以下のことを示していた。1) 従来インテグリンの認識に重要と考えられた陰性荷電残基を含んでいない。2) 同部位はトロンピン切断断片の C-末端であり、 $\alpha 9\beta 1$ がオステオポンチンをトロンピン切断により初めて認識することを支持する。3) テネイシン-C の場合と同様 RGD 配列に隣接しており、 $\alpha 9\beta 1$ は RGD インテグリンとオステオポンチン内の結合部位を競合する可能性を示唆している。

結論

オステオポンチン内の $\alpha 9\beta 1$ による認識部位をトロンピン切断部近傍の、SVVYGLR と同定した³⁾。

参考文献

- 1) Yokosaki Y et al: *J. Biol. Chem.* 273: 11423-11428.
- 2) Smith LL et al: *J. Biol. Chem.* 271: 28485-28491.
- 3) Yokosaki Y et al: *J. Biol. Chem.* 274: 36328-36334.

研究成果刊行物一覧表

分担研究者：横崎恭之

1. Holm Schneider, Richard P. Harbottle, Yasuyuki Yokosaki, Philipp Jost, and Charles Coutelle (1999) Targeted gene delivery into $\alpha 9\beta 1$ -integrin-displaying cells by a synthetic peptide. *FEBS letters* 458: 329-332.
2. Yokosaki Y, Nariaki Matsuura, Tomohiro Sasaki, Isao Murakami, Holm Schneider, Shigeki Higashiyama, Yoshiki Saitoh, Michio Yamakido, Yasuyuki Taooka, and Dean Sheppard (1999) The integrin $\alpha 9\beta 1$ binds to a novel recognition sequence (SVVYGLR) in the thrombin-cleaved amino terminal fragment of osteopontin. *J. Biol. Chem.* 274: 36328-36334.
3. Isao Murakami, Keiko Hiyama, Shinichi Ishioka, Michio Yamakido, Fumiyoshi Kasagi, and Yasuyuki Yokosaki (2000) p53 gene mutations are associated with shortened survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer: an analysis of medically managed patients. *Clin. Cancer Res.* 6: 526-530, 2000.
4. 横崎恭之：XI. 可溶性膜蛋白、接着分子 インテグリンファミリー. 広範囲血液・尿生化学検査 免疫学的検査. 日本臨床 通巻755号 (平成11年12月26日発行) pp. 424-427 日本臨床社、1999.