

別添2

厚生科学研究費補助金総括・分担研究報告書表紙

厚生科学研究研究費補助金

生活安全総合研究事業

研究課題名(課題番号): 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

(H10-生活-009)

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 金子 豊蔵

平成13(2001)年 4月

厚生科学研究費補助金研究報告書目次

目 次

I. 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  
(H10-生活-009)

金子 豊蔵

II. 分担研究報告書

1. 口蓋裂発生機序に関する研究

金子 豊蔵

2. ダイオキシン類の発がんプロモーター作用の *in vivo* 高感度(短期)検出系に関する研究  
菅野 純

3. ダイオキシン規制の国際動向

黒川 雄二

4. ラット初期胚と雄性生殖器の発生歪曲の分子機序

鈴木 勝士

5. ダイオキシン類の毒性学的研究における国際動向

広瀬 明彦

6. アリールハイドロカーボン受容体の機能調節

藤井 義明

7. 神経薬理的検討

三国 雅彦

8. 分子奇形学的検討

安田 峯生

## 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）=65,000,000

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）

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）

広瀬 明彦（国立医薬品食品衛生研究所）

## 研究要旨

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、奇形の誘発と雄胎児の副生殖器発生かく乱の確認と機序の解明、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：PCTs の口蓋裂誘発について検討する目的で、口蓋裂を低頻度で発生する量の PCTs を含む餌を C57BL/6 マウスに摂餌させ、妊娠 10-14 日のいずれかに単独では口蓋裂を発生させない量のコルチコステロン (CS) を一回皮下投与し、口蓋裂発生に及ぼす CS の影響を検討した。また、AhR 遺伝子欠失マウスに 4000ppm の PCTs を含む餌を妊娠 0 日より投与し、口蓋裂の発生頻度を観察した（金子）。Jcl:ICR マウスの妊娠 12.5 日に TCDD を強制経口投与し、胎児口蓋の細胞動態と口蓋ヒダの観察を行った。また、ダイオキシン類の毒性発現機序の一つとして、活性酸素による脂質過酸化があるが、活性酸素発生に関係する肝臓のキサンチン脱水素酵素・キサンチン酸化酵素について検討した（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、精子産生に影響するとの Wilker ら(1996)の報告について、Wistar Imamichi 妊娠ラットに TCDD を投与し、再現性を検討した（鈴木）。②発がん作用の高感度検出系として、発がんにおけるプロモーター作用にも感受性を示すとされる TG/AC マウスを用いて成熟期個体における発がん性について検討を行った（菅野）。③マウスの CYP1A2 遺伝子のプロモーター領域を CAT 遺伝子の 5' 上流に結合したレポーター遺伝子を用いた実験により、遺伝子上流 2.1kb 付近に誘導剤に応答する配列が存在することを以前の実験から得ていたため、この配列に系統的に変異を導入したレポーター遺伝子を作製し、

Hepa-1 細胞、または Hep3B 細胞に導入して、エンハンサー配列を決定し、その配列に結合する因子をゲル易動度シフト法によって検討した。また AhR と Arnt がこの誘導にどのように関わっているのかを検討した（藤井）。慢性変動ストレス（chronic variable stress、CSV）が脳内代謝に与える効果についてダイオキシン類の連続投与の影響と胎生期ダイオキシン類暴露の神経系発達に対する影響について検討した。また、胎生期に ACTH、ダイオキシン類、さらに慢性ストレスを加えたラットを作製し、行動学的観察、ストレス応答に関与する内分泌機能測定、およびマイクロアレイ法を用いた脳内遺伝子変異の網羅的検索を行う（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（広瀬、黒川）。

## 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

コルチコステロン（CS）を 50mg/kg、100mg/kg、200mg/kg、300mg/kg それぞれを妊娠 10~14 日までの各妊娠日齢に 1 回、妊娠母体の頸背部皮下に単回投与した。妊娠 18 日目に口蓋裂の有無を

観察した。

PCT s 1000ppm および 4000ppm 混

餌飼料を対照として、PCT s 1000ppm 混餌飼料を妊娠 5 日目から母体に摂餌させ、妊娠 10-14 日のいずれかに一回、CS の口蓋裂を発生させない量 50mg/kg を頸背部に皮下投与した。

また、PCT s の AhR 遺伝子関与の有無について、AhR +/+、+/-、-/- の雌雄マウスをランダムに交配させ、ブラグを確認したマウスに PCT s の 4000ppm 混餌飼料を妊娠 0 日より給餌し、妊娠 18.5 日に母体を回復し、胎児の口蓋裂の発症をジェノタイプごとに比較した（金子）。また、マウス肝臓における TCDD による新規酵素誘導を検索するために、AhR 欠如マウスに TCDD を投与し、肝のキサンチン酸化酵素（XO）、キサンチンデヒドロゲナーゼ（XDH）、アルデヒド酸化酵素活性を調べた（安田）。

TCDD の妊娠中期（15 日）のラットへの 1 回暴露について動物を追加して検討するとともに、妊娠 3 日のラットについて TCDD を投与し、母体、胎児について観察を行った（鈴木）。

### ② 発がん性

Tg/AC マウスと AhR 遺伝子欠失マウ

スト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。また、これらに対する皮膚発がん 2 段階モデル (DMBA+TPA)、および肝発がん 2 段階モデル (DEN+PB) をそれぞれ実施した (菅野)。

### ③ 障害発現への AhR の関与

マウスの CYP1A2 遺伝子のプロモーター領域を CAT 遺伝子上流に結合したレポーター遺伝子を用いた実験により、遺伝子上流 2.1kb 付近に誘導剤に応答する配列が存在することを以前の実験から得ていたため、この配列に系統的に変異を導入したレポーター遺伝子を作製し、Hepa-1 細胞、または Hep3B 細胞に導入して、エンハンサー配列を決定し、その配列に結合する因子をゲル移動度シフト法によって検討する。また AhR と Arnt がこの誘導にどのように関わっているのかを明らかにする。AhR 欠失マウスのベンツピレン発癌感受性については東大・院・医・石川隆俊教授グループと共同実験により行う (藤井)

慢性変動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実験動物は Sprague-Dawley 系雄ラットに 2,3,7,8-tetrachlorobenzo-p-dioxin (TCDD、 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ ) を腹腔内投与し、(1群) 7 日間の慢性変動ストレス 1 日目：尾の痛み刺激 5 分間。2 日目：30 分間の強制水泳 (水温  $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ )。3 日目：1 時間の金網による拘束。4 日目：17 時間の絶食。5 日目：尾の痛み刺激 5 分間。6 日目：17 時間の絶飲。

7 日目：1 時間の金網による拘束。2 日目から 6 日目の 5 日間、ストレス負荷前に TCDD を投与。

(2群) CVS なし。1 群と同じ期間、TCDD を投与。(3群) CVS 実施、2nd day から 6th day の 5 日間、ストレス負荷前に生食を投与。(4群) CVS なし。1 群と同じ期間、生食を投与。

最終ストレス終了後、[14C]-2-deoxyglucose (2DG、 $50\mu\text{Ci}/\text{rat}$ 、腹腔内投与) を投与し、45-60 分後に断頭して  $20\mu\text{m}$  の脳凍結切片を作成し、脳組織の単位面積当たりの放射エネルギーを BAS2000 で定量解析し、各群の前頭皮質糖代謝を比較検討した。

また、胎生期ダイオキシン類曝露の神経系発達に対する影響について、胎生期に ACTH、ダイオキシン類処置を加えたラットを作成し、出生した仔ラットを雌雄に分別して 7 週令に達した時点で仔ラットに急性ストレスとして、高架式十字迷路によって、不安関連行動 (10 分間の open arm へ入る回数、および open arm に滞在する時間の積算) を測定すると共に、胎生期に生理食塩水を処置した対照と比較した (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

海外における最新のダイオキシン類の汚染・曝露状況や健康影響に関する研究の進展状況に関する情報を収集するため、本年度は、米国のカリフォルニア州モントレイ開かれた Dioxin' 2000 で得た最新の知見についてまとめた (広瀬)。US-EPA が 1995 年に引き続き、新たに 2000 年 6 月に提示した「ダイオキシン類に関

する再評価ドラフト」について検討した（黒川）。

#### 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

低頻度で口蓋裂を発生させる量の PCTs を投与している ddY マウスに、単独では口蓋裂を発生させない量のコルチコステロンを投与したところ口蓋裂の発生に増加がみられたことから、PCTs 口蓋裂の成因にコルチコステロンが関与することが示唆された。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り、PCTs 投与による口蓋裂感受性と逆の関係にあることから AhR 遺伝子欠失マウスに PCTs を投与して口蓋裂の発現を観察したところホモ欠失マウスにも対照としたワイルドマウスとほぼ同様に発現がみられ、TCDD と PCTs の口蓋裂発生機構の違いが示唆された（金子）。ダイオキシン類の毒性発現機序の一つとして、活性酸素による脂質過酸化があるが、活性酸素発生に関係する肝臓のキサンチン脱水素酵素・キサンチン酸化酵素がダイオキシンにより誘導されることを発見した。さらに、ダイオキシンの毒性発現を仲介するとされるダイオキシン受容体(AhR)遺伝子ノックアウトマウスを用い、この酵素誘導にダイオキシン受容体が関与していることを認めた（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。妊娠初期への TCDD の投与において重篤な奇形は認められず、0.5~4.0 $\mu$ g/kg の範囲で突然変異誘発発性は無いと考えられた。0.5 $\mu$ g/kg 以上で腎盂の拡張と尿管の拡張が認められた。NOAEL は 0.5 $\mu$ g/kg と考えられた（鈴木）。

##### ②発がん性

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い、AhR 遺伝子欠失マウスの背景である C57BL/6 マウスを TG/AC マウスの背景である FVB マウスの F1 において、陽性対照プロモーター物質として用いた DMBA+TPA の 2 段階皮膚発ガン実験においてケラチノサイト由来の腫瘍(melanocytic tumor)は、TG/AC には依存せず、DMBA 投与にのみ依存することが判明した（菅野）。

##### ③障害発現への AhR の関与

ダイオキシンの障害発現機構については、アリル hidrocarbon 受容体(AhR)が直接 XRE に結合して標的遺伝子の発現を活性化するメカニズムの他に AhR と Arnt のヘテロ2量体がコアクチベーターのように DNA 結合性の転写因子に結合して転写を活性化するメカニズムがあることを発見した。

CYP1A2 遺伝子の発現は AhR を欠失したマウスでは、その構成的発現は残っているが、ダイオキシンやメチルコラントレンによる誘導的発現は失われる。CYP1A1 の発現が AhR の欠失マウスでは構成的発現も、誘導的発現も全く失われることと対照的である。CYP1A2 プロモーター領域にこの発現に関与しているエンハンサー配列 (CATG N<sub>6</sub> CTTG) を見出し、この配列に結合する因子を精製して、その部分アミノ酸配列からその因子の cDNA を単離した。AhR と Arnt のヘテロ2量体はこの因子に結合して CYP1A2 の誘導的発現をコントロールする(藤井)。

成熟ラットにダイオキシン類を連続投与し、慢性変動ストレスが与える脳内代謝の変化と比較したところ、ダイオキシン類曝露によって、ラット前頭皮質の糖代謝は影響を受けず、成熟後のダイオキシン類曝露が中枢神経系に与える影響は明瞭ではなかった。さらに胎生期のストレス負荷が、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明らかにするため、胎生期にダイオキシン類、生理食塩水注射によるストレスを加えたラットを作成し、行動学的観察を行った。高架式十字迷路で観察される不安関連行動は胎生期生理食塩水投与群では有意に亢進していたのに対し、胎生期ダイオキシン曝露ラットでは、不安関連行動発達に障害が生じている可能性が示唆された(三国)。

(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

海外における最新のダイオキシン類の汚染・暴露状況や健康影響に関する研究の

進展状況に関する情報を収集するため、本年度は、米国のカリフォルニア州モンレー開かれた Dioxin'2000 で得た最新の知見についてまとめた(広瀬)。

ダイオキシン規制の国際動向について、平成12年度は、US-EPA が1995年に引き続き、新たに2000年6月に提示した「ダイオキシン類に関する再評価ドラフト」について検討した。全体は、暴露、健康影響、リスク評価の3部分に分かれている。発がん性に関して、今回の文書においては、2,3,7,8 TCDD を明らかな human carcinogen、ダイオキシン類の混合物及びその他のダイオキシン様化合物を likely human carcinogen に分類している。1998年に WHO/IPCS が提示した TDI 1-4pg TEQ/kg/day はリスクマネジメントには有用な値として結論づけている。厚生省ダイオキシン類健康影響評価特別部会では、「現時点において、我が国におけるTDIを早急に再検討する必要性を示唆する知見は、この再評価ドラフト等からは得られなかった」と結論した。(黒川)

#### E. 結論

① 奇形誘発: マウスに誘発される口蓋裂発生のメカニズムについて、PCTs口蓋裂の検討を行った。同時に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当研究者は以前に見出しており、この変化についても、PCTs投与マウスで解析をおこなった。ダイオキシンのマウス二次口蓋間葉の増殖抑制作用については、ダイオキシン類の各種増殖因子への影響の解析などにより、口蓋裂誘発の分子機構を解明するための基礎を提供するものと思われる。また、マウス口蓋ヒダ異常については、異常パターンを分類したうえ、レチノイン酸など他の口蓋

裂誘発因子によるものと比較している。この成果は国際的にも評価され、化学物質の発生毒性試験に利用されつつある。キサンチン脱水素酵素・キサンチン酸化酵素の誘導については、低酸素誘発可能因子1a(hypoxia inducible factor-1a, HIF-1 a)誘導因子である塩化コバルトでも誘導されることも見出した。この所見はダイオキシン類の毒性発現におけるHIF-1 aの関与を解析するのに活用されるものと予測される。これらの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として利用されることが期待される(金子・安田)。

*in vitro* ではウイスターハノーバーとウイスター今道ラットは AhR の感受性が鈍いとされているが、今回の *in vivo* のデータは感受性が鈍いと言うこともなく、標的臓器における異常も他の報告と類似しており、2回の実験で再現されていることから、これらの動物を TCDD の実験に用い得ることが判明した。また、今回の妊孕能の確認試験は、形態学では分からない機能異常を検出しており、発生生殖毒性の有用な試験法であることが確認された。特に、性的二型核への影響がない形での雄の生殖行動異常(性欲の亢進、交尾行動増加、妊孕能喪失)については、今回初めて把握された現象であり、今後さらにその機序の解明が必要になる。このエンドポイントとして  $1\mu\text{g}/\text{kg}$  の1回投与が現時点での LOAEL であり、さらに用量を低くして影響を見る必要も生じている(鈴木)。

② 成熟期における発癌性:TCDDの有

害作用の一つである発がん性は、この物質に変異原性が認められないことから、epigenetic な機構に依ることが示唆され、佐井らの、培養細胞を用いた検討から、そこに ras 遺伝子が関与するものと考えられる事から、このメカニズムの検討には、Tg/AC マウスおよび Bhas42 細胞のような系が適切であると考えられる。しかし、BALB/3T 細胞および F1 由来の MEF(mouse embryo fibroblast)にv-Ha-rasを導入した Bhas42 細胞では、増殖効果および GJIC(gap junction intercellular communication)切断についてはっきりしない結果を得ており、今後の検討が必要であるとする(菅野)。

③ダイオキシンの障害発現機構: AHRの新しい作用メカニズムを明らかにした。このことにより AhR の新しい標的遺伝子がさらに見出される可能性が出て来た。また、AhR/ArntはbHLH-PAS構造モチーフを持つ転写因子であるが、同じ構造モチーフを持つもので、コアクチベーターとして発見された SRC-1、pCIPなどが知られている。AhR/ArntはDNA結合性転写因子としても働き、コアクチベーターとしても働く多機能性の因子であることが分かった。AhRはベンツピレンの発癌に関わっていることが明らかにされたが、奇型や胸腺萎縮等多くのダイオキシンの生物作用にも関与していることが証明されて来ており、ダイオキシンの示す生体毒の殆どに関与している可能性が示唆された(藤井)。

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検討し、胎生期のダイオキシン類曝露は、不安関連行動の



発達に障害を与え、危険に対し適切な行動をとる機構に影響を及ぼしている可能性が示唆された。今後さらに行動学的解析、さらに神経内分泌学的機能を評価し、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をさらに解明することにより、治療法や予防法を確立するための対応が可能となると考えられる。(三国)

④毒性学的研究における国際動向等：Ah-レセプター自体の解析では、TCDDに対する感受性が、C末側の転写調節領域の構造に関係しているという状況証拠も揃いつつあるようである。このあたりの研究は、Ah-レセプターと各種の核内Co-factorとの相互作用により、どのように毒性が発現されているかを解析する上で、興味深いものである。さらに、毒性発現の分子学的アプローチとはべつに、毒性評価の上では体内動態に関する知見も必要である。この意味において、今回のシンポジウムで、授乳経路による胎児の各臓器におけるTCDD体内動態の解析結果は、生殖器毒性を評価する上で重要な知見であると考えられる。

また、ダイオキシン類による子宮内膜症の発症に関しては、免疫系の関与が示唆されているが、さらに増殖因子であるTNF $\alpha$ が分子メカニズム的に関係していることが突き止められようとしている。さらに、Ah-レセプターの発現制御に各種の増殖因子が関わっていること明らかにされ、特に、Ah-レセプター遺伝子の5'上流の転写調節部位の解析が進んだようである。また、胎児期暴露による前立腺への影響に関しては、前立腺腹葉におけるアンドロゲンレセプターmRNAの発現抑制の関与が示唆されるな

ど、Ah-レセプターの発現制御の解析と共に、細胞特異的な毒性発現メカニズムの解析が、これからの大きな課題であると考えられた(広瀬)

我が国におけるTDIの再評価の必要性に係る検討に際して、留意すべきと考えられる点は、ヒトの感受性の個体差である。すなわち、マウスではダイオキシン感受性に大きな系統差があることが知られており、ヒトでも同様の幅広い個体差があるならば、不確実係数が10でよいのかが問題となる。なお、現時点ではヒトの感受性に10倍以上の個体差があることは確認されていない。(黒川)

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もみても、ダイオキシン問題はすべからず分子毒性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場所は大きい。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. 論文発表

- 1) B.-I Yoon, T.Inoue and T.Kaneko :

- Teratological effect of 2,3,7,8 - tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) : induction of cleft palate in the ddY and C57BL/6 mouse.. J.Vet. Sci. 1(2), 113-119
- 2) B.-I Yoon, Y.Hirabayashi, T.Kaneko, Y.Kodama, J.Kanno, J.Yodoi, D.Y. Kim, and T.Inoue: Transgene Expression of Thioredoxin (TRX/ADF) Protects Against 2,3,7,8-Tetrachloro dibenzo-p-Dioxin(TCDD): Induced Hematotoxicity. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 41, 232-236, 2001
  - 3) B.-I Yoon, Y.Hirabayashi, Y. Ogawa, J.Kanno, J.Yodoi, T.Inoue, and T.Kaneko: Hematopoietic cell kinetics after intraperitoneal single injection of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin(TCDD) in mice. Chemosphere 43, 819-822, 2001
  - 4) Sugihara, K., et al.: Aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated induction of xanthine oxidase/xanthine dehydrogenase activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p dioxin. Biochem. Biophys. Res. Com., 281: 1093-1099, 2001.
  - 5) Suzuki, H., M. Kokado, K. Saito, T. Kunieda and K. Suzuki (1999) A locus responsible for hypo-gonadism (hgn) is located on rat Chromosome 10. Mammalian Genome 10(11): 1106-1107.
  - 6) Akimoto, T., H. Suzuki, Y. Arai, K. Nakama and K. Suzuki (2000) Locus of dominant hairless gene (Ht) causing abnormal hair and keratinization maps to rat chromosome 10. Experimental Animal 49(2): 137-140.
  - 7) Suzuki H., S. Fukaya, K. Saito and K. Suzuki (2000) A locus responsible for osteochondro-dysplasia (ocd) is located on rat Chromosome 11. Mamm. Genome. 11(6): 464-465.
  - 8) Uchibori, M., K. Saito, S. Yokoyama, T. Tsuji, H. Suzuki and K. Suzuki (2000) Monitoring and analysis of the EEG spikes frequency in E1 mice during sleep: A new application of wavelet transform. Physiol. Behav. (in submission).
  - 9) 鈴木勝士、他 13 名(著)(2000)XIII. 遺伝性疾患、内藤喜久、浜名克己、元井菫子編、生産獣医療における牛の生産病の実際、p207-216、文永堂、東京
  - 10) 鈴木勝士、他 83 名(訳)(2000)第 114 章、隣臓内分泌部の外科的疾患、高橋貢、佐々木信雄監訳、スラッター小動物の外科手術：(Slatter, D: Textbook of Small Animal Surgery (2nd Ed.), WB Saunders Co., Philadelphia 1993)、文永堂、東京、p1667-1678.
  - 11) 鈴木勝士、他 44 名(2000) 2.2.3.子宮内暴露試験、2.2.4.一世代繁殖試験、井上達監、今井清、長村義之、加藤正信、菅野純編、内分泌化学物質の生物試験研究法、シュプリンガー・フェアラーク東京、東京、p85-106
  - 12) 鈴木勝士(2000)ナイトセッション Dose-response. 森田昌敏、緊急企画 内分泌攪乱化学物質問題に関する国際シンポジウム'99-各座長に

- よる包括報告一、資源環境対策  
36(2):156-157.
- 13) 高須正規、高橋純子、齊藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士(2000)マウス脳硬膜上からの聴覚脳幹誘発電位(第2報)、電子情報通信学会技術研究報告 MBE99-152:43-47
- 14) Sai K, Kanno J, Hasegawa R, Trosko JE, Inoue T., Review Prevention of the down regulation of gap junction intercellular communication by green tea in the liver of mice fed pentachlorophenol., *Carcinogenesis*. 21(9):1671-6, 2000
- 15) Iwama T, Kamikawa J, Higuchi T, Yagi K, Matuzaki T, Kanno J, Maekawa A., Development of invasive adenocarcinoma in a long-standing diverted ileal J-pouch for ulcerative colitis: *Dis Colon Rectum*. 43(1): 101-4, 2000
- 16) Fujiwara M, Okayasu I, Oritsu M, Komatsu J, Yoshitsugu M, Katoh Y, Bandoh T, Toyoshima H, Kase Y, Sugihara K, Kanno J, Hayashi Y., Significant increase in prostaglandin E-main urinary Metabolite by laxative administration: comparison with ulcerative colitis., *Digestion*.;61(3):201-6, 2000
- 17) B.-I Yoon, Y.Hirabayashi, T.Kaneko, Y.Kodama, J.Kanno, J.Yodoi, D.Y. Kim, and T.Inoue: Transgene Expression of Thioredoxin (TRX/ADF) Protects Against 2,3,7,8-Tetrachloro dibenzo-p-Dioxin(TCDD): Induced Hematotoxicity. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 41, 232-236, 2001
- 18) B.-I Yoon, Y.Hirabayashi, Y. Ogawa, J.Kanno, J.Yodoi, T.Inoue, and T.Kaneko: Hematopoietic cell kinetics after intraperitoneal single injection of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD) in mice. *Chemosphere* 43, 819-822, 2001
- 19) 菅野 純, 内分泌かく乱化学物質試験法-スクリーニング試験法、測定法、毒性試験: In vivo 系を用いた暴露試験による評価, *日本臨床*, 58, 12, 121-127, 2000
- 20) Shimizu, Y., Nakatsuru, Y., Ichinose, M., Takahashi, Kume, Y.H., Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y. & Ishikawa, T. Benzo[a] pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 97, 779-782 (2000)
- 21) Takahata, S., Ozaki, T., Mimura, J., Kikuchi, Y., Sogawa, K. & Fujii-Kuriyama, Y. Transactivation mechanisms of mouse clock transcription factors, mClock and mArnt3. *Genes to Cells*, 5, 739-747 (2000)
- 22) Nakayama, M., Takahashi, K., Kitamuro, T., Yasumoto, K., Katayose, K., Shiota, K., Fujii-Kuriyama, Y. & Shibuhara, S. Repression of heme oxygenase-1 by hypoxia in vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 271, 665-671 (2000)

23) Hosoya, T., Oda, Y., Takahashi, S., Morita, M., Kawauchi, S., Ema, M., Yamamoto, M. & Fujii-Kuriyama, Y. Defective development of secretory neurons in the hypothalamus of Arnt2-knockout mice. *Genes to Cells*. In print (2001)

24) Umemura, T., Kodama, Y., Kurokawa, Y. & Williams, GM: Lack of oxidative DNA damage or initiation of carcinogenesis in the kidneys of male F344 rats given subchronic exposure to p-dichlorobenzene (pDCB) at a carcinogenic dose. *Arch. Toxicol.*, 73:54-59(2000)

25) 黒川雄二:ダイオキシンのTDI(耐容一日摂取量)について. *食品衛生研究*, 50:73-77(2000) 長谷川隆一, 小泉睦子, 鎌田栄一, 広瀬明彦, 菅野誠一郎, 高月峰夫, 黒川雄二; *Topics on Regulatory Toxicology(15)OECD 化学物質対策の動向(第3報)*. *J. Toxicol. Sci.* 25, App. 83-96(2000)

26) 黒川雄二:医薬品及び動物用医薬品毒性試験ガイドラインの現況. *獣医畜産新報*, 53:655-659 (2000).

## 2. 学会発表

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

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

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

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

4) 高須正規, 高橋純子, 斎藤賢一, 鈴木浩悦, 鈴木勝士(2000)マウス脳硬膜上からの聴覚脳幹誘発電位(第2報), 電子情報通信学会, ME とバイオサイバネティクス研究会, p.43

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

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

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

8) 田村 啓, 三森国敏, 小野寺博志, 高木久宜, 森安真津子, 鈴木勝士, 広瀬雅雄

- (2000)ラット甲状腺二段階発癌における下垂体除去の影響と外来性 TSH の修飾作用、第 129 回日本獣医学会
- 9) 日比佐知子、岩間良子、小川実幸、尼崎肇、鷹巣雅峰、鈴木浩悦、鈴木勝士、孫偉勇、塩田邦郎(2000)マウスロ蓋ヒダ形成位置とプラコード形成・細胞増殖・アポトーシス・細胞周期関連因子の発現分布の関係、第 129 回日本獣医学会
- 10) 秋元敏雄、鈴木浩悦、仲間一雅、鈴木勝士(2000) WBN/IIa-Ht rat のヘアレス遺伝子(Ht)のラット第 10 染色体上へのマッピングおよびヌードラットとの相補性試験、第 47 回日本実験動物学会
- 11) 鈴木勝士(2000)動物の疾患の遺伝子、第 26 回日本比較臨床血液学会
- 12) 鈴木勝士、斉藤賢一、鈴木浩悦、竹中基郎、八木未央(2000)エストロン投与による鶏胚での発生攪乱、第 40 回日本先天異常学会
- 13) 斉藤賢一、内堀雅隆、横山修一、辻隆之、鈴木浩悦、鈴木勝士(2000)先天性癲癇モデル動物(EI Mouse)における睡眠時脳波の解析、第 40 回日本先天異常学会
- 14) 鈴木勝士、斉藤賢一、鈴木浩悦、竹中基郎、八木未央、岡田美香(2000)エストロン投与による鶏胚での発生攪乱について、第 130 回日本獣医学会
- 15) 秋元敏雄1)、鈴木浩悦2)、仲間一雅1)、鈴木勝士(2000)Hairless rat(WBN/IIa-Ht)の原因遺伝子 Ht とヌードラットとの相補性試験。(F1 および F2 の表現型について)、第 130 回日本獣医学会
- 16) 丸ひろみ、鈴木浩悦、高橋純子、井出雅子、大村 彰、斉藤賢一、鈴木勝士(2000)骨軟骨形成不全症ラット病因遺伝子の探索:外交配系での表型調査と病因遺伝子座周辺の連鎖地図の作成、第 130 回日本獣医学会
- 17) 竹中基郎、鈴木浩悦、石坂みゆき、斉藤賢一、鈴木勝士(2000) Wistar-Imamichi ラットクローズドコロニーで発見された神経症状を伴う矮小ラット、第 130 回日本獣医学会
- 18) 高橋純子、斉藤賢一、高須正規、鈴木浩悦、鈴木勝士(2000)EI および ddY マウス脳硬膜上からの聴覚脳幹誘発反応(ABR)の解析、第 130 回日本獣医学会
- 19) 鈴木浩悦、高橋純子、丸ひろみ、斉藤賢一、鈴木勝士(2000)骨軟骨形成不全症ラット病因遺伝子の探索:RH パネルでの連鎖マーカーの配列と系統内多型を用いたファインマップの作成、第 130 回日本獣医学会
- 20) 千葉純子、中宮英二郎、鈴木浩悦、斉藤賢一、鈴木勝士(2000)ウイスターイマミチラット由来近交系統間での ocd 遺伝子座周辺の多型性、第 130 回日本獣医学会
- 21) 尼崎 肇、小川美幸、日比佐知子、岩間良子、鈴木浩悦、鈴木勝士、孫 偉勇、塩田邦郎(2000)マウスロ蓋ヒダ形成配列に関連する PAL31 の mRNA の発現分布、第 130 回日本獣医学会
- 22) 岡田美香、鈴木浩悦、千葉純子、醍醐久美、中宮英二郎、八木未央、斉藤賢一、鈴木勝士(2000)ラット精巣形成不全症(hgn / hgn)の胎生期病態発生に関する検討、第 130 回日本獣医学会
- 23) 鈴木勝士(2000)期鶏胚に及ぼすエストロジェンの発生障害作用を中心にして、第 130 回日本獣医学会
- 24) 田村 啓、三森国敏、小野寺博志、那須昌弘、高木久宜、安原加壽雄、上田誠、鈴木勝士、広瀬雅雄(2000)ラット甲状腺二段階発癌モデルにおける麴酸イニシエーション期投与の影響、毒性病理学会
- 25) Kanno J, Kato H, Inoue T, Uterotrophic effect of dietary genistein/daidzein-Modification of NIH-07 open formula-.Hormones and Endocrine Disrupters in Food and Water: Possible Impact on Human Health Copenhagen, Denmark, 27-30

- May 2000
- 26) Kimie Sai, Jun Kanno, Tohru Inoue, and Toyozo Kaneko, Effects of TCDD on GJIC and cell growth in v-ras-transfected rat liver epithelial cells. Dioxin 2000, August 13-17, 2000
- 27) Jun Kanno, Kimie Sai, Ryuichi Hasegawa, James. E. Trosko and Tohru Inoue, Prevention of the down-regulation of gap junctional inter-cellular communication by green tea in the liver of mice fed pentachlorophenol. The 2<sup>nd</sup> Congress of Asian Society of Toxicology ASIATOX II, August 23-25, 2000
- 28) "Regulation and function of Ah receptor and ARNT heterodimer" Fujii-Kuriyama, Y. (招待講演) (NIEH)
- 29) "Repression mechanisms of AhR/Arnt heterodimer by AhRR" Mimura, J., Baba, T., Sogawa, K. & Fujii-Kuriyama, Y. 2000/4/17-20 2000 PAS Proteins: Sensors of Environmental and Developmental Signals (USA)
- 30) "Regulatory Mechanisms of Ah (Dioxin) Receptor Functions" Fujii-Kuriyama, Y. 2000 / 4/20 2000 Special Biochemistry Seminar (Vanderbilt Univ. USA)
- 31) "アリルハイドロカーボン(ダイオキシン)受容体の転写活性化機構とその調節" 藤井義明 2000/6/3 日本生化学会東北支部会 (盛岡地域交流センター)
- 32) "Regulatory Mechanisms of Ah Receptor Function" Fujii-Kuriyama, Y., Mimura, J., Sogawa, K. & Baba, T. 2000/7/6-10 International Workshop P450 (From Sequence to Function: Experimental and Bioinformatic Studies of Cytochrome P450 Superfamily P450 Moscow-2000) (Moscow, Russia)
- 33) "Regulatory Mechanisms of Transcription Activity of Ah Receptor" Fujii-Kuriyama Y. 2000/7/10-14 13<sup>th</sup> International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations (Congress Center Stresa, Italy)
- 34) "環境因子と転写因子" 藤井義明 2000/7/20-22 内分泌・代謝学サマーセミナー(北海道)
- 35) "Ah 受容体の機能と調節" 藤井義明 2000/8/23-25 日本比較免疫学会(東京)
- 36) "芳香族炭化水素受容体ノックアウトマウスにおける三種の発がん性芳香族炭化水素の発がん感受性" 中鶴陽子<sup>1</sup>、清水靖仁<sup>1</sup>、小田秀明<sup>1</sup>、岩坂茂<sup>1,2</sup>、藤井義明<sup>2</sup>、石川隆俊<sup>1,3</sup>(<sup>1</sup>東大・医・分子病理、<sup>2</sup>東北大・理・化学、<sup>3</sup>大学評価・学位授与機構)
- 37) "Ahレセプター・Arnt二量体によって仲介されるラット P4501A2 遺伝子の新しい誘導機構" 十川和博、菊池康夫、藤井義明 (東北大・理・化学)
- 38) "ヒト AhR 遺伝子の単球分化に伴う転写調節" 渡辺潤子<sup>1</sup>、角純子<sup>1</sup>、生田統悟<sup>1</sup>、本間義夫<sup>1</sup>、十川和博<sup>2</sup>、藤井義明<sup>2</sup>、川尻要<sup>1</sup>(<sup>1</sup>埼玉がんセ・研、<sup>2</sup>東北大・院理・化学) 2000/10/4-6 日本癌学会 (横浜)

- 39) “Ah 受容体の機能とその調節” 藤井義明<sup>1,2</sup>、三村純正<sup>1</sup>、馬場崇<sup>1,2</sup>、十川和博<sup>1</sup> (1 東北大院・理・化学、<sup>2</sup> 科技団・CREST)
- 40) “生殖腺の性分化と核内受容体の機能” 諸橋憲一郎<sup>1,2,3</sup>、中村直仁<sup>1,2</sup>、鈴木大河<sup>1,4</sup>、向井徳男<sup>1,5</sup>、難波智<sup>1,6</sup>、水崎弘文<sup>1,3</sup>、河辺顕<sup>1,7</sup>、藤井義明<sup>2,8</sup> (1 基生研、<sup>2</sup> 科技団・CREST、<sup>3</sup> 総研大院、<sup>4</sup> 京大院・ウイルス研、<sup>5</sup> 北大院・医、<sup>6</sup> 東大院・医、<sup>7</sup> 九大院・医、<sup>8</sup> 東北大院・理)
- 41) “ AhRR 遺伝子の発現制御機構の解析” 馬場崇、三村純正、十川和博、藤井義明 (東北大・院・理)
- 42) “ラット P4501A2 遺伝子に見いだされた新しい XRE 配列とその性質” 十川和博<sup>1</sup>、高橋智<sup>1</sup>、松下夏樹<sup>1</sup>、沼山恵子<sup>1</sup>、三浦千沙<sup>1</sup>、仁川純一<sup>2</sup>、菊池康夫<sup>1</sup>、藤井義明<sup>1</sup> (1 東北大院・理・化学、<sup>2</sup> 九州工大・情報工・生物化学システム工)
- 43) “AhRR による転写抑制機構” 三村純正、馬場崇、十川和博、藤井義明 (東北大院・理)
- 44) “大腸菌で発現させた PAS ドメインの性質と結晶化” 菊池康夫、三村純正、依馬正次、十川和博、藤井義明 (東北大・院・理)
- 45) “新生マウスの酸素負荷網膜症発症モデルの血管新生における HLF の役割” 守田匡伸<sup>1</sup>、中島修<sup>2</sup>、高橋智<sup>2</sup>、川内紫真子<sup>2</sup>、山下年晴<sup>1</sup>、依馬正次<sup>1</sup>、柴原茂樹<sup>3</sup>、鶴殿徹男<sup>3</sup>、富田浩史<sup>3</sup>、玉井信<sup>3</sup>、十川和博<sup>1</sup>、山本雅之<sup>2</sup>、藤井義明<sup>1</sup> (1 東北大・院・理、<sup>2</sup> 筑波大・TARA セ、<sup>3</sup> 東北大・院・医)
- 46) “ヒト血管内皮細胞における低酸素によるヘムオキシゲナーゼ<sup>1</sup>の発現抑制” 中山雅晴<sup>1</sup>、高橋和広<sup>1</sup>、北室知己<sup>1</sup>、安元研一<sup>1</sup>、片寄大<sup>2</sup>、白土邦男<sup>2</sup>、藤井義明<sup>3</sup>、柴原茂樹<sup>1</sup> (1 東北大・医・分子生物、<sup>2</sup> 東北大・医・循環器病態、<sup>3</sup> 東北大・理・化) 2000/10/11-14 日本生化学会 (横浜)
- 47) “生物の環境応答と bHLH-PAS 転写因子” 藤井義明 2000/11/24 東京大学分子細胞生物学研究所シンポジウム (東京)
- 47) “外来異物に対する生体応答のメカニズム” 藤井義明、三村純正、馬場崇、十川和博 (東北大・院・理)
- 48) “Ah リセプターと Arnt のヘテロダイマーをコアアクチベーターとして要求する転写因子の同定” 沼山恵子<sup>1</sup>、十川和博<sup>1</sup>、高橋智裕<sup>1</sup>、和田忠士<sup>2</sup>、半田宏<sup>2</sup>、藤井義明<sup>1</sup> (1 東北大院・理・化、<sup>2</sup> 東工大・フロンティア)
- 49) “ダイオキシンによる女性ホルモン攪乱作用の分子メカニズムの解析” 大竹史明<sup>1</sup>、武山健一<sup>1,3</sup>、柳澤純<sup>1,3</sup>、佐藤隆史<sup>1</sup>、藤井義明<sup>2,3</sup>、加藤茂明<sup>1,3</sup> (1 東大・分生研、<sup>2</sup> 東北大・院理・化学、<sup>3</sup> 科技団・CREST)
- 50) “成体での血管新生における HLF の役割” 守田匡伸<sup>1</sup>、高橋智<sup>2</sup>、中島修<sup>2</sup>、川内紫真子<sup>2</sup>、山下年晴<sup>1</sup>、依馬正次<sup>1</sup>、柴原茂樹<sup>3</sup>、十川和博<sup>1</sup>、山本雅之<sup>2</sup>、藤井義明<sup>1</sup> (1 東北大・院理、<sup>2</sup> 筑波大・TARA センター、<sup>3</sup> 東北大・院医)
- 51) “Arnt2 regulates the development of secretory neurons in mouse hypothalamus with Sim1 as a dimmer” Hosoya, T.<sup>1,2</sup>, Oda, Y<sup>1</sup>, Takahashi, S.<sup>2</sup>, Morita, M.<sup>1</sup>, Kawauchi, K.<sup>2</sup>, Ema, M.<sup>1</sup>, Yamamoto, M.<sup>2</sup>, Fujii-Kuriyama, Y.<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Tohoku Univ., Grad. Sch. Sci., Dept.  
Boil., <sup>2</sup>Tsukuba Univ., TARA Center)  
2000/12/13-16 日本分子生物学会(神  
戸)

**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

1. 外因性 Corticosteron (CS) による, ddY マウス胎児の口蓋裂 (CP) について、臨界 window および無作用量について検討した。口蓋裂の発生は胎生 12.5 日目をピークとして高率に認められ、単回皮下投与における無作用量は 50mg/kg であった。

2. PCTs 単独で口蓋裂が低頻度に発症する量を妊娠マウスに投与しておき、そこに単独投与では口蓋裂が発症しない量のグルココルチステロンを投与すると、口蓋裂の発症頻度に増加が見られた。このことから、PCTs による口蓋裂がグルココルチコイド系を介する機構を使用していることが示唆された。3. AhR 遺伝子欠失マウスでは、TCDD による口蓋裂の発症は見られないが、PCTs 投与では AhR 遺伝子欠失マウスにおいても口蓋裂が発症することを確認した。よって、口蓋裂発症には AhR を介する機構と、グルココルチコイド系を介する機構とが存在することが確認された。

A. 研究目的

ddY マウスにおける、CS による CP 発生の臨界 window および無作用量を見つけ、PCTs 単独で口蓋裂が低頻度に発症する量を投与しているマウスに CS を投与し、CS の発症率に増加があるかどうか検討し、口蓋裂発症の成因にグルココルチコイド系の関与について明らかにする。また、AhR 遺伝子欠失マウスに PCTs を投与し、口蓋裂の発症率を比較し、PCTs の AhR 遺伝子関与を検討する。

B. 方法：CS を 50mg/kg, 100mg/kg, 200mg/kg, 300mg/kg の用量になるよう

にコーン油に混合し、妊娠 10~14 日までの各妊娠日齢に 1 回、妊娠母体の頸背部皮下に単回投与した。妊娠 18 日目に帝王切開により胎児を取り出し、口蓋裂の有無を観察した。

次に、PCTs 1000ppm および 4000ppm 混餌飼料を対照として、PCTs 1000ppm 混餌飼料を妊娠 5 日目から母体に摂餌させ、妊娠 10-14 日のいずれかに一回、CS の口蓋裂を発生させないと確認した 50mg/kg を頸背部に皮下投与した。

また、PCTs の AhR 遺伝子関与の有無についての実験では、AhR +/+、+/-、

♂の雌雄マウスをランダムに交配させ、プラグを確認したマウスに PCTs の 4000ppm 混餌飼料を妊娠 0 日より給餌し、妊娠 18.5 日に母体を回復し、胎児の口蓋裂の発症をジェノタイプごとに比較した。

### C. 研究結果

CS 投与による母体毎の胎児口蓋裂発生率をグラフで示した (Fig. 1)。

口蓋裂の発生は妊娠 13.5 日の 100mg/kg 以上で見られ、妊娠 12.5 日、CS 300mg/kg 投与時における発生率が他より明らかに高く 31.04% を示した。

よって、マウス母体に単回投与しても胎児口蓋裂が発生しない CS 量は 50mg/kg であり、CP に対する臨界 window は 12.5 日であると考えられた。

PCTs 1000ppm・4000ppm をそれぞれ妊娠 5.5 日から 18.5 日までの期間、母体に自由に摂餌させ、帝王切開により胎児口蓋裂の発生率を比較した。その結果、1000ppm で 5.26%、4000ppm で 29.94% の発生率が得られた。

マウス用粉末飼料に 1000ppm の PCTs を混じて、上記と同じく妊娠 5 日目から母体に投与し、妊娠 10-14 日のいずれかに一回、胎児口蓋裂を発生させないと確認した CS の 50mg/kg を投与し、その結果を Fig. 2 に示した。

PCTs が CS を誘導しないのであれば、妊娠 10-14 日目の全てにおいて、口蓋裂発生率は 1000ppm の PCTs 単独摂餌投与した時の 5.26% を越えないはずである。しかし、PCTs と CS の複合投与で胎児の口蓋裂発生に増加が認められ、そ

の発生率は 1000ppm の PCTs 単独投与の 5.26% を越え妊娠 12 日目で 15.89% であった。

AhR 遺伝子欠失マウスに PCTs を投与し、口蓋裂の発症率を比較した結果、それぞれ、AhR +/+ : 37.8%、+/- : 22.0%、-/- : 27.6% で口蓋裂の発症に差が見られなかった (Table 1)。

### D. 考察

1000ppm の PCTs 単独投与より CS の複合投与において CP 発生率が増加する傾向がみられ、さらに臨界 window である妊娠 12.5 日において胎児 CP 発生率が複合投与で最も高いこと、副腎 11- $\beta$ -hydroxylase を阻害し、CS 合成を阻害する metyrapone を PCTs 投与妊娠マウスに処置することで、母体血漿 CS 量を減少させるとともに CP の発生が抑制される事実 (金子、1988) と合わせ考えると、PCTs の CP が内因性に増加する CS に起因することがより明確なつたと考えられる。

CS は体内で遊離型あるいは結合型として血中に存在し、結合型は CS binding protein に結合している。CS がその作用を示すのは遊離型のみで、CS を母体に大量投与しても母体自体に毒性を示さないのは、母体血中 CS の存在形態の大半が結合型であることが伺える。CS-binding globulin の母体血漿濃度は妊娠 12-18 日頃増加する。許容量範囲でのこの増加によって、母体血漿 CS 濃度の変動から胎児が保護されている可能性がある (David S.S. *et al.*, 1979) ことから、存在形態を今後検討しなければならない

と考える。

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

2,3,7,8- TCDD が胎児口蓋裂を誘導する作用機序として、胎児口蓋にある aryl hydrocarbon receptor (AhR) との関係が示唆されている (Abbott B.D. 1995)。一方、胎児組織に特定のレセプターが出現する時期と、母体血漿ホルモンが増加する時期との相互関係は、corticoid 誘発 CP への感受性に関して重要である (Kenneth S.B. *et al.* 1985) ことから今後これらの検討がなされなければならないと考える。

CS の生体内における存在形態やレセプターが出現する時期と母体血漿ホルモンが増加する時期との相互関係、ヒトと実験動物や実験動物間の種差、TCDD と PCTs 等の感受性系統差がおこる原因や化学物質間での口蓋裂の成因の相違をより明確に究明することが、ヒトでの安全性を評価する上で重要であると考えられる。

PCTs の投与により、口蓋裂発生時に糖質コルチコイド濃度の一過性の上昇が認められることを以前に見出したが、今後、この点と AhR を介する機構との関係について、遺伝子発現解析などを組み合わせた検討が計画される。

## E. 結論

口蓋裂発症には AhR を介する機構と、グルココルチコイド系を介する機構とが存在することが確認された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) B.-I Yoon, T. Inoue and T. Kaneko : Teratological effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD): induction of cleft palate in the ddY and C57BL/6 mouse.. *J. Vet. Sci.* 1(2), 113-119
- 2) B.-I Yoon, Y. Hirabayashi, T. Kaneko, Y. Kodama, J. Kanno, J. Yodoi, D.Y. Kim, and T. Inoue: Transgene Expression of Thioredoxin (TRX/ADF) Protects Against 2,3,7,8-Tetrachloro dibenzo-p-Dioxin (TCDD): Induced Hematotoxicity. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 41, 232-236, 2001
- 3) B.-I Yoon, Y. Hirabayashi, Y. Ogawa, J. Kanno, J. Yodoi, T. Inoue, and T. Kaneko: Hematopoietic cell kinetics after intraperitoneal single injection of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD) in mice. *Chemosphere* 43, 819-822, 2001

### 2. 学会発表

- 1) B.-I Yoon, Y. Hirabayashi, T. Kaneko, Y. Kodama, Jun Kanno,

J.Yodoi and T.Inoue, Transgene expression of Thioredoxin (TRX/ADF) protects against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD-induced hematotoxicity Dioxin 2001, September 9-14, 2001

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし