

Fig.1 Incidence of Cleft Palate in ddY Mice Administearred with Corticosterone

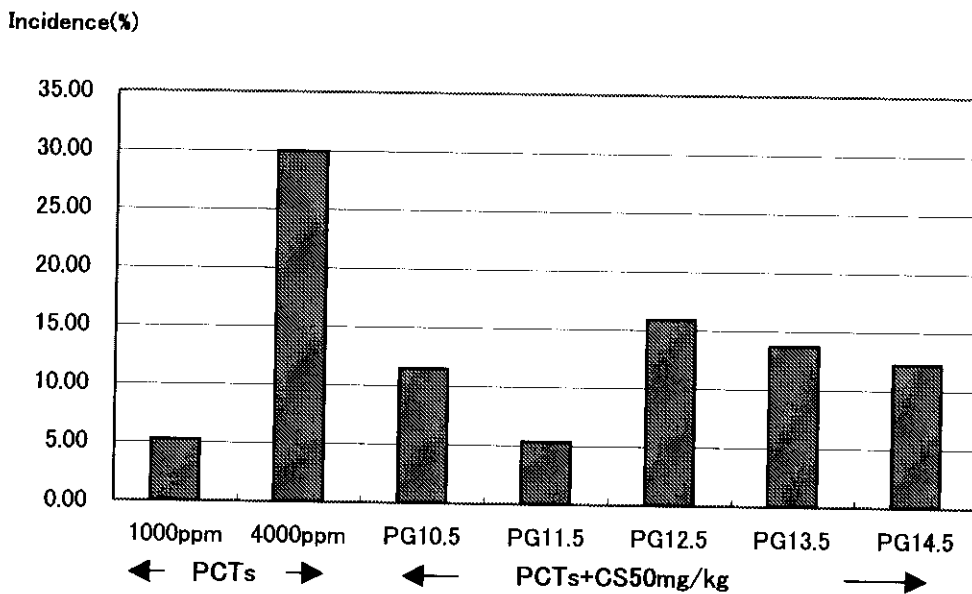


Fig. 2 Effect of Corticosterone on the Incidence of Cleft Palate in ddY Mice Fed PCTs from Gd 6.5

Table 1 Cleft Palate Incidence of
AhR KO Mice fed PCTs

A	:	8/29	(27.6%)
H	:	11/50	(22.0%)
W	:	14/37	(37.8%)

分子奇形学的検討

分担研究者 安田 峯生 広島大学医学部

研究要旨

ダイオキシン類のマウスでの毒性発現機序の一つに脂質過酸化があるとされる。われわれは活性酸素類を生成するキサンチン酸化酵素およびキサンチンデヒドロゲナーゼが TCDD 投与を受けたマウス肝臓で上昇することを見出した。本活性増加はダイオキシン受容体(AhR)遺伝子欠損マウスでは認められないことから、AhR を介する作用であることが明らかになった。これらの所見から、これらの酵素がダイオキシンの毒性発現に関与している可能性が示唆される。

A. 研究目的

ダイオキシン類の中で最も毒性が強い 2,3,7,8-四塩化ジベンゾパラジオキシン(TCDD)は、マウス胎児に口蓋裂や水腎症を誘発するが、われわれはその毒性発現機序にアリール炭化水素受容体(AhR)が介在していることを明らかにした。そこで AhR 以後の毒性発現メカニズムの解明を目的として、マウス肝臓における TCDD による新規酵素誘導を検索した。

B. 研究方法

実験には野生型 C57BL/6J マウスと AhR 遺伝子欠如マウス(Ahr^{-/-})を用いた。成熟マウスにコーンオイルに溶解した TCDD20~80 µg/kg を1回強制経口投与した。対照マウスには溶媒のみを投与した。投与後3日、1、2、または4週後にマウスを屠殺し、肝臓を摘出した。肝臓は直ちに 1.15%KCl で灌流し、KCl 中でホモゲナイズ後、遠沈してサイトゾル分画を得、そ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。さらに、マイクロゾーム分画でエトキシレゾルフィン-O-デアルキラーゼ(EROD)、メトキシレゾルフィン-O-デアルキラーゼ(MROD)およびペントキシレゾルフィン-O-デアルキラーゼ(PROD)活性を検索した。また、肝臓中の脂質の過酸化度を測定した。

(倫理面への配慮)

本実験は広島大学医学部附属動物実験施設の許可を得て倫理的に行われた。

C. 研究結果

野生型マウスでは TCDD40 µg/kg 投与1週間後には XO と XDH 活性は対照群の 2.2~2.6 倍に増加した。XO と XDH に類縁のアルデヒド酸化酵素の活性も TCDD により増加したが、その増加程度は XO と XDH に比べて少なかった。EROD および MROD の活性はそれぞれ対照群の 59 倍、47 倍に増加した。これに反して PROD 活性は TCDD 投与により増強されなかった。各酵素の活性誘導は投与3日後には認

められ、4週後でも維持されていた。これらの誘導には用量反応関係が認められ、EROD と MROD については 80 µg/kg まで増加した。XO/XDH 活性も 40 µg/kg まで増加したが、80 µg/kg ではやや低下した。

Ahr^{-/-}マウスでは TCDD による酵素活性誘導は認められなかった。遺伝子欠損ヘテロ個体では野生型と同様の誘導が認められた。肝臓中の過酸化脂質は、野生型マウスでは TCDD40 µg/kg 投与により対照群の約3倍に増加した。しかし、*Ahr*^{-/-}マウスでは TCDD 投与群と対照群の間に差は認められなかった。

D. 考察

本研究により TCDD がマウス肝臓の XO/XDH 活性を誘導することが初めて示された。XO/XDH はヒトを始め多くの哺乳類、鳥類、魚類に広く分布する。この酵素により活性酸素が生じる。活性酸素は脂質過酸化を起こし、これが種々の病的過程に関与する。本研究でも TCDD により肝臓の過酸化脂質が増加することが示され、TCDD の毒性発現に XO/XDH が関与している可能性が示唆された。われわれは *Ahr*^{-/-}マウスでは TCDD の発生障害作用が認められないことを示したが、*Ahr*^{-/-}マウスでは TCDD による XO/XDH の誘導も起こらず、この誘導が AhR 依存性であることが明らかとなった。

E. 結論

以上の所見から、TCDD により AhR 依存性に誘導される XO/XDH が活性酸素産生、脂質過酸化の過程を通じて TCDD の毒性発現に関与している可能性があると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.

2. 学会発表

- 1) 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.
- 2) 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.

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

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)
分担研究報告書

2.3.7.8.-テトラクロロ-p-ダイオキシンによる雄性副生殖器の
発生歪曲の分子機序に関する研究

分担研究者 鈴木 勝士 日本獣医畜産大学教授

研究要旨

TCDD の妊娠中期のラットへの 1 回暴露が、雄の出生児の副生殖器、精子産生に影響を及ぼすとの Wilker ら(1996)の報告について、ラットの系統をウイスター今道ラット近交系に変えて再現性が見られるか否か確認した。0, 1, 2, または 4 μ g/kg の用量の内、最高用量では胎児の生存性と分娩に悪影響が見られた。哺育中、および育成期に及んで投与群の動物は体重増加抑制を示し、その影響は雌の方が強かった。1, または 2 μ g/kg を子宮内暴露された、雄ラットは成熟後生殖器の重量に用量相関的な減少を示し、インタクナ発情雌と同居すると対照ラットより著しく多い交尾行動を示すが、射精はまれにしか起こらず、射精したとしても雌を妊娠させることができず、妊孕能を喪失した。実験は2年に渡り繰り返されその成績は一部 Wilker ら(1996)の報告を再現するとともに、妊孕能の喪失に関して新知見をもたらした。

A. 研究目的

2,3,7,8-テトラクロロ-p-ダイオキシン(TCDD)の妊娠中期(妊娠 15 日:GD15)単回経口投与(1.0, 2.0 または 4.0 μ g/kg)により、雄胎児の精巣、副生殖器重量の低下、精子産生量低下、生殖行動異常と妊孕能低下が昨年までに確認され、過去の報告が再現されるとともに、行動異常について新知見が得られた。当面の LOAEL として 1.0 μ g/kg が得られたが、NOAEL は未確定であり、さらに実験を継続する必要がある、本年データの信頼性を高めるべく同一条件で追加実験を実施する。当科研費の継続期間に鑑みると、TCDD に関するもう一つの争点(大多数の変異原試験ではネガティブであるが、一部の試験で変異原性陽性の成績がある)である、初期胚に対しての突然変異誘発性があるのか否かについて参考となるべきデータを得ておく必要もある。そこで、今

年は、ラットの初期胚に対して母胎経路で TCDD 投与を実施し、妊娠末期の胎児にどのような影響が見られるか探索することにした。初期胚では内細胞塊の一部は生殖細胞に分化するので、そのような運命の細胞が変異すると遺伝性の影響が生じる可能性がある。このような影響を調べるには、感作された胎児を出産させ育成して近親交配により 3 世代維持して精査する必要があると考えられる。今回の実験は、そのような長期にわたる大規模な実験が必要か否かに関する判断材料をあたえられ

今回は、遺伝的背景が均一と考えられる Wistar Imamichi rat の近交系を用い、妊娠 15 日投与に関しては、前年と同様の投与ならびに検査を実施し、また妊娠 3 日の午前中の投与に関しては 0, 0.5, 1, 2 または 4 μ g/kg の TCDD を母体に単回経口投与し、妊娠末期に

帝王切開して、胎児の異常の有無を検討する。

B. 研究方法

妊娠15日投与については、前年と同様であり、1.0, 2.0, 及び4.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群にそれぞれ4~5腹を追加して実験を実施した。

TCDD(RADIAN Corp: lot #15091-55)の20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (2% アセトン-コーン油溶液)を保存溶液とし、0.5, 1, 2, 又は4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で、妊娠3日(午前中)の近交系 Wistar Imamichi ラットに1回経口投与し、妊娠21日に帝王切開して胎児を得、形態学的な異常の有無を精査した。対照群には溶媒を投与した。予備試験的な性格の実験であるので、各群6匹の妊娠ラットを用いた。母動物については、毎日の臨床観察と妊娠0, 3, 7, 14, 15, 21日に体重測定を実施した。母動物は剖検に付し、肝臓、卵巣、下垂体重量を測定するとともに異常のみられた臓器についてはホルマリン固定して保存した。各群の胎児の約半数を内臓奇形の観察に宛て、残りの半数を骨格奇形の観察に宛てた。

本実験は(財)動物繁殖研究所にて実施した。空調、照明時間制御のコンベンショナル動物舎環境で、陰圧ラミネフロー条件で動物を飼育、投与実験を行った。育成期間および投与前の妊娠期間についてはステンレス製金網ケージにて群飼、妊娠後期から哺育期はポリカーボネート製ケージにて個別飼育とした。臨床観察により瀕死と判定された動物は切迫屠殺して剖検に付すことにしていたが、今回はそのような動物はいなかった。

(倫理面への配慮) TCDD 汚染物質の拡散を防ぐため、無毒化できる焼却法が開発されるまで、動物を含む汚染物を凍結保存した。

C. 研究結果

(1) 妊娠15日投与による追加実験(表は、ラット妊娠15日投与によるTCDDのF1出生児に対する影響、特に雄に対する影響として後掲)

追加実験の結果は、昨年度の成績と類似しており、各群の各指標について統計的に同等と考えられたため、2年分をまとめて表1から11に示した。表1と2には妊娠および保育期間中の母親の体重変化と出産ならびに哺育児の生存性が示されている。GD15のTCDD投与は妊娠維持には影響を及ぼさなかったが、4.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群では生存出生児数が著しく減少し、哺乳した母親は1腹のみで、哺乳児の死亡が相次ぎ、21日(離乳時)まで生存したのは雄1匹のみであった。生後4日までの哺育成績は2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群でも低下していた。哺育中の成長(表3)については、1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の全群で体重増加抑制が観察され、離乳時の体重には用量相関的な低体重が認められた。生後1日と4日の肛門生殖突起間距離(AGD)(表4)については、2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の1日で有意な低値が観察されたが、体重の立方根による補正では対照群との差は認められず、体重増加抑制に二次的な見かけのAGDの短縮であると考えられた。哺乳終了時点の母親の剖検所見および臓器重量(表5)には群間で差は認められなかった。雄の出生児の生後の臨床症状(表6)では、0および1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群では何ら異常は認められなかった(0/30, 0/31)が、2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群で眼瞼周囲の浸血、運動低下、チアノーゼ、立毛などが約半数の動物に認められ(11/17)、死亡して発見されたもの9/28、切迫屠殺1/28例が存在した。剖検時の肉眼所見では1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群で8/31、2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群で8/24に精巣の萎縮が観察され、精巣上体の萎縮も両群でそれぞれ7/31、および7/24例に認められた。生殖行動を観察するため11週齢まで飼育した動物では、1および2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群ともに対照群に比較して有

意な体重増加抑制がみとめられ(表 7)、いずれも有意な摂餌量の低下(表 8)を伴っていた。生殖(交尾および妊孕能の観察)行動の観察後実施された剖検では(表 9)、1 および 2 μ g/kg 群ともに、肝臓、下垂体、精巣、精巣上体、精嚢、陰茎および脳の重量が対照群より有意に軽く用量反応性が認められた。また前立腺は 2 μ g/kg 群でのみ対照群より有意に軽かった。交尾行動の観察(表 10)では、昨年度の観察が再現された。1 および 2 μ g/kg 群でともに交尾行動はみられ、精子産生も対照群と大差ないのに(表 11)、著しい妊孕能の低下が認められた。交尾行動は従来の常識を破るものであり、投与群では雌への上駕の頻度が用量相関的に増加し(したがって上駕間隔は短縮)したが、膣への挿入と射精は用量相関的に頻度が低下した。2 μ g/kg 群では射精に至る動物は観察されなかった。また 1 μ g/kg 群の 1 例が妊孕能を示したのみで、他はいずれも雌を妊娠させることができなかった。精子産生については精巣上体あたりの精子数にすると(表 11) 2 μ g/kg 群で有意な減少があり、異常な形態の精子も有意に増加した。これらの雄の生殖行動の異常は、明らかな交尾欲をしめすところから、脳の性分化異常に起因するものとは考えられず、それらの行動を引き起こすのに必要なテストステロンの産生にも異常はなかったと考えられた。交尾不能は陰茎の短小に起因する可能性が最も高い。交尾できなかったためこれらの精子に、何らかの受精に関わる能力が欠けているのか否かについては確認できていない。また、この現象に副生殖器の機能がどのように関わっているのかについても確認できなかった。

(2) 妊娠初期投与による胚発生への影響(表は、)妊娠初期投与による TCDD の胚発生に対する影響として後掲)

妊娠 3 日の 0, 0.5, 1.0, 2.0 または 4.0 μ g/kg TCDD の経口単回投与は、母動物の体重には影響を与えなかった(Tab.1)。着床、その後の妊娠維持には影響は見られなかった。4.0 μ g/kg 群では、初期胚の死亡に起因する胚死亡率は 47.6%に達した($p < 0.05$)が、胎児の体重には影響は見られなかった。1 μ g/kg 群の雌胎児の体重が有意に低下したが、同腹児数が対照群に比べて多かったために生じた見かけの低下であると考えられた。外表奇形を伴った胎児はいずれの群でも見られず、性比にも異常はなかった(以上、Tab.2)。妊娠 21 日での母親の臓器重量(Tab.3)に関しては、1.0 μ g/kg 以上の投与群に置いて卵巢重量の有意な用量相関的な低値が認められたが、0.5 μ g/kg 群では影響は認められなかった。また、4.0 μ g/kg 群では肝臓の体重比が有意に増加していた。胎児の内臓の異常(Tab.4)に関しては、妊娠 3 日の投与であるにもかかわらず、4.0 μ g/kg 群で有意な腎盂の拡張と尿管の拡張(ともに全部の腹(6腹)で全胎児 56%)が認められ、これらの異常は例数は少ないものの 1.0 および 2.0 μ g/kg 群でも認められた。ウイスター今道ラットでは、器官形成期投与で TCDD により腎臓に異常が生じることが知られており、TCDD の半減期の長いことを考慮すると、初期胚に TCDD が何らかの影響を及ぼしその late effect として腎臓の異常を生じるという可能性は低く、貯留していた TCDD が器官形成期に腎臓に悪影響を及ぼした可能性が高いと考えられる。1.0 μ g/kg 群での腎臓の異常も TCDD の作用である可能性があり、TCDD 感受性に近交系ラットといえども個体差があることを示唆している。胎児骨格系(表 5)および肛門生殖突起間距離(表 6)に関してはいずれの用量群でも異常は認められなかった。今回の実験を通して、妊娠 3 日の TCDD 投与による胎児への悪影響について NOAEL は、0.5 μ g/kg であ

ることが判明した。

D. 考察

妊娠中期のラットへの TCDD 投与が雄胎児の生殖器発生に異常を生じ、かつ成熟時に生殖行動に障害を来すことについて、昨年、「今回の近交系ウィスター今道ラットでの実験は、Wilker (1996)により報告された妊娠ラットへの TCDD (0.5, 1.0, 2.0 μ g/kg)の妊娠 15 日の 1 回投与が、子宮内暴露を受けた雄の F1 の精巣重量低下、精巣上体の萎縮等を引き起こすという成績を、同じではないが類似した変化を生じるという点で再現したと考えることができる。また、TCDD 子宮内暴露を受けた雄ラットの交尾行動ならびに妊孕能についての報告は、今回が初めてのものであり、きわめて興味深い知見が得られた。TCDD の子宮内暴露の用量が増えるにつれて、発情雌に対する乗駕行動は増えるが、挿入と射精の回数は減少し、2 μ g/kg 群では射精しなかった。さらに、1 および 2 μ g/kg 群ともに雄は交尾した雌を妊娠させることができなかった。このことは、母親の妊娠 15 日での TCDD 1 回投与が、雄の精巣と副生殖器の低形成もしくは分化異常を引き起こすが、萎縮した精巣はなおその雄に性行動を起こすことのできるテストステロンを分泌し、かつその雄の脳については雄型に分化させることを示している。」と考察した。例数が少なく、実験の再現性に不安があったため、昨年と同様の用量設定で追加実験をしたところ、ほぼ同様の成績が得られた。陰茎について用量相関的な重量減少が確認され、また、交尾行動の観察の中で陰茎が膣まで届かない状況が確認された。射精不能については、外部生殖器の低形成に起因すると考えてよいとの印象を受けているが、ラットの場合、膣外で射精する動物も存在するので、必ずしも短小陰茎のみで射精不能は説明できない可能性もある。何

らかの射精に関係する神経機序に障害のある可能性についても今後検討する必要があると考えられる。交尾、射精しなかったことから、物理的に受精が起こらなかったのは当然である。しかし、これらの動物では精子が産生されており、これらの精子に受精能力があるか否かについては今後調べる必要がある。副生殖器の機能低下などによる精子成熟の遅延などが予想されることから、妊娠中期に投与された TCDD が生後の副生殖器の機能に及ぼす影響がどのようなものなのかについてさらに調べる必要がある。妊娠 15 日投与の場合、生殖細胞が生殖隆起に達した時期でもあり、生殖細胞の遺伝的組成にどのような影響があるのかについても確認する必要がある。今回の実験では TCDD の突然変異誘発性に関してはポジティブを示唆する所見は得られなかった。全体として、雄の胎児の生殖機能に及ぼす影響としては、今回の実験系のなかでは 1 μ g/kg が LOAEL ということになるが、既にもっと低い用量で前立腺への影響を確認した報告もあるので、さらに低用量での NOAEL が存在するかどうかを確認する必要がある。

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

妊娠初期投与の実験は、本来着床前の胚盤胞に TCDD が作用し、内部細胞塊がその影響を受けて、何らかの非常に大きな奇形の発生(体軸形成の異常のような)あるいは、影響を受けた内部細胞塊が生殖細胞に分化した場合遺伝性の突然変異が生じるのではないか

との予測に基づいて企画されたものである。後者の確認には兄妹交配 3 世代までの追跡が必要であり、実施に長期間を要するとともに維持する動物の規模が極めて大きくなるので、今回の科研費の実施機関内に成績を得ることは困難である。また、このような実験を企画するためにはそれなりの実験的根拠を持っていることも重要である。どのような用量を設定すべきかについても情報が無い。今回は、妊娠中期での TCDD の影響が $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ でも見られたことに鑑みて、 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 群を加えて検討した。

その結果、いずれの用量群でも体軸形成異常などの変異原物質による重篤な初期胚投与に特徴的な奇形は発生せず、この用量段階では TCDD には変異原性はないことを示唆する成績が得られた。予想とは異なって、妊娠中期投与に特徴的な腎臓での異常が $4.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 群で好発した。これは初期胚での TCDD の突然変異誘発作用に起因する物とは考えにくく、TCDD の長い半減期からすると、胎内に貯留していた TCDD が器官形成期の胚に影響を及ぼしたと考えるのが妥当であろう。低頻度ではあるが、同一のタイプの奇形が $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の群で認められるので、この作用には用量相関が認められる。低濃度での低頻度の発生は、そのような影響を受けた胎児の TCDD に対する感受性が高いことを示唆しており、近交系ラットで遺伝的な背景が比較的均一な実験系においてもなお TCDD に対する感受性に個体差があることを示すものである。

今回の妊娠初期投与の実験により、胎児への悪影響について $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ が明確な NOAEL であることが判明した。

E. 結論

1. 1.0 , または $2.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ の TCDD を妊娠 15 日に 1 回子宮内暴露された、雄ラットは成熟後

生殖器の重量に用量相関的な減少を示し、インタクナな発情雌と同居すると対照ラットより著しく多い交尾行動を示すが、射精はまれにしか起こらず、射精したとしても雌を妊娠させることができず、妊孕能を喪失した。 $4.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ TCDD の投与は重篤な胎児毒性を示すとともに、出生後もその悪影響が持続し生存性が極めて悪く、成熟雄は得られなかった。今回の成績は一部 Wilker ら(1996)の報告を再現するとともに、妊孕能の喪失に関して新知見をもたらした。交尾行動の変化は妊娠 15 日の TCDD 投与が雄ラットの脳の性分化には影響を示さないこと、および成熟時の性行動を引き起こすに必要な量のテストステロン産生にも影響を示さないが、副生殖器重量を維持するには不十分である可能性があることを示唆している。今後、成熟時の副生殖器の精子形成に及ぼす影響が TCDD によりどのように就職されているのかを解明するとともに、子宮内暴露以後の副生殖器で起こる発生遺伝的修飾について明らかにする必要がある。

2. 妊娠初期に 0.5 , 1.0 , 2.0 および $4.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ の TCDD を単回経口投与して胎児の発生に及ぼす影響を調べた結果、いずれの用量群でも体軸形成異常などの変異原の初期投与に特有な重篤な奇形は認められず、この時期、この用量範囲では TCDD に突然変異誘発性はないと考えられる成績が得られた。 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の群で用量相関的な腎盂の拡張および尿管の拡張の発生が認められ、特に $4.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 群では胎児の約 6 割が発症した。この影響は妊娠初期に投与された TCDD がその半減期が長いために、母体内に貯留しており、それが器官形成期になって胎児に影響した結果であると考えられた。 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 群での低頻度の腎臓の異常の発生は、遺伝的に均一と考えられる近交系ラットにおいてもなお、TCDD に対する感受性に個体差があることを示唆し

ている。今回の実験により、妊娠初期一回投与での TCDD のラット(母親、胎児)に対する NOAEL は $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ であることが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Uchibori, M., K. Saito, S. Yokoyama, T. Tsuji, H. Suzuki and K. Suzuki (2000) Monitoring and analysis of the EEG spikes frequency in El mice during sleep: A new application of wavelet transform. *Physiol. Behav.* (in submission).
5. 鈴木勝士、他 13 名(著)(2000)XIII. 遺伝性疾患、内藤喜久、浜名克己、元井霞子編、生産獣医療における牛の生産病の実際、p207-216、文永堂、東京
6. 鈴木勝士、他 83 名(訳)(2000)第 114 章、膀胱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.
7. 鈴木勝士、他 44 名 (2000) 2.2.3. 子宮内暴露試験、2.2.4. 一代繁殖試験、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方法、シュプリンガー・フェアラーク東京、東京、p85-106

8. 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—、資源環境対策 36(2):156-157.
 9. 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)、電子情報通信学会技術研究報告 MBE99-152:43-47
- ### 2. 学会発表
1. 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)
 2. 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
 3. 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ブラコード形成・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
 4. 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
 5. 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
 6. 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
7. 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
 8. 秋元敏雄、鈴木浩悦、仲間一雅、鈴木勝士(2000) WBN/lla-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
 9. 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
 10. 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
 11. 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
 12. 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
 13. 秋元敏雄1)、鈴木浩悦2)、仲間一雅1)、鈴木勝士(2000)Hairless rat(WBN/lla-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
 14. 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
 15. 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
 16. 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
 17. 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
 18. 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
 19. 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
 20. 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
 21. 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
 22. 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麩酸イニシエーション期投与の影響、毒性病理学会
- 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
 3. その他
なし

(1) ラット妊娠 15 日投与による TCDD の F1 出生児に対する影響、特に雄に対する影響

Table 1 Fate, Clinical Findings and Body Weights of Dams - Group Summary -

	Groups			
	0 μ g/kg	1 μ g/kg	2 μ g/kg	4 μ g/kg
No. of animals	8	9	9	9
Fate				
tk	8	9	9	9
Clinical findings				
NAD	8	9	9	9
Body weight (Mean \pm SD; g)				
Pregnance				
Day 0	250 \pm 23	258 \pm 22	255 \pm 20	256 \pm 26
Day 7	278 \pm 27	292 \pm 25	282 \pm 22	288 \pm 25
Day 14	321 \pm 21	332 \pm 24	328 \pm 15	334 \pm 19
Day 21	410 \pm 28	423 \pm 26	417 \pm 17	414 \pm 14
Lactation				
Day 0	303 \pm 33	313 \pm 23	304 \pm 19	326
Day 4	308 \pm 20	317 \pm 25	306 \pm 14	327
Day 7	317 \pm 21	331 \pm 26	317 \pm 15	334
Day 14	332 \pm 19	343 \pm 18	338 \pm 16	355
Day 21	332 \pm 21	341 \pm 20	343 \pm 17	378

Table 2 Reproduction Data of Dams - Group Summary -

	Groups			
	0 μ g/kg	1 μ g/kg	2 μ g/kg	4 μ g/kg
No. of pregnant animals	8	9	9	9
No. of dam, delivered live pups	8	9	9	4
Length of gestation[Mean; day]	22.6	22.8	22.8	23.4
No. of implantaion [Mean \pm SD]	16.4 \pm 5.83	15.9 \pm 2.64	16.6 \pm 2.26	16.4 \pm 2.77
No. of live pups at day 0 [Mean \pm SD]	13.1 \pm 3.68	10.8 \pm 1.58	10.1 \pm 3.18	1.0 \pm 1.41
No. of dead pups at day 0	2	21	21	38
Day 0 viability index(%)	98.1	82.1	76.1	22.4
Sex ratio(Male/ Femals)	1.33	1.06	1.50	0.22
No. of dam with abnormal pups	0	0	0	0
No. of live pups(Male : Female)				
Day after delivery				
Day 0	45 : 60	47 : 50	30 : 45	9 : 2 *
Day 4(pre-culling)	42 : 60	39 : 40	18 : 34	3 : 0
Day 4(post-culling)	15 : 59	35 : 40	17 : 34	3 : 0
Day 7	15 : 59	35 : 39	16 : 32	3 : 0
Day 14	15 : 59	35 : 39	16 : 30	2 : 0
Day 21	15 : 59	35 : 39	16 : 29	1 : 0
Day 4 viability index[Mean]	97.1	81.4	69.3	27.3
Day 21 viability index[Mean]	100	98.7	88.2	33.3

1): (No. of live pups at day 0 / No. of pups at delivery) X 100

2): (No. of live pups at day 4 before culling / No. of live pups at day 0) X 100

2): (No. of live pups at day 21 / No. of live pups at day 4 after culling) X 100

Table 3 Body Weights of F1-Pups (Mean \pm SD: g) - Group Summary -

Lactation [day]	Groups							
	0 μ g/kg		1 μ g/kg		2 μ g/kg		4 μ g/kg	
	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male
0	5.8 \pm 0.3	6.0 \pm 0.2	5.4 \pm 0.5	5.8 \pm 0.5	5.1 \pm 0.3 **	5.3 \pm 0.5 **	4.9 \pm 0.2 **	5.3 \pm 0.4
4 (pre-culling)	9.2 \pm 1.3	9.5 \pm 0.8	8.6 \pm 1.3	9.4 \pm 1.2	7.9 \pm 0.4	8.0 \pm 0.9 **	7.0	
4 (post-culling)	9.3 \pm 1.4	9.5 \pm 0.8	9.0 \pm 1.8	9.4 \pm 1.2	7.9 \pm 0.4	8.0 \pm 0.9 **	7.0	
7	14.3 \pm 2.1	15.0 \pm 1.0	12.1 \pm 2.4	13.1 \pm 2.1 *	10.6 \pm 0.8 **	10.4 \pm 0.9 **	8.7	
14	29.0 \pm 4.1	28.6 \pm 4.1	23.5 \pm 5.0 *	25.4 \pm 4.4	19.8 \pm 2.8 **	20.2 \pm 1.2 **	14.5	
21	44.4 \pm 6.1	45.0 \pm 1.8	35.4 \pm 6.4 *	39.2 \pm 5.9 *	27.3 \pm 5.6 **	29.8 \pm 2.0 **	19.0	

*: Significantly different from control value at P<0.05.

**: Significantly different from control value at P<0.01.

Table 4 Anogenital distance of F1 Male Pups - Group Summary -

Day of Examination	Groups					
	0 μ g/kg		1 μ g/kg		2 μ g/kg	
	1	4	1	4	1	4
No. of Dam	5	5	6	6	6	5
Body weight(g)	6.73 \pm 0.19	9.62 \pm 0.92	5.75 \pm 0.41 **	8.81 \pm 0.82	5.42 \pm 0.40 **	7.87 \pm 0.81 *
Anogenital distance(mm)	4.50 \pm 0.26	5.51 \pm 0.24	4.13 \pm 0.17	5.53 \pm 0.29	4.15 \pm 0.08 *	5.29 \pm 0.24
Ratio	2.44 \pm 0.06	2.60 \pm 0.16	2.30 \pm 0.09	2.68 \pm 0.11	2.37 \pm 0.09	2.66 \pm 0.07

*: Significantly different from control value at P<0.05.

**: Significantly different from control value at P<0.01.

Ratio : Anogenital distance / third root of body weight

Table 5 Macroscopic findings and Organ Weights of Dams (Mean \pm SD) - Group Summary -

No. of animals	Groups			
	0 μ g/kg	1 μ g/kg	2 μ g/kg	4 μ g/kg
Fate				
tk	8	9	8	1
Clinical findings				
NAD	8	9	9	9
Organ weight				
Liver [g]	17.9 \pm 3.0	18.3 \pm 3.2	19.8 \pm 1.9	19.2
()	(5.4 \pm 0.9)	(5.4 \pm 1.0)	(5.8 \pm 0.8)	(5.1)
Pituitary gland [mg]	12.2 \pm 3.5	12.4 \pm 1.9	12.8 \pm 2.3	14.2
()	(3.6 \pm 0.8)	(3.6 \pm 0.6)	(3.7 \pm 0.7)	(3.8)
Vagina [mg]	202.9 \pm 32.8	226.8 \pm 48.9	201.6 \pm 21.3	239.0
()	(61.0 \pm 7.7)	(66.7 \pm 14.8)	(58.8 \pm 6.2)	(63.2)
Uterus [mg]	270.8 \pm 40.6	322.3 \pm 116.7	311.5 \pm 45.1	351.0
()	(81.3 \pm 8.7)	(94.1 \pm 32.3)	(90.9 \pm 13.3)	(92.9)
Ovary [mg]	88.3 \pm 14.4	95.4 \pm 10.7	92.5 \pm 16.1	126.0
()	(26.5 \pm 3.1)	(28.1 \pm 3.6)	(27.0 \pm 5.1)	(33.3)

() : Relative organ weight.

Liver: (Organ weight/ Body weight) \times 100

Other organ: (Organ weight/ Body weight) \times 10000

Table 6 Fate, Clinical and Macroscopic findings of F1 Males Maternally Treated with TCDD on GD15 - Group Summary -

	Groups			
	0 μ g/kg	1 μ g/kg	2 μ g/kg	
No. of animals	30	31	28	
No. of animals autopsied	30	31	24	
Fate				
tk	30	31	18	**
fd			9	
ke			1	
Clinical findings				
NAD	30	31	17	**
Eye discharge	0	0	9	**
Decrease in locomotor activity	0	0	5	*
Cyanosis	0	0	1	
Piloerection	0	0	3	
Tachypnea	0	0	2	
few-feces	0	0	1	
Macro-findings				
Testis: atrophy	1	8	8	**
hypertrophy	1	2	0	
Epididymis: atrophy	0	7	7	**
Seminal vesicale: atrophy	0	1	3	
Prostate: atrophy	0	0	1	
Hydrothorax	0	0	4	*
Lung: reddih	0	0	2	

*: Significantly different from control value at P<0.05.

** : Significantly different from control value at P<0.01.

tk: Terminal kill. fd: found dead. ke: emergency kill.

NAD: No abnormality detected.

Table 7 Body Weights of F1 Males (Mean \pm SD: g) - Group Summary -

Age (week)	Groups		
	0 μ g/kg	1 μ g/kg	2 μ g/kg
3	64 \pm 7.3 (30)	56 \pm 10.7 (31)	39 \pm 7.4 (28)
4	110 \pm 13.4 (30)	96 \pm 14.9 (31)	65 \pm 11.8 (27)
5	167 \pm 15.6 (30)	147 \pm 18.6 (31)	104 \pm 17.6 (22)
6	228 \pm 15.8 (30)	201 \pm 22.1 (31)	144 \pm 23.2 (22)
7	289 \pm 19.2 (30)	256 \pm 25.5 (31)	181 \pm 33.0 (22)
8	343 \pm 16.5 (30)	306 \pm 25.7 (31)	234 \pm 29.5 (19)
9	382 \pm 17.1 (30)	341 \pm 26.1 (31)	269 \pm 37.0 (19)
10	416 \pm 19.3 (30)	375 \pm 28.6 (31)	311 \pm 27.4 (18)
11	443 \pm 20.8 (30)	401 \pm 31.3 (31)	341 \pm 27.9 (17)

Table 8 Food Intakes of F1 Males (Mean ± SD: g) - Group Summary -

Age (week)	Groups			
	0 μ g/kg	1 μ g/kg	2 μ g/kg	
3	14.5 ± 4.2 (10)	11.7 ± 1.4 (10)	8.2 ± 1.5 (10)	**
4	19.4 ± 1.2 (10)	16.8 ± 1.5 (10)	9.9 ± 3.5 (10)	**
5	23.8 ± 2.5 (10)	21.2 ± 1.8 (10)	15.1 ± 5.2 (7)	**
6	25.7 ± 1.5 (10)	21.8 ± 1.8 (10)	16.5 ± 5.1 (7)	**
7	27.9 ± 0.9 (10)	25.0 ± 2.2 (10)	14.0 ± 9.2 (7)	**
8	29.1 ± 1.2 (10)	24.9 ± 1.7 (10)	21.2 ± 2.3 (5)	**
9	28.5 ± 1.3 (10)	25.3 ± 1.9 (10)	23.2 ± 2.1 (5)	**
10	30.1 ± 1.5 (10)	26.9 ± 1.9 (10)	25.0 ± 2.7 (5)	*

*: Significantly different from control value at P<0.05.

**: Significantly different from control value at P<0.01.

Table 9 Organ Weights of F1 Males (Mean ± SD: g) - Group Summary -

	Groups			
	0 μ g/kg	1 μ g/kg	2 μ g/kg	
No. of animals	30	31	28	
Fate				
tk	30	31	18	
Body weight [g]	445 ± 20.5	403 ± 29.6	343 ± 26.6	**
Organ weight				
Liver [g]	19.3 ± 1.27 (4.34 ± 4.52)	17.7 ± 1.71 (4.38 ± 0.31)	17.6 ± 1.39 (5.14 ± 0.44)	**
Pituitary gland [mg]	10.11 ± 1.12 (2.27 ± 0.23)	8.98 ± 1.29 (2.23 ± 0.30)	8.93 ± 1.69 (2.592 ± 0.39)	**
Testes[mg]	2753 ± 223 (619 ± 52)	2408 ± 413 (599 ± 103)	1852 ± 648 (541 ± 191)	**
Epididymides [mg]	857 ± 60 (193.1 ± 17.2)	729 ± 138 (180.9 ± 32.3)	528 ± 251 (153.2 ± 72.1)	**
Prostate [mg]	619 ± 180 (138.9 ± 40.16)	534 ± 159 (132.4 ± 38.8)	428 ± 139 (125.1 ± 41)	**
Semimal vesicle [mg]	1127 ± 157 (253.7 ± 36.8)	1015 ± 175 (251.8 ± 40.0)	869 ± 237 (254.1 ± 68.1)	**
Penis [mg]	337 ± 35.3 (74.7 ± 9.3)	228 ± 41.7 (56.9 ± 9.4)	203 ± 43.8 (58.9 ± 13.3)	**
Brain [mg]	1885 ± 42.4 (417 ± 16.49)	1802 ± 107.9 (450 ± 20.6)	1714 ± 57.6 (497.8 ± 36.6)	**

tk: Terminal kill

*: Significantly different from control value at P<0.05.

**: Significantly different from control value at P<0.01.

Table 10 Copulatory Behavior in F1 Males - Group Summary -

	Groups		
	0 μ g/kg	1 μ g/kg	2 μ g/kg
No. of examined animals	8	8	8
Mount			
Frequency	9.8 \pm 6.2	69.3 \pm 52.0 *	106 \pm 35.5 **
Latency (sec)	828 \pm 1251	98.3 \pm 156 *	387 \pm 860
Intromission			
Frequency	30.9 \pm 9.8	13.5 \pm 16.9	4.3 \pm 2.5 **
Latency (sec)	190 \pm 151	154 \pm 132	93.6 \pm 52.7
Ejaculation			
Frequency	3.8 \pm 1.0	1.3 \pm 1.8 *	0.0 \pm 0.0 **
Latency (sec)	824 \pm 601	1094 \pm 475	
Fertility			
+	8	1 **	0 **
-	0	7	8

*: Significantly different from control value at P<0.05.

**: Significantly different from control value at P<0.01.

Table 11 Sperm Examination of F1 Males - Group Summary -

	Groups		
	0 μ g/kg	1 μ g/kg	2 μ g/kg
No. of examined animal	8	8	5
Motility			
'+++	2	3	1
'++	4	3	3
'+	2	2	1
Sperm count (10⁶)			
% Epididemis	26.6 \pm 11.3	25.4 \pm 8.1	24.7 \pm 3.5
% Epididemis	11.8 \pm 5.7	11.0 \pm 5.4	9.4 \pm 4.9 *
Abnormalities(%)	2.58 \pm 0.86	2.56 \pm 1.73	3.82 \pm 3.04 **

*: Significantly different from control value at P<0.05.

**: Significantly different from control value at P<0.01.

(2) 妊娠初期投与による TCDD の胚発生に対する影響

Table 1 Fate, Clinical Findings and Body Weights [Mean ± SD] of Females Orally Treated with 0, 0.5, 1.0, 2.0 or 4.0 µg/kg TCDD on Day 3 of Pregnancy - Group Summary -

	Groups				
	0 µg/kg	0.5 µg/kg	1 µg/kg	2 µg/kg	4 µg/kg
No. animals exam.	6	6	6	6	6
Fate					
tk	6	6	6	6	6
Clinical Findings					
NAD	6	6	6	6	6
Body Weights (day of pregnancy)					
PD0	249.3 ± 25.6	253.3 ± 18.1	251.2 ± 13.4	245.0 ± 13.1	263.2 ± 23.3
PD3	262.5 ± 26.5	265.0 ± 18.3	265.7 ± 14.6	262.5 ± 14.5	280.7 ± 25.9
PD7	277.5 ± 29.7	283.0 ± 21.5	276.7 ± 18.5	273.3 ± 18.4	292.7 ± 25.0
PD14	325.3 ± 28.6	331.2 ± 20.4	326.7 ± 19.6	321.7 ± 16.0	335.3 ± 25.2
PD21	414.8 ± 29.8	425.5 ± 16.1	419.7 ± 22.0	421.8 ± 25.3	388.8 ± 65.6

tk: terminally killed

NAD: No Abnormality Detected

Table 2 Effect of PD3 Oral Treatment with TCDD on Fetal Mortality, Growth, Sexual Differentiation and External abnormality - Group Summary -

	Groups				
	0 µg/kg	0.5 µg/kg	1 µg/kg	2 µg/kg	4 µg/kg
No. of animals examined	6	6	6	6	6
No. of animals pregnant	6	6	6	6	6
No. of corpora Lutea [Mean ± SD]	24.7 ± 4.4	25.0 ± 1.7	25.2 ± 3.7	22.0 ± 1.9	21.7 ± 3.1
No. of implantations [Mean ± SD]	15.3 ± 3.8	17.2 ± 1.2	17.8 ± 2.4	16.3 ± 3.1	16.8 ± 1.0
Implantation rate [Mean ± SD; %]	64.9 ± 20.9	68.9 ± 5.7	72.6 ± 17.0	74.0 ± 11.6	79.5 ± 15.3
No. of resorption and deaths					
Early	15	23	20	7	46 *
Late	0	2	1	2	2
Total	15	25	21	9	48 *
Fetal mortality [Mean ± SD; %]	13.7 ± 22.1	23.6 ± 25.1	19.2 ± 21.7	9.5 ± 6.9	47.0 ± 16.4 *
No. of live fetuses [Mean ± SD]	12.8 ± 3.8	14.0 ± 3.7	14.3 ± 4.1	14.8 ± 3.3	8.8 ± 2.5
Sex ratio (male/ female)	0.93 (37/ 40)	0.79 (37/ 47)	1.39 (50/ 36)	0.82 (40/ 49)	1.21 (29/ 24)
Fetal Body weight [Mean ± SD]					
Female	4.9 ± 0.2	4.8 ± 0.4	4.5 ± 0.2 *	4.6 ± 0.2	4.4 ± 0.6
Male	5.1 ± 0.1	4.9 ± 0.2	4.9 ± 0.2	4.9 ± 0.2	4.7 ± 0.5
No. of fetuses with external abnormalities	0	0	0	0	0

*: significantly different from control at p<0.05

厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)
分担研究報告書

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

分担研究者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

ダイオキシン類の生体影響のメカニズム解析を目的とし、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 in vivo 指標での検討を行った。その結果、AhR 遺伝子欠失マウスの背景である C57BL/6 マウスと背景が FVB である Tg.AC マウスとの F1 について、陽性対照として用いた DMBA+TPA の 2 段階皮膚がん実験において、ケラチノサイト由来の乳頭腫は、Tg.AC 背景に依存して高頻度に誘発されたが、メラノサイト由来の腫瘍(melanocytic tumor)は、Tg.AC 背景には依存せず、DMBA+TPA 処置にのみ依存することが判明した。このことは、同一系内に Tg.AC 依存性と非依存性の 2 系統の陽性対照が同定されたことになる。

A 研究目的

本研究班が掲げるところの、1) 発がん性遺伝子改変動物を用いた多くの発がん研究の実績に応じてダイオキシンによる発がんの決定要因を解明し、閾値の問題に立ち入って検討すること、また、2) AhR ノックアウトマウスの作成に成功した背景に基づいて、これに関連するエンハンサーやリプレッサー等の AhR の調節機構を明らかにすることを目的とし、その両方に関連した系として、ダイオキシン類の発がん作用の高感度検出系に、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 マウスを用いると共に、このものと AhR 遺伝子欠失マウスとを交配して双方の遺伝子変異を持つマウスを生産し、発がん性の認められた化合物について AhR を介するか否かの分別を行う。この時、誘導される代謝酵素の検討も併行して行う。

B. 研究方法

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)は変異原性試験において陰性であるが、米国 National Toxicology Program (NTP) の癌原性試験において、肝臓、甲状腺等に対する発がん性が示されている。このような発がん性はアリルヒドロカーボン受容体(AhR) (別名ダイオキシン受容体)の遺伝子を欠失させたマウスでの実験結果から、AhRを介した酵素誘導等のepigeneticな事象の上に成り立つメカニズム、言い換えると発がんプロモーター作用が、その本態であることが推察される。短期発がん系において、いわゆるイニシエーションを要求せずにTCDDによる発がんを観測できる系として、Tg.ACマウスが知られている。このマウスは、v-Ha-ras遺伝子導入マウスであり、皮膚を主体とする各臓器・組織における発がん感受性の亢進が認められ、特に非変異原性の

発がんプロモーターにも感受性を有する特徴がある。本研究では、AhR遺伝子欠失マウスとの掛け合わせを目的とし、その背景系統であるC57BL/6マウスとのF1動物における皮膚易発がん性の検討、肝発がん好発系であるC3H系マウスとのF1動物における肝易発がん性の検討を行った。これと並行して、v-Ha-ras導入非形質転換BALB由来細胞株(Bhas42細胞)および、Tg.ACマウス胎児由来線維芽細胞継代細胞(いわゆるMEF)を用いて、その発がんプロモーター作用のin vitro検出系の検討とその分子生物学的メカニズムの解析を試みるものである。Tg.ACマウス(Taconic社より入手)はFVBマウスにv-Ha-ras遺伝子をマウスゼータグロブリンプロモーターとともに導入したもので、皮膚発がん好発系である。AhRノックアウトマウスは、藤井らにより作成されたものでC57BL/6を背景としている。肝発がんに関しては、C57BL/6およびFVBマウスはC3Hよりも嫌発系である。昨年度は、Tg.ACマウスおよびC57BL/6のF1、Tg.ACマウスおよびC3HのF1、を作成した。それらには、Tg.ACの自然発生腫瘍として知られる歯原性腫瘍(odontogenic tumor)及び、皮膚創傷部位の皮膚乳頭腫の発生が低頻度ながら観察された。このことから遺伝的背景が異なっても、Tg.ACマウスとしての易発がん性とその標的臓器とともに保たれる可能性が示された。これを、さらに検証するために、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)を各々実施した。

C. 研究結果

発がんに対するダイオキシンの影響に関しては、ダイオキシン類の発がん作用の高感度検出系として、発がんプロモーターに感受性を示

すとされるTg.ACマウス(変異型ras、v-Ha-rasの遺伝子導入マウス)を用いた発がん実験の予備実験を開始し、ここで、発がんの用量作用関係、発がん過程における細胞間連絡の修飾について検討した。また、同様の検討を、発がんイニシエーター感受性を示すproto-ras(c-Ha-ras)遺伝子導入マウスにおいて検討し、Tg.ACマウスの結果と比較及び遺伝子解析について作業を進めた結果、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段階皮膚発がん実験において扁平上皮由来の乳頭種についてはTg.ACに依存したが、メラ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。肝発がん系においては、有意な腫瘍発生促進は今のところ観察されていない。

v-Ha-ras導入非形質転換BALB由来細胞株(Bhas42細胞)及び、Tg.ACマウス胎児由来線維芽細胞継代細胞(いわゆるMEF)を用いて、プロモータ陽対照物質としてのTPAとTCDDの増殖促進作用と、細胞間連絡(gap junction intercellular communication)への影響を色素移行法(scrape loading dye transfer assay)にて実施した。その結果、TCDDはTPA型のプロモーターとは異なり細胞増殖は軽度抑制、細胞間連絡は不変あるいは若干の促進作用を示した。この結果は、形質転換ラット肝細胞株(WB細胞)による我々の以前の解析結果と異なっている。発現しているコネクシンの種類がTg.ACのMEF細胞と異なっていること、形質転換前後の違いがあることから、ホストの細胞の状況により抑制・亢進作用が入れ替わることが示唆された。

D. 考察

TCDD の有害作用のひと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、WB 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。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が、BALB/3T 細胞及び Tg.AC6F1 由来の MEF(mouse embryo fibroblast)、また BALB 3T3 細胞に v-Ha-ras を導入した Bhas42 細胞では、増殖効果及び GJIC(gap junctional intercellular communication)切断について逆の結果を得ており、今後分子メカニズムの検討を進める。

E. 結論

In vitro 及び in vivo の両面から、TCDD 発がんプロモーションに関わっていることが示唆されている ras 遺伝子に焦点を当て、Tg.AC マウス、同マウスとの AhR 欠失マウスとの掛け合わせ (C57BL/6 へのバッククロス中である) によるダブル変異マウスの作成、同マウス由来の MEF や v-Ha-ras 導入 3T3 細胞により多角的に発がんプロモーターとしての性質を検討しているところであるが、標的により反応が逆転することが明らかとなった。さらに、そのメカニズムの詳細を解析することが、TCDD の生体影響の発がん促進標的選択制を含む多様性を解明する一助となると考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 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

- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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