

20000726

厚生科学研究費補助金研究費報告書

厚生労働大臣 坂口力 殿 平成13年4月13日

くぼた しゅんいちろう
研究者 久保田 俊一郎
(所属機関 東京大学大学院)

平成12年度厚生科学研究補助金 (生活安全総合 研究事業) に
係わる研究事業を完了したので次のとおり報告する。

研究科題名 (課題番号) : ダイオキシン類の体内動態及び細胞障害
性の解明に関する研究 (H11-生活-005)

国庫補助金精算所要額 : 金 80,000,000 円也

目 次

I. 総括研究報告

ダイオキシン類の体内動態及び細胞障害性の解明に関する研究.....

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

III. 研究成果の刊行物・別刷

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

研究報告書

ダイオキシン類の体内動態及び細胞障害性の解明に関する研究

主任研究者 久保田俊一郎 東京大学助教授

研究要旨

ダイオキシン類の体内動態および組織障害性解析を主目的とし、研究を進めている。ダイオキシンのヒトでの体内動態を類推するために、ヒトにもっとも近縁の動物であるサル（アカゲザル）を用いて、最も毒性の強い TCDD を皮下投与し、各臓器、体液中の TCDD を定量測定し、その代謝動態を解析し、さらに、妊娠アカゲザルおよび哺育中のアカゲザルに TCDD を皮下投与した時の母動物、胎児および出生児への組織移行性を解析した。妊娠（140日目）および分娩後（30日目）のアカゲザルに 2,3,7,8-TCDD(0, 30, 300 ng/kg)の皮下投与を行い、投与後7日目の母動物、胎児、新生児の組織内濃度を測定し、胎児移行と乳汁を介する新生児への移行を解析した。その結果、母動物の組織に血中より高濃度で移行すること、胎盤経由で胎児へ、乳汁を介して新生児へ移行し、肝臓、脂肪組織、生殖器に高濃度で分布することが明かとなった。今後、高濃度で組織に移行した TCDD が組織障害性を引き起こすかどうかの解析を行う。妊娠 20 日から分娩後 90 日までの期間、TCDD 初回投与後 30 日毎に初回投与の 5% 量を追加投与する実験では、いずれの群においても母動物の死亡はみられなかったが、胎児死亡及び流産は対照群で 1 例（妊娠 40 日）、300 ng/kg 群で 2 例（妊娠 128 及び 40 日）みられた。死産は対照群で 1 例（妊娠 146 日）、30 ng/kg 群で 3 例（妊娠 150, 163 及び 158 日）、300 ng/kg 群で 2 例（妊娠 140 及び 143 日）みられた。胎児死亡、流産あるいは死産の頻度については明確な用量依存性は見られなかったが、TCDD と胎児死亡、流産あるいは死産との関連性について今後検討する必要がある。妊娠アカゲザルおよび哺育中のアカゲザルに TCDD を皮下投与した時の雌雄出生児（F1）の生後発育、行動、生殖器の形態、精子形成および生殖能に及ぼす影響を解析する実験も現在進行中で、途中経過のデータであるが、新生児の外部形態についてはいずれの群においても異常はなかった。しかし、雌雄新生児の肛門 - 外生殖器間距離については、TCDD 300 ng/kg 群に短縮傾向が見られた。F1 児をさらに飼育し、雄児では性機能への影響を精液、妊娠母体および児のホルモン解析により明らかにする。平成 11 年度に、2,3,7,8-TCDD 投与後（1匹）の組織標本の病理解析を行なった結果、TCDD 皮下投与群で内分泌系、生殖系、消化器系の各臓器に異常な変化を認めたため、頭数を 2 匹として、2,3,7,8-TCDD を皮下投与し、確認の実験を行なった結果、病理組織学的解析では正常の範囲内であることを確認したが、さらに、分子生物学的解析を行っている。この実験の追加実験として、1 年あるいはそれ以上の長期にわたり血中 TCDD 濃度測定を行い、皮下投与後の代謝動態を明らかにする。以上の研究結果を得た後、総合的検討によりダイオキシンの最も妥当な TDI の設定に有用な情報を提供し役立てる。

分担研究者氏名・所属施設及び職名

福里利夫・群馬大学助教授

野水基義・北海道大学助教授

山崎聖美・国立公衆衛生院主任研究官

堀久枝・東京医科歯科大学助手

小林孝志・千葉大学附属病院助手

村田宣夫・埼玉医科大学助教授

A. 研究目的

ダイオキシン類の体内動態（吸収、代謝、排泄）の解析を主目的とする。ダイオキシンのヒトでの体内動態を類推するために、ヒトに最も近縁の動物であるサル（アカゲザル）を用いて、ダイオキシン類のうちで最も毒性の強い TCDD を皮下投与し、経時的に各臓器、体液中の TCDD とその代謝産物を定量測定し、その代謝動態を解析し、さらに、妊娠アカゲザルおよび哺育中のアカゲザルに TCDD を皮下投与した時の母動物、胎児および出生児への組織移行性やその組織障害性を調べる。さらに、妊娠アカゲザルおよび哺育中のアカゲザルに TCDD を皮下投与した時の雌雄出生児（F1）の生後発育、生殖器の形態、精子形成および生殖能に及ぼす影響も調べる。平成11年度の予備試験として、血中濃度の測定に必要な採血量および採決間隔を明らかにする目的で2,3,7,8-TCDD(0, 30, 300 ng/kg)を雌アカゲザル各1匹に単回皮下投与し、投与後5, 21, 49日後にTCDDを測定した。組織標本を作成し、光学顕微鏡的解析も行なったところ、異常を示唆する所見を認めたため、各群2匹を用いて確認の実験を行う事も今年度の実験目的である。

この研究によりダイオキシンの最も妥当なTDIの設定に有用な情報を提供し、厚生行政に貢献することが大きな研究目的である。

B. 研究方法

1. ダイオキシンの調整および投与

2,3,7,8-TCDD は、Wellington Lab.において、トルエン/DMSO (1:2 v/v)を溶媒として、濃度を300ng/mlに調整されたものを用いた。投与量は、0, 30 ng/ml (0.1 ml/kg), 300ng/ml (1ml/kg)とし、背部皮下に投与した。対照群は、トルエン/DMSO (1:2 v/v) 1ml/kgをTCDD投与群と同様の方法で投与した。3H-TCDDの30及び300 ng/kgを妊娠140日目あるいは分娩後30日目のアカゲザルに単回皮下投与し、投与7日後に母動物と胎児、新生児における放射能の臓器・組織内濃度を測定することにより胎児移行と乳汁を介する新生児への移行を解析した。妊娠20日から分娩後90日まで、初回投与後30日毎に初回投与量の5%量を追加投与した。投与量及び投与容量は初回は30 ng/kg; 0.1 mL/kg, 300 ng/kg; 1 mL/kg, 2回目以降; 1.5 ng/kg; 0.05 mL/kg, 15 ng/kg; 0.5 mL/kg, また対照群にはトルエン/DMSO (1:2, v/v) 混合液を1 mL/kgの投与容量で背部皮下に投与した。

2. 試験動物

雌アカゲザルは、China National Scientific Instruments & Materials Import/Export Corporation から購入し、株式会社新日本科学で検疫、予備飼育を行った。一般状態の観察、摂餌量測定、体重測定、血液生化学検査を行い、異常のないサル（6～9才、4.7～5.9kg）を用いた。

11年度の追試実験には各群2匹を用いた。中国産雌アカゲザル(年齢:5~7歳,体重:4~6kg)を用いた。妊娠動物の実験は、20匹/群,計60匹を用いた。F1児の実験では、対照群18例(雄6例,雌13例,うち雌1例は人工哺乳中),30ng/kg群15例(雄8例,雌7例)及び300ng/kg群14例(雄8例,雌6例)である。

3. 血漿中 TCDD 濃度測定

大腿静脈からヘパリン採血し、血漿に分離後、島津テクニサーチ分析部にてガスクロマトグラフィー質量分析法にて分析した。

4. 病理組織学的解析

ペントバルビタールナトリウムを静脈注射し、放血安楽死させ、器官および組織の肉眼的観察および病理組織学的解析のための標本を採取した。

5. 観察項目

母動物;一般状態(投与日は1日2回以上,非投与日は1日1回)

体重(妊娠0,20,40,60,80,100,120及び140日ならびに分娩1,10,20,30,40,50,60,70,80,90日)

食欲状態(毎日)

血漿中ホルモン濃度

プロゲステロン,17_エストラジオール及びプロラクチン

妊娠20,30,50,70,90,110,130及び150日に測定

血漿中 TCDD 濃度

妊娠80及び140日に測定

出生児;一般状態〔哺育期(生後90日まで)は1日2回〕

体重(生後1,10,20,30,40,50,60,70,80,90,110,130,150及び180日)

食欲状態(毎日)

形態分化

生後1日に肛門-生殖器間距離及び陰莖長を測定した。

(倫理面への配慮)

サルは愛護的に扱い、サルを麻酔下で、放血安楽死させた。実験関係者に TCDD の影響が及ばないように細心の注意をはらった。ディスプレイブルマスク、キャップ、ゴーグル及び作業衣を着用し、全ての操作はクリーンベンチ内で行う。資料、廃棄物についても、環境を汚染せぬように注意して保管し、最終的には高温焼却により無害化する。

C. 研究結果

平成11年度に予備試験として、血中濃度の測定に必要な採血量および採血間隔を明らかにする目的で2,3,7,8-TCDD(0,30,300ng/kg)を雌アカゲザル各1匹に単回皮下投与し、投与後5,21,49日後にTCDDを測定した実験で、種々の臓器に病理組織学的に異常を示唆する変化を認めた。その確認のため、各群2匹に増やして、組織標本を作成し、病理組織学的解析を行なった。その結果、正常の範囲内であることがわかった。

3H-TCDD の 30 及び 300 ng/kg を妊娠 140 日目あるいは分娩後 30 日目のアケザルに単回皮下投与し、投与 7 日後に母動物と胎児、新生児における放射能の臓器・組織内濃度を測定することにより胎児移行と乳汁を介する新生児への移行を調べた結果、下記のデータを得た。

1. 3H-TCDD の 30 ng/kg を妊娠動物に単回皮下投与した場合、母動物における臓器・組織内濃度（臓器・組織/母体血漿中濃度比）は乳腺、胎盤、脂肪、肝臓、臍帯血及び母体血液の順に高く、胎児臓器・組織では肝臓、血液、脂肪、精巣及び血漿の順に高かった。300 ng/kg 群における母動物臓器・組織では胎盤、脂肪、肝臓、乳腺、母体血液、臍帯血及び臍帯血漿順であり、胎児臓器・組織では肝臓、脂肪、卵巣、血液及び血漿の順であった。

2. TCDD 由来成分は母動物の臓器・組織に血漿中より高い濃度で移行した。また、胎盤経路で胎児にも移行し、肝臓、脂肪及び精巣、卵巣などの生殖器に高濃度で分布した。

3. 投与量を 30 ng/kg から 300 ng/kg に増量すると、母動物及び胎児における血漿中濃度はそれぞれ約 148 倍及び約 108 倍に上昇したが、臓器・組織内濃度の上昇率は母動物、胎児いずれの場合も血漿に比べて低かった。これらの用量範囲では TCDD の体内動態は非線型であり、高用量では母動物と胎児における臓器・組織への移行率は低下した。

4. 3H-TCDD を哺育中の動物に単回皮下投与した場合、放射能は 30 及び 300 ng/kg 群とも血漿中の約 16 倍の濃度で乳汁に移行した。母動物における臓器・組織内の放射能濃度は、いずれの群においても脂肪、肝臓、乳腺及び血液の順に高く、血漿で最も低かった。新生児では脂肪、肝臓、卵巣あるいは精巣及び血液の順であり、血漿で最も低かった。

5. TCDD 由来成分は乳汁に高濃度で移行し、乳汁を介して新生児にも移行した。新生児の臓器・組織分布の状態は母動物の場合と同様であった。

以上の結果から、TCDD は妊娠動物では胎盤経路で胎児へ、また、分娩哺育動物では乳汁を介して新生児に移行することが明らかとなった。母動物、胎児及び新生児のいずれの場合も、TCDD は血漿中濃度よりも高い濃度で臓器・組織に移行した。

高い濃度で臓器・組織に移行した結果、TCDD が臓器障害性を引き起こすかどうかの検討を行っている。

D. 考察

TCDD は妊娠サルでは胎盤経路で胎児へ、また、分娩哺育サルでは乳汁を介して新生児に移行することが明らかとなった。母動物、胎児及び新生児のいずれの場合も、TCDD は血漿中濃度よりも高い濃度で臓器・組織に移行した。この結果、すなわち高い濃度で臓器に移行していることから、今後臓器障害性を引き起こすかどうかを蛋白化学的、分子生物学的解析により明らかにする。

妊娠 20 日から分娩後 90 日までの期間、TCDD を投与した実験では、母動物の死亡はみられなかったが、胎児死亡及び流産がみられた。流産あるいは死産の頻度については明確な用量依存性は見られなかったが、TCDD と胎児死亡、流産あるいは死産との関連性についてその原因を病理組織学的、蛋白化学的、分子生物学的解析により明らかにする必要がある。妊娠アカゲザルおよび哺育中のアカゲザルに TCDD を皮下投与した時の雌雄出生児 (F1) の生後発育、生殖器の形態、精子形成および生殖能に及ぼす影響に関する実験で、雌雄新生児の肛門 - 外生殖器間距離については、TCDD 300 ng/kg 群に短縮傾向が見られた。F1 児をさらに飼育し、雄児では性機能への影響を精液、妊娠母体および児のホルモン解析により明らかにする。TCDD(0, 30, 300 ng/kg)を雌ザルに単回皮下投与した実験で、病理組織学的解析では異常な所見はなかったが、さらに蛋白化学的、分子生物学的解析により TCDD の影響を解析する。この実験の追加実験として、1 年あるいはそれ以上の長期にわたり血中 TCDD 濃度測定を行い、皮下投与後の代謝動態を明らかにする。以上の研究結果を得た後、総合的検討によりダイオキシンの最も妥当な TDI の設定に有用な情報を提供し役立つ。

E. 結論

平成 11 年度に報告した 2,3,7,8-TCDD(0, 30, 300 ng/kg)を雌アカゲザル各 1 匹に単回皮下投与し、投与後 5, 21, 49 日後に TCDD を測定した実験で、種々の臓器に病理組織学的に異常を示唆する変化を認めた。今年度は、その確認のため (追試実験)、各群 2 匹を増やして、組織標本を作成し、病理組織学的解析を行なった。その結果、正常の範囲内であることがわかった。しかし、分子生物学的解析によりさらに検討する。

TCDD は妊娠サルでは胎盤経由で胎児へ、また、分娩哺育サルでは乳汁を介して新生児に移行することが明らかとなった。母動物、胎児及び新生児のいずれの場合も、TCDD は血漿中濃度よりも高い濃度で臓器・組織に移行した。妊娠 20 日から分娩後 90 日までの期間、TCDD 初回投与後 30 日毎に初回投与の 5% 量を追加投与する実験では、いずれの群においても母動物の死亡はみられなかったが、胎児死亡及び流産は対照群で 1 例 (妊娠 40 日)、300 ng/kg 群で 2 例 (妊娠 128 及び 40 日) みられた。死産は対照群で 1 例 (妊娠 146 日)、30 ng/kg 群で 3 例 (妊娠 150, 163 及び 158 日)、300 ng/kg 群で 2 例 (妊娠 140 及び 143 日) みられた。胎児死亡、流産あるいは死産の頻度については明確な用量依存性は見られなかったが、TCDD と胎児死亡、流産あるいは死産との関連性について検討する必要がある。

妊娠アカゲザルおよび哺育中のアカゲザルに TCDD を皮下投与した時の雌雄出生児 (F1) の生後発育、生殖器の形態、精子形成および生殖能に及ぼす影響に関する実験で、雌雄新生児の肛門 - 外生殖器間距離については、TCDD 300 ng/kg 群に短縮傾向が見られた今後、F1 児をさらに飼育し、雄児では性機能への影響を精液、妊娠母体および児のホルモン解析により明らかにする。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kubota, S., Ohara, S., Miyauchi, T., Edo, T., Takayama, E., Tomita, K. and Seyama, Y.: Effects of para-nonylphenol on 92kDa gelatinase secretion by human peripheral lymphocytes and U937 cells in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279:270-274, 2000.

Obata, T. and Kubota, S. Formation of hydroxy radicals by environmental estrogen-like chemicals in rat striatum. *Neurosci. Lett.* 296(1):41-44, 2000.

Obata, T. and Kubota, S. Protective effect of tamoxifen on 1-methyl-4-phenylpyridine-induced hydroxyl radical generation in the rat striatum. *Neurosci. Lett.* 308: 87-90, 2001.

Obata, T., Kubota, S. and Yamanaka, Y. Allopurinol suppresses para-nonylphenol and 1-methyl-4-phenyl-pyridinium ion-induced hydroxyl radical generation in rat striatum. *Neurosci. Lett.* 306 :9-12, 2001.

Obata, T., Yamanaka, Y. and Kubota, S. Protective effect of histidine on para-nonylphenol enhanced hydroxyl free radical generation induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) in rat striatum. *Biochim. Biophys. Acta* (in press)

2 学会発表

Kubota, S., Ihara, T., Takasuga, T., Yasuda, M., Fukusato, T., Hori, H., Nomizu, M., Kobayashi, T., Seyama, Y., and Nagata, R. Tissue distribution of 2,3,7,8-Tetrachloro-dibenzo-P-dioxin in pregnant Rhesus Monkeys and their fetuses following a subcutaneous single injection. *Organohalogen Compounds* 49:255-258, 2000.

Obata, T. and Kubota, S. Nonylphenol stimulates hydroxyl radical formation in rat striatum. *Organohalogen Compounds* 49:388-390, 2000.

Yamazaki, T., Okada, Y., Hisamatsu, Y., Kubota, S., and Kayama, F. Effect of endocrine disrupters on lymphocyte response. *Organohalogen Compounds* 49:394-396, 2000.

Yasuda, M., Ihara, T., Takasuga, T., Kubota, S., Matsui, K., Yamashita, K., and Nagata, R. Effects of 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin on reproduction in Rhesus monkeys. *Organohalogen Compounds* 49:391-393, 2000.

Kubota, S., and Seyama, Y. Bisphenol A suppresses MMP-9 secretion by MDA cells. *Organohalogen Compounds* 49:385-387, 2000.

Kubota, S., Ohara, S., Miyauchi, T. and Nemoto, T. Bisphenol A induces breast cancer cell apoptosis. *Organohalogen Compounds* 53:443-446, 2001.

Obata, T., Yamanaka, Y. and Kubota, S. Angiotensin-converting enzyme inhibitors suppress hydroxylradical generation induced by nonylphenol in striatum. *Organohalogen Compounds* 53:197-200, 2001

Kubota, S., Ihara, T., Oneda, S., Inoue, M., Sato, M., Takasuga, T., Yasuda, M., Fukusato, T., Hori, H., Nomizu, M., Kobayashi, T. and Nagata, R. Kinetic profile of 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-P-dioxin in pregnant and lactating Rhesus monkeys and their infants. *Organohalogen Compounds* 53:88-91, 2001

Kubota, S., Obara, S. and Miyauchi, T. Differential effect of para-nonylphenol on proteinase secretion by human leukemia cells. *Organohalogen Compounds* 53:438-441, 2001.

G 知的所有権の取得状況

なし

研究成果刊行一覧表 (雑誌)

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kubota, S., Ohara, S., Miyachi, T., Edo, T., Takayama, E., Tomita, K. and Seyama, Y.	Effects of para-nonylphenol on 92kDa gelatinase secretion by human peripheral lymphocytes and U937 cells in vitro.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	279	270- 274	2000
Obata, T. and Kubota, S.	Formation of hydroxy radicals by environmental estrogen-like chemicals in rat striatum.	Neurosci. Lett.	296	41-44	2000
Obata, T. and Kubota, S	Protective effect of tamoxifen on 1-methyl-4-phenylpyridine-induced hydroxyl radical generation in the rat striatum	Neurosci. Lett.	308	87-90	2001
Obata, T., Kubota, S. and Yamanaka, Y.	Allopurinol suppresses para-nonylphenol and 1-methyl-4-phenyl-pyridinium ion-induced hydroxyl radical generation in rat.	Neurosci. Lett.	306	9-12	2001
Obata, T., Yamanaka, Y. and Kubota, S.	Protective effect of histidine on para-nonylphenol enhanced hydroxyl free radical generation induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) in rat striatum.	Biochim. Biophys. Acta			印刷中

20000726

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

