

20010887A


様式A (4)

厚生科学研究費補助金研究報告書

平成14年4月10日

厚生労働大臣 坂口 力 殿

住 所

研究者 氏 名 かおこ とよぞう
金子 豊蔵 

(所属機関 国立医薬品食品衛生研究所)

平成 13 年度厚生科学研究費補助金 (生活安全総合研究事業) に係る研究事業を完了したので次のとおり報告する。

研究課題名 (課題番号) : ダイオキシン類の健康影響とくにその TEF を中心としたリスク評価のための実験的基盤研究 (H13 - 生活 - 010)

国庫補助金精算所要額 : 金 55,250,000円也

1. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版及びこれを入力したフロッピーディスク
(別添1のとおり)
2. 厚生科学研究費補助金研究報告書表紙 (別添2のとおり)
3. 厚生科学研究費補助金研究報告書目次 (別添3のとおり)
4. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書 (別添4のとおり)
5. 厚生科学研究費補助金分担研究報告書 (別添5のとおり)
6. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添6のとおり)
7. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況
分担研究報告書中に記載した。
8. 健康危険情報
なし

別添 1

研究費の名称 = 厚生科学研究費補助金

研究事業名 = 生活科学安全総合研究事業

研究課題名 = ダイオキシン類の健康影響とくにその TEF を中心としたリスク評価のための
実験的基盤研究 (H13 - 生活 - 010)

国庫補助金精算所要額 (円) = 55,250,000

研究期間 (西暦) = 2001-2003

研究年度 (西暦) = 2001

主任研究者名 = 金子 豊蔵 (国立医薬品食品衛生研究所)

分担研究者名 = 安田峯生 (広島国際大学保健医療学部)、菅野純 (国立医薬品食品衛生研究所)、矢守隆夫 (癌研究会癌化学療法センター)、藤井義明 (東北大学理学部)、鎌滝哲也 (北海道大学薬学部)、鈴木勝士 (日本獣医畜産大学重医学部)、高木篤也 (国立医薬品食品衛生研究所)、松木容彦 (食品薬品安全センター秦野研究所)、井上達 (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)

研究目的 = 非意図的に生活空間で産生されるダイオキシン類の生体障害に対する正確なリスクアセスメントはそれらの生体障害の機構が十分に明らかでない中でも設定されなければならない。しかしながら、ダイオキシン類の本体に関する様々な分子種の働きについての解明はこの3年間で飛躍的に発展した。この認識に対応した TEF の設定、それを修飾するそれら分子種の変化の可能性をとらえることはリスクアセスメントの信頼性を高めるために必要である。本研究の目的は、ダイオキシン類の生体影響に関する様々な分子種の発現を指標として TEF を求めると共に、発現の亢進と抑制を介する分子種を指標とし、これらの結果を短期および長期の暴露実験と関連づけて進めることにある。

研究方法 = 妊娠マウスに 2,3,7,8-TCDD の投与のみを行う群、TCDD とコルチコステロンを同時に投与する群、コルチコステロンのみを投与する群に分け、妊娠 12.5 日にそれぞれを投与し、妊娠 18.5 日目に胎児を取り出し、口蓋裂の有無を観察した。マウス胎児における上皮・間充織相互作用に関する遺伝子発現に対する影響を検索した。TEF 算定のため、妊娠マウスに各種ダイオキシン類の投与を開始した。(金子)。アカゲザルを交配し、妊娠 20 日に TCDD を皮下投与し、その後 30 日毎に初回投与量の 5% 量を維持量として投与した。妊娠動物は自然分娩させ、児を哺育させた。出生時に体重を測定し、外表を肉眼的に観察した。死産児、生後死亡児は外表の肉眼的観察後に剖検し、主要臓器を病理組織学的に検査した。生存児が 1 歳齢以上に達したところで、指迷路試験により学習、認知機能を検査した (安田)。p53 ヘテロマウスを用いた TCDD 低用量発がん促進実験を開始した (菅野)。ヒ

トガン細胞パネル法を用いて TCDD、TCDF をはじめとする 11 種のダイオキシン類の評価を行った (矢守)。ES 細胞を浮遊培養し、2,3,7,8-TCDD を添加、影響を受ける遺伝子を検索した (高木)。AhRR 遺伝子上流を luciferase 遺伝子に結合させレポーター遺伝子を作製し、転写活性を測定した。制御配列への因子の結合は GMSA (Gel mobility shift assay) によって行い、特定の因子の同定には抗体を用いたスーパーシフト法によって確認した。AhRR 遺伝子のクロモソームマッピングは FISH 法によって行った。CYP1A2 の XREII への結合因子のクローニングは、XREII の塩基配列を持ったアフィニティーカラムによって精製し、エドマン分解によって部分アミノ酸配列を決定し、そのアミノ酸配列に基づいて行った。さらに、AhR の生殖機能への関わりを AhR-KO マウスを用いて行った (藤井)。ダイオキシンの標的遺伝子を同定するため、マウスおよび AhR 欠損マウスにメチルコランスレン (MC) を投与した。最終投与より 24 時間後に屠殺し、肝を摘出した。肝より全 RNA を調製した。AhR によりその mRNA の発現が制御されている遺伝子の発現におよぼすこれらの化学物質の影響を differential display 法を用いて解析する。(鎌滝)。幼若ラットに対する誘起排卵モデルの構築排卵誘起のための eCG 投与日齢を検討するとともに定量 RT-PCR とダイオキシン測定用 ELISA の条件検討を行う (松木)。卵巣摘出ラットを用いた生殖毒性試験の条件検討を行う (鈴木)。韓国の慶州で開かれる 21th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants (POPs) 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 (井上、広瀬)。

結果と考察 = 口蓋裂の発生は、TCDD 群に対し、TCDD +CS 群では口蓋裂の発生率は CS 投与により増加傾向が認められ、TCDD と CS は口蓋裂発生に相加的に働くことが示唆された。また、特定の遺伝子発現が顔面の特定部位において減少していることが明かとなった。この遺伝子と口蓋裂発生との関連について今後検討していく (金子)。TCDD 投与を受けたアカゲザルから生まれた生後死亡児の病理組織学的検査で 2 例に腎臓の両側性異形成が認められ、TCDD が腎臓の発生に悪影響を及ぼしている可能性が示唆された。指迷路予備試験の結果については、例数を増して検討する必要がある。今後は、親動物を再度妊娠させ、第 2 児 (F1b) を分娩させて、第 1 児 (F1a) での所見の再現性を確認する (安田)。TEF との関連における展開として、少数種類の代表的 PCDD、PCDF、および Coplanar PCB の投与実験および関連遺伝子発現プロファイリングを開始した結果、一部の物質についてリガンド依存的なプロファイル (の差) が存在することが確認された (矢守)。TCDD の発がん促進作用の検討および、TEF との関連性 (力価・シグナル伝達経路の多様性の有無--AhR 以外への入力の有無) の検討のため、Tg.AC/AhRKO マウス作成に向けての C57BL/6 へ Back cross した。AhR(+ / +) および AhR(- / -) マウスに対する、各種 PCDD、PCDF、および、Coplanar PCB の影響を遺伝子発現プロファイル解析を開始点として、マウスにおけるフェノタイプとの対比、およびヒトガン細胞パネルにおける遺伝子発現プロファイルおよび細胞増殖促進・抑制効果との対比を開始し、

データの蓄積を行った。今後、これらの *in vivo* 系と、AhRKO マウスの組み合わせを用いた、AhR 依存性・非依存性影響を含むリガンド依存性生体影響メカニズム解析を進め、これに基づいた TEF 評価を進める（菅野）。*In vitro* 試験系で、ES 細胞由来の胚葉体の上皮・間充織間の相互作用に関与する一部の遺伝子発現の変化が TCDD により起こされることが明かとなった（高木）。AhRR 遺伝子の染色体上での局在は、マウスでは 13C2、ラットでは 1p11.2、ヒトでは 5p15.3 の位置にマップされることを明らかにした。これらの染色体上の位置は各々種間で相同性のあることが知られている領域である。マウスの AhRR 遺伝子 3.2kb 上流までを luciferase 遺伝子に結合し、レポーター遺伝子とし、欠失変異と点変異を導入して発現制御に関係している 3 個の GC box、3 個の XRE、1 個の NF- κ B 部位を決定した。また、これらの制御配列には、各々、Sp1 又は Sp3、AhR/Arnt、NF- κ B が結合し各々協調的に AhRR の発現を活性化することが示された。また CYP1A2 の転写活性化に働く XREII には因子 X が結合するが、その一時構造を cDNA クローニングによって決めることができた。さらに AhR/Arnt はその因子 X に結合して CYP1A2 遺伝子の発現を活性化することが示された。また、AhR ノックアウトマウスの解析を進めた結果、AhR-KO マウスの遺伝的背景（Genetic background）を C57BL/6j に揃えると雌は不妊になった。この不妊のメカニズムの解析をさらに進めている。これらの結果、AhR は転写因子として異物に対する生物応答の他に多くの生物現象に関わっていることが分かって来た（藤井）。ダイオキシンの標的遺伝子をスクリーニングした結果、特に低分子プレキニノーゲン遺伝子の発現が MC により抑制されていた。MC の投与による低分子プレキニノーゲン遺伝子の発現量の低下は、PAH の毒性にみられる高血圧の原因のひとつであると考えられる（鎌滝）。TCDD の生殖毒性に及ぼす影響解析のための条件設定を行った。肝臓から合成した cDNA を約 3 万倍まで段階希釈して、Real-Time RT-PCR 装置を用いて AhR、ARNT、CYP1A1 および GAPDH をコードする cDNA を定量し、良好な直線性を得た。ELISA 法において TCDD 1~100 pg/well の範囲で測定可能となり、TCDD を 10 pg/g 以上含む生体試料を測定可能となった（松木）。ラットを 6 週齢で卵巣摘出、7 週齢から投与する試験系における、E2 単独群と TCDD 併投群を設定するための予備的検討を行った。次年度以降、ダイベンゾフラン、PCB についても、実験し相対力価を求める（鈴木）。Dioxin' 2001 シンポジウムでは、幅広い研究分野における成果の発表やディスカッションが行われ、特に、ダイオキシンの毒性発現メカニズムや TEF を用いたリスク評価に関して情報収集を行った。今までの TEF の算出法は、動物実験の投与量値や *in vitro* 実験の処理濃度を基にした REP (relative potency factor) から求めていたが、最近のダイオキシンの TDI 等の算定は投与濃度ではなく体内負荷量を基に算定されている現実からすると TEF の算定方法も再考する必要があると考えられる。試みにバックグラウンド暴露を受けている TEQ の約 80% を占めている 6 種類のダイオキシン類について肝臓中濃度を基にした REP から TEQ をもとめ、WHO-TEF を用いた TEQ と比較した。その結果、今回試算した TEQ は WHO-TEF を用いた値の約 3 分の 1 になるという結果が得られた (Connor and Finley, 2001)。しかし、REP を求めるための生体内中の組織濃度に関する情報は限

られており、現時点ではすべてのダイオキシン類に対して適切な REP を算出することはできないが、今回の方法は、より適切なリスクアセスメントを行うための論理的なモデルであると考えられた（井上、広瀬）。

結論 = 口蓋上皮細胞の増殖抑制の過程では、TCDD と CS は口蓋裂発生に相加的に働くことが示唆された。また、TCDD は顔面前部の特定遺伝子の発現に影響することが明らかになり、ダイオキシンの奇形発生の機序解明に結びつく端緒が得られた。アカゲザルの児の発生・発育・行動に影響を及ぼす体内負荷量が設定され今後の実験基盤を樹立できた。ガン細胞パネルを用いて TCDD、TCDF をはじめとする 11 種のダイオキシン類をガン細胞パネルで評価した結果、その阻害パターン（Finger Print）は固有の様相を呈した。この結果、構造活性相関、ならびに感受性の違いを説明する分子メカニズムの解明は、ダイオキシン類の毒性機構を理解する上で重要と考えられる。TCDD の分子メカニズムとして各種標的遺伝子が明らかになった。ダイオキシン受容体である AhR を対象とした種々の解析結果から、AhR 作用の抑制因子 AhRR の遺伝子発現に必要な制御配列とそれに結合して働く因子を明らかにした。さらに、AhR ノックアウトマウスを用いた *in vivo* の研究から AhR が生殖機能に働くことを見出した。以上、本研究班における研究の進展の結果、これまで全く説明することの困難であったダイオキシンの生体影響本体の解明に近づきつつある。他方、解明される分子種を TEF 設定することにより、より現実的なリスクアセスメントに寄与することが期待される。

別添 2

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） = ダイオキシン類の健康影響とくにその TEF を中心
としたリスク評価のための実験的基盤研究（H13 - 生活 - 010）

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 金子 豊蔵

平成 14（2002）年 4 月

別添 3

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

ダイオキシン類の健康影響とくにその TEF を中心としたリスク評価のための
実験的基盤研究 (H13 - 生活 - 010) 金子 豊蔵

II. 分担研究報告書

1. 奇形発生と T E F 金子 豊蔵
2. ダイオキシンの胎生期暴露のサル児の行動発達に及ぼす影響 安田 峯生
3. ダイオキシンの発がん性と T E F 菅野 純
4. 細胞アレイを指標とした発がん評価 矢守 隆夫
5. Ahr/Arnt の作用メカニズムの分子的基盤と標的遺伝子の検索 藤井 義明
6. Aryl hydrocarbon receptor (AhR) の機能 鎌滝 哲也
7. 胚幹細胞 (E S 細胞) に対するダイオキシンの影響 高木 篤也
8. 幼若ラットに対する誘起排卵抑制におけ Toxic Equivalency Factors (TEF) の妥当性に関する検証 松木 容彦
9. ダイオキシン類の短期間雌雄ラットへの暴露が生殖器に及ぼす影響 鈴木 勝士
10. ダイオキシン等のリスクコミュニケーションに関する検討 井上 達
11. ダイオキシン類の毒性学的研究における国際動向に関する研究 広瀬 明彦

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別冊

厚生科学研究費補助金（生活総合研究事業）

I. 総括研究報告書

ダイオキシン類の健康影響とくにその TEF を中心としたリスク評価のための
実験的基盤研究（H13 - 生活 - 010）

主任研究者 金子豊蔵 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メカニズムの解析による健康影響評価の科学的基盤形成のためのこれまでの研究の結果、アрил hidrocarbon リセプター (AhR) を介したダイオキシン類の生体影響に対する理解は飛躍的に発展した。特に、AhR とそのリプレッサーの相互作用、AhR の cytochrome-P450 (CYP) 以外の共役シグナル分子のクローニング、更に、AhR に対する内因性リガンドの発見により、ダイオキシン類の生体作用が、主として、1) 受容体原性の低用量作用をもっていること、2) リプレッサーとの競合によるシグナルの修飾の可能性、3) 生体内リガンドとの相互作用の可能性などから、単純な用量相関関係に基づくリスク評価の可能性を危うくしていることが明らかとなった。本厚生科学ダイオキシン生体影響研究の課題は、こうした現状に対応すべく、次の3点に亘って、全体研究を推進した。すなわち 1) 各種のシグナル分子 (AhR、AhR リプレッサー、CYP 系分子種、その他の新しい関連分子種) の各種ダイオキシン類の暴露に対する誘導、並びに、発現抑制に関する毒性等価指数 (TEF: Toxic Equivalency Factor) を求めること、2) すでに明らかにされつつある、ダイオキシン類の受容体原性毒性に対して、口蓋裂発生の分子背景の解明を含む、種々のシグナル分子の相互作用を明らかにすること、3) 短期および長期の暴露実験の継続とそこから得られる新しい、生体影響リスクの上記 1) との比較検討である。平成13年度においては上記計画に沿って研究に着手した。これまでに得られた主な成果として、奇形誘発に関しては、マウスを用いて上皮・間充織間の相互作用に対する TCDD の分子レベルでの影響の検討を行い、形態形成に関与する特定の遺伝子発現が上顎部位において消失していることを明らかにした (金子)。アカゲサルを用いた胎児毒性試験を開始した (安田)。発がん性に関しては、ガン細胞パネルのインフォマティクスをダイオキシン毒性、特に細胞増殖に関連する影響の比較解析に活用し、それを基にした毒性分子機構の解析を行った (矢守、菅野)。障害発現機構については、AhR シグナル伝達機構について解析し、AhRR の発現制御機構にフィードバックの機構が

存在することを明らかにした。AhR と Arnt はエストロジェン受容体のコアクチベーターとして働くことを明らかにした。また、AhR ノックアウトマウスの解析から、AhR は生殖にも関与していることを明らかにした（藤井）。肝臓を対象に、ディファレンシャルディスプレイ法を用いたスクリーニングにより血圧の調節に関与するプレキニノーゲン遺伝子が AhR 依存的に抑制されることを明らかにした（鎌滝）。また、ES 細胞を用いてダイオキシンにより影響を受ける遺伝子のスクリーニングを行い、形態形成に関与する遺伝子群が減少することを明らかにした（高木）。生殖発生毒性の基礎的検討を行った（鈴木、松木）。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い TEF の設定に関する有用な情報が得られた（井上、広瀬）。以上、本研究においてダイオキシンの毒性に関する有用な知見が数多く得られた。

分担研究者

安田峯生（広島国際大学保健医療学部）
菅野 純（国立医薬品食品衛生研究所）
矢守隆夫（癌研究会癌化学療法センター）
藤井義明（東北大学理学部）
鎌滝哲也（北海道大学薬学部）
鈴木勝士（日本獣畜産大学重医学部）
高木篤也（国立医薬品食品衛生研究所）
松木容彦（食品薬品安全センター秦野研究所）
井上 達（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）

A. 研究目的

本研究の目的は、ダイオキシン類の生体影響に関する様々な分子種の発現を指標として TEF を求めると共に、発現の亢進と抑制を介在する分子種を指標とし、これらの結果を短期および長期の暴露実験と関連づけて進めることにある。非意図的に生活空間で産生されるダイオキシン類の生体障害に対する正確なリスクアセスメントはそれらの生体障害の機構が

十分に明らかでない中でも設定されなければならない。しかしながら、ダイオキシン類の本体に関する様々な分子種の働きについての解明はこの3年間で飛躍的に発展した。この認識に対応した TEF の設定、それを修飾するそれら分子種の変化の可能性をとらえることはリスクアセスメントの信頼性を高めるために必要である。本研究の3つの構成部分はこれに貢献する上で必要であり、成果が期待されるものである。具体的には、上皮・間充織の相互作用に対する TCDD の影響について遺伝子レベルで明らかにするとともに各種ダイオキシン類の C57BL/6 マウスにおける口蓋裂の最小発生量を求め、TEF の決定に役立つ生物学的指標の確立を目指す（金子）。胎生期暴露がヒトの中樞神経系の発達に悪影響を及ぼしているのではないかと検討する（安田）。ダイオキシン発がんの分子メカニズムの解明を進める（菅野、矢守）。AhR の作用メカニズムや標的遺伝子等を明らかにして、ダイオキシンやその他の多環性芳香族化合物の生

体に対する作用を明らかにすると共に、AhR の本来の発生、生殖における役割を明らかにする。これはダイオキシンやその他の環境汚染物質の生体に対する影響を考える上で必須の情報を与え、その対策を考える上でも不可欠な知見である。AhR の機能について外来異物に対する生体応答から発生分化まで、より包括的な理解が期待できる（藤井、鎌滝、高木）。ダイオキシンのラット母体投与後、次世代の雄の生殖に及ぼす影響の用量相関を解明する。着床と初期発生に対するダイオキシンの影響、雄性副生殖器形成に関わる遺伝子発現機構とダイオキシンあるいは AhR との関係解明などが期待される（鈴木）。幼若ラットに対する誘起排卵モデルを用いて、ダイオキシン類投与後の誘起排卵などの雌性生殖の変化をダイオキシン類の動態と併せて対比することにより、雌性生殖に対する影響評価における TEF の妥当性を検証する（松木）。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（井上）（広瀬）。

B. 研究方法

C57BL/6 妊娠マウスに 2,3,7,8-TCDD の経口投与のみを行う 3 群、これらの用量の TCDD と CS50mg/kg を同時に皮下投与する 3 群、CS50mg/kg のみを皮下投与する 1 群の計 7 群に分け、妊娠 12.5 日にそれぞれを投与し、妊娠 18.5 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。C57BL/6 の妊娠マウス（妊娠 12.5 日）に 2,3,7,8-TCDD を単回経口投与し、投与後、経時的に胎児を採取した。C57BL/6

妊娠マウスに PCDD, HCDD, TCDF, PCDF 等の各種ダイオキシン類の投与を開始した。上皮・間充織相互作用に関する遺伝子の発現レベルを whole mount in situ hybridization 法にて検索した（金子）。アカゲザルを交配し、約 60 匹を 3 群に分け、妊娠 20 日に TCDD を皮下投与し、その後 30 日毎に初回投与量の 5% 量を維持量として投与した。妊娠動物は自然分娩させ、児を哺育させた。母体への TCDD 投与は分娩後 90 日まで続けた。出生時に体重を測定し、外表を肉眼的に観察した。死産児、生後死亡児は外表の肉眼的観察後に剖検し、主要臓器を病理組織学的に検査した。生存児が 1 歳齢以上に達したところで、指迷路試験により学習、認知機能を検査した（安田）。発がんプロモーター実験（2 段階発がんを含む）として、易発がん性遺伝子改変モデルから、p53KO モデルを、また、プロモーター物質感受性遺伝子改変モデルとして、Tg.AC モデルを用いて検討を加えてきた。進捗状況としては、p53 ヘテロマウスを用いた TCDD 低用量発がん促進実験を開始した（菅野）。ヒトがん細胞パネル法を用いて TCDD、TCDF をはじめとする 11 種のダイオキシン類の評価を行った（矢守）。ES 細胞を浮遊培養し、2,3,7,8-TCDD を DMSO に溶解して添加した。添加、4 日後の浮遊培養により形成された胚様体あるいは 4 日から 5 日までの 24 時間培養の胚様体より RNA を抽出後、c-DNA マイクロアレイを用いて影響を受ける遺伝子を同定した（高木）。AhRR 遺伝子上流を luciferase 遺伝子に結合させレポーター遺伝子を作製し、HeLa 細胞に導入し、3MC あるいは TPA を培養液に与え

て、luciferase 活性を測定することによって転写活性を測定した。さらに適当な制限酵素によって上流を切断して欠失変異体を作り、その転写活性を測定した。制御配列への因子の結合は GMSA (Gel mobility shift assay) によって行い、特定の因子の同定には抗体を用いたスーパーシフト法によって確認した。AhRR 遺伝子のクロモソームマッピングは FISH 法によって行った。CYP1A2 の XREII への結合因子のクローニングは、XREII の塩基配列を持ったアフィニティーカラムによって精製し、ゲル電気泳動後に各々のバンドからタンパク質を溶出し、エドマン分解によって部分アミノ酸配列を決定し、そのアミノ酸配列に基づいて行った。AhR の生殖機能への関わりを AhR-KO マウスを用いて行った (藤井)。7 週齢の雄性野生型マウスおよび AhR 欠損マウスに MC を投与した。投与量は 80 mg/kg とし、2 日間腹腔内単回投与した。最終投与より 24 時間後に屠殺し、肝を摘出した。肝より全 RNA を調製した。AhR によりその mRNA の発現が制御されている遺伝子の発現におよぼすこれらの化学物質の影響を differential display 法を用いて解析した。結果をノーザンブロット分析により検証した。MC の投与により発現が大きく変化した遺伝子については、MC による毒性の発現との関連を検討した (鎌滝)。幼若ラットに対する誘起排卵モデルの構築排卵誘起のための eCG 投与日齢を検討するために、雌ラット 24、25 あるいは 26 日齢に eCG を 1 回皮下投与して毎日体重を測定し、eCG 投与 3 日後に剖検した。剖検では、排卵数および黄体数を数え、卵

巣および子宮重量を測定した (松木)。ラットを 6 週齢で卵巣摘出し、7 週齢から投与を開始する。E2 単独群と TCDD 併投群を設け、最終投与後 24 時間で解剖して、卵巣、子宮、膈、肝臓およびその他変化の見られた臓器について採材し、湿重量を測定する。子宮についてはブロット後の重量も測定する (鈴木)。韓国の慶州で開かれた 21th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants (POPs) : Dioxin' 2001 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し、特に、ダイオキシンの胎児期暴露による影響、子宮内膜症およびアリルヒドロカーボンレセプター (AhR) を介した毒性発現メカニズム等に関する新知見を収集した (井上、広瀬)。また、ダイオキシン問題のリスクコミュニケーションに資するため、本研究班の成果の一部を国立医薬品食品衛生研究所のホームページ上に公開する (井上)。

C. D. 研究結果と考察

口蓋裂口蓋裂の発生は、TCDD 群に対し、TCDD + CS 群では口蓋裂の発生率は CS 投与により増加傾向が認められ、TCDD と CS は口蓋裂発生に相加的に働くことが示唆された。上皮・間充織間の相互作用に関する遺伝子発現について TCDD の分子レベルでの影響を whole mount in situ hybridization 法で検討した結果、ある種の遺伝子発現が顔面の特定部位において減少していることが明かとなった。口蓋裂発生との関連については今後検討する

(金子)。TCDD 投与を受けたアカゲザル母体には、投与部の発赤、痂皮形成以外には変化は認められず、妊娠期間、生下時体重には各群間に差は見られなかった。死産児、生後死亡児には粗大な形態異常は認められなかった。生後死亡児の病理組織学的検査で 2 例に腎臓の両側性異形成が認められ、TCDD が腎臓の発生に悪影響を及ぼしている可能性が示唆された。指迷路予備試験の結果については、例数を増して検討する必要がある。今後は、親動物を再度妊娠させ、第 2 児 (F1b) を分娩させて、第 1 児 (F1a) での所見の再現性を確認する (安田)。TEF との関連における展開として、少数種類の代表的 PCDD、PCDF、および Coplanar PCB の投与実験および関連遺伝子発現プロファイリングを開始した結果、一部の物質についてリガンド依存的なプロファイル (の差) が存在することが確認された (矢守)。TCDD の発がん促進作用の検討および、TEF との関連性 (力価・シグナル伝達経路の多様性の有無--AhR 以外への入力の有無) の検討のため、Tg.AC/AhRKO マウス作成に向けての C57BL/6 へ Back cross した。AhR (+/+) および AhR (-/-) マウスに対する、各種 PCDD、PCDF、および、Coplanar PCB の影響を遺伝子発現プロファイル解析を開始点として、マウスにおけるフェノタイプとの対比、およびヒトガン細胞パネルにおける遺伝子発現プロファイルおよび細胞増殖促進・抑制効果との対比を開始し、データの蓄積を行った。今後、これらの *in vivo* 系と、AhRKO マウスの組み合わせを用いた、AhR 依存性・非依存性影響を含むリガンド依存性生体影響メカニ

ズム解析を進め、これに基づいた TEF 評価を進める (菅野)。EB の 4 日間培養後において、内胚葉、中胚葉、外胚葉のマーカー遺伝子の発現には TCDD による影響は認められなかった。また、TCDD により誘導されることが知られている Cyp1a1 の増加は認められなかった。一方、上皮・間充織間の相互作用に関与する一部の遺伝子発現の変化が認められた。24 時間培養ではこの上皮・間充織間の相互作用に関与する遺伝子発現の減少が認められ、TCDD が上皮・間充織の相互作用を阻害していることが示唆された。また、24 時間培養では上皮・間充織の相互作用に関与する遺伝子の減少が見られなかったことから、これらは TCDD による反応において、より後期で見られる event であると思われる (高木)。AhRR 遺伝子の染色体上での局在を FISH 法で決定した。その結果、マウスでは 13C2、ラットでは 1p11.2、ヒトでは 5p15.3 の位置にマップされることが分かった。これらの染色体上の位置は各々種間で相同性のあることが知られている領域である。マウスの AhRR 遺伝子 3.2kb 上流までを luciferase 遺伝子に結合し、レポーター遺伝子とし、欠失変異と点変異を導入して発現制御に関係している 3 個の GC box、3 個の XRE、1 個の NF- κ B 部位を決定した。また、これらの制御配列には、各々、Sp1 又は Sp3、AhR/Arnt、NF- κ B が結合し各々協調的に AhRR の発現を活性化することが示された。また CYP1A2 の転写活性化に働く XREII には因子 X が結合するが、その一時構造を cDNA クローニングによって決めることができた。さらに AhR/Arnt はその因子 X に結合して CYP1A2

遺伝子の発現を活性化することが示された。現在バッククロスを繰り返すことにより、その詳しい解析を進めている。AhR-KOマウスの遺伝的背景 (Genetic background) を C57BL/6j に揃えると雌は不妊になった。この不妊のメカニズムの解析をさらに進めている。これらの結果、AhR は転写因子として異物に対する生物応答の他に多くの生物現象に関わっていることが分かって来た。AhR の本来の機能をさらに進めることによって AhR についての包括的理解が得られる可能性がある (藤井)。野生型マウスに MC を投与し、differential display 法で発現が変化している mRNA を調べた結果、肝臓において発現が変化する遺伝子が 63 クローン得られた。見いだした 63 クローンの中で特に低分子プレキニノーゲン遺伝子の発現が MC により抑制されていた。低分子プレキニノーゲンの抑制は、AhR 欠損マウスでは認められず AhR 依存的であった。低分子プレキニノーゲンはブラジキニンの前駆体である。ブラジキニンは血管の弛緩により血圧を低下する作用を有する。そこで MC の投与により血漿中のブラジキニンの濃度が低下するか否かを検討した。MC の投与により血漿中のブラジキニンの濃度が低下することを見いだした。ブラジキニン濃度の低下も AhR 依存的であった。MC の投与による低分子プレキニノーゲン遺伝子の発現量の低下は、PAH の毒性にみられる高血圧の原因のひとつであると考えられる (鎌滝)。TCDD 投与後 72 時間 (eCG 投与後 48 時間)、すなわち誘起排卵予定日前日には、TCDD 投与群において肝臓重量が増加し、胸腺重量が低下した。また、

子宮重量が増加したが、卵巣重量に有意差は認められなかった。肝臓から合成した cDNA を約 3 万倍まで段階希釈して、Real Time RT-PCR 装置を用いて AhR、ARNT、CYP1A1 および GAPDH をコードする cDNA を定量し、良好な直線性が得られた。ELISA 法において TCDD 1~100 pg/well の範囲で測定可能となり、TCDD を 10 pg/g 以上含む生体試料を測定可能となった。確立した ELISA の測定感度は 1pg であったことから、TCDD 投与ラットの血漿、肝臓および胸腺中の TCDD 濃度の測定が可能であると考えられる (松木)。ラットを 6 週齢で卵巣摘出、7 週齢から投与する試験系における、E2 単独群と TCDD 併投群を設定するための予備的検討を行った。次年度以降、ダイベンゾフラン、PCB についても、実験し相対力価を求める計画である (鈴木)。Dioxin' 2001 シンポジウムでは、ダイオキシン類を含めた有機化学汚染物質に対して、分析法や生成分解過程、汚染状況、毒性、毒性発現機序、疫学調査、リスクアセスメント・マネージメントと幅広い研究分野における成果の発表やディスカッションが行われ、特に、ダイオキシンの毒性発現メカニズムや TEF を用いたリスク評価に関して情報収集を行った。今までの TEF の算出法は、動物実験の投与量値や in vitro 実験の処理濃度を基にした REP (relative potency factor) から求めていたが、最近のダイオキシンの TDI 等の算定は投与濃度ではなく体内負荷量を基に算定されている現実からすると TEF の算定方法も再考する必要があると考えられる。試しにバックグラウンド暴露を受けている TEQ の約 80% を占めて

いる 6 種類のダイオキシン類について肝臓中濃度を基にした REP から TEQ をもとめ、WHO-TEF を用いた TEQ と比較した。その結果、今回試算した TEQ は WHO-TEF を用いた値の約 3 分の 1 になるという結果が得られた (Connor and Finley, 2001)。しかし、REP を求めるための生体内中の組織濃度に関する情報は限られており、現時点ではすべてのダイオキシン類に対して適切な REP を算出することはできないが、今回の方法は、より適切なリスクアセスメントを行うための論理的なモデルであると考えられた (井上、広瀬)。また、ダイオキシン問題のリスクコミュニケーションに資するため、本研究班の成果の一部を国立医薬品食品衛生研究所のホームページ上に公開した。(井上、広瀬)。

E. 結論

口蓋上皮細胞の増殖抑制の過程では、TCDD と CS は口蓋裂発生に相加的に働くことが示唆された。また、TCDD は顔面前部の特定遺伝子の発現に影響することが明らかになり、ダイオキシンの奇形発生の機序解明に結びつく端緒が得られた。アカゲザルの児の発生・発育・行動に影響を及ぼす体内負荷量が設定され今後の実験の基盤を樹立できた。ガン細胞パネルを用いて TCDD、TCDF をはじめとする 11 種のダイオキシン類をガン細胞パネルで評価した結果 TCDF のみが有意の細胞増殖阻害を示し、その阻害パターン (Finger Print) は固有の様相を呈した。この結果、構造活性相関、ならびに TCDF に対する感受性の違いを説明しうる分子メカニズム

の解明は、ダイオキシン類の毒性機構を理解する上で重要と考えられる。TCDD の分子メカニズムとしては ES 細胞培養系において、上皮の分化を阻害すると共に、上皮・間充織の相互作用を阻害することが示唆される結果が得られた。さらに、*in vitro* の解析から AhR 作用の抑制因子 AhRR の遺伝子発現に必要な制御配列とそれに結合して働く因子を明らかにした。CYP1A2 の遺伝子発現機構の研究から AhR/Arnt が Coactivator として働くメカニズムをさらに詳しく検討した。AhR ノックアウトマウスを用いた *in vivo* の研究から AhR が生殖機能に働くことを見出した。ダイオキシンの標的遺伝子を同定する研究からプレキニノーゲン遺伝子の発現が抑制されることが分かり、この抑制は AhR 依存的であり、PAH の毒性にみられる高血圧の原因のひとつであると考えられ、ダイオキシンの種々の毒性機構の一端が明らかになった。ダイオキシンの生殖系に与える影響についても実験条件設定が順調に推移し、次年度からの実験が期待された。以上、本研究班における研究の進展の結果、これまで全く説明することの困難であったダイオキシンの生体影響本体の解明に近づきつつある。他方、解明される分子種を TEF 設定することにより、より現実的なリスクアセスメントに寄与することが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

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

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

the formation of a single heart tube.
Development 126:3437-3447, 1999.

2. 学会発表

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

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

奇形発生と TEF

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

AhR 遺伝子欠失マウスにおいて PCTs 投与により口蓋裂が発症することから、PCTs による口蓋裂は、AhR を介さず、グルココルチコイドレセプター (GR) を介する機構により誘導されることをこれまでの研究で明らかにしてきた。今回、TCDD とコルチコステロン (CS) を同時投与し、TCDD 口蓋裂の発症に及ぼす CS の影響について検討した。その結果、TCDD と CS は口蓋裂発生に相加的に働くことが示唆された。また、口蓋裂発症機序解明のため、胎児の、上皮・間充織相互作用に関する遺伝子発現レベルに対する TCDD の影響を whole mount in situ hybridization 法で検索した結果、顔面の hair follicle における一部の遺伝子発現が TCDD により減少し、TCDD がこれらの遺伝子に影響していることが示唆された。

A. 研究目的

TCDD およびグルココルチコイドによる口蓋裂はそれぞれ AhR、グルココルチコイドレセプター (GCR) を介し、二次口蓋の閉鎖過程において口蓋上皮細胞の増殖抑制により起こることが明らかにされている。そこで、TCDD と CS を同時に投与し、TCDD 口蓋裂の発症に及ぼす CS の影響について検討した。また、口蓋裂の発症機構解明のため、上皮・間充織の相互作用に関する遺伝子発現レベルを検索した。

B. 方法 :

実験 1. C57BL/6 妊娠マウスを、2, 3, 7, 8-TCDD をコーン油に溶解し、2.5 μ g/kg, 5 μ g/kg, 10 μ g/kg の経口投与のみを行う 3 群、これらの用量の TCDD と CS50mg/kg を同時に皮下投与する 3 群、CS50mg/kg のみを皮下投与する 1 群の計 7 群に分け、妊娠 12.5 日それぞれを投与し、妊娠 18.5 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。

実験 2. C57BL/6 の妊娠マウス (妊娠 12.5 日) に口蓋裂誘導に十分量の 2, 3, 7, 8-

TCDD(20ug/kg 体重)を単回経口投与し、投与後、経時的に胎児を採取した。上皮・間充織相互作用に関する遺伝子の発現レベルを whole mount in situ hybridization 法にて検索した。

C. 研究結果

1. 口蓋裂の発生は、CS50mg/kg 群では 0/51 (0%)、TCDD2.5 μg/kg 群では 0/45 (0%) および、TCDD2.5 μg/kg+CS 群では 0/46 (0%) でいずれの群にも口蓋裂は見られなかった。TCDD 5 μg/kg 群では 3/45 (6.7%) でわずかに認められたが、TCDD 5 μg/kg+CS 群では 5/55 (9.1%) で発現率に大きな差はなく CS 投与による影響は認められなかった。しかし、TCDD 10 μg/kg 群では 43/81 (53.1%) であるのに対し、TCDD 10 μg/kg+CS 群では 68/95 (71.6%) で口蓋裂の発生率は CS 投与により増加が認められた。
1. 上皮・間充織間の相互作用に関する遺伝子発現について TCDD の分子レベルでの影響を whole mount in situ hybridization 法で検討した結果、一部の遺伝子発現が顔面の上唇あるいは下唇における hair follicle において消失していることが明かとなった。一方、これらの変化は顔面の他の hair follicle では認められなかった。

D. 考察

TCDD と CS の複合投与において CP 発生率が明らかに増加した。このことから口蓋上皮細胞の増殖抑制の過程では、TCDD と CS は口蓋裂発生に相加的に働くことが明らかになったと考える。一方、TCDD は顔面前部における hair follicle の遺

伝子発現に影響を及ぼしていることが明かとなった。顔面の毛の発生に関する TCDD の毒性は報告されていないことから、これらの変化が直ちに毛の発生異常に結びつくものではないと思われた。今後、これらの遺伝子発現がどのような機序で抑制されているか、また、口蓋裂発生との関連性について検討する予定である。

また、TEF の決定に役立つ生物学的指標の確立を目指し、最少口蓋裂発生用量をもとめる目的で C57BL/6 妊娠マウスに PCDD, HCDD, TCDF, PCDF 等の各種ダイオキシン類の投与を開始した。

E. 結論

口蓋上皮細胞の増殖抑制の過程では、TCDD と CS は口蓋裂発生に相加的に働くことが示唆された。また、TCDD は顔面前部の hair follicle の遺伝子発現に影響することが示唆された

F. 研究発表

1. 論文発表

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

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

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

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

厚生科学研究費補助金（生活安全総合事業）

分担研究報告書

ダイオキシンの胎生期暴露のアカゲザル児の行動発達に及ぼす影響

安田峯生 広島国際大学

研究要旨

1 群約 20 匹のアカゲザルを用い、妊娠 20 日から分娩後 90 日まで母体に 0、30 または 300 ng/kg の 2, 3, 7, 8-四塩化ジベンゾパラジオキシン (TCDD) を負荷し、児の行動発達を観察した。妊娠期間や生下時体重には各群間に差は認められなかった。流死産率は対照群 2/20、30 ng/kg 群 4/19、300 ng/kg 群 4/20、生後死亡は対照群 3/18、30 ng/kg 群 1/15、300 ng/kg 群 8/16 と、300 ng/kg 群での死亡が目立った。生後死亡児の病理組織学的検査で 300 ng/kg 群の 2 例に腎臓の両側性異形成が認められた。生存児について平成 13 年度には指迷路試験を試行した。予備的な実験では TCDD 負荷群児の成績が対照群よりも良いことを示唆する結果が得られたが、例数を増して検討する必要がある。

A. 研究目的

A. 研究目的

本研究の目的は、体内負荷量がほぼ一定となるような条件で妊娠アカゲザルに TCDD を投与し、その児の行動発達への影響を調べ、現在のダイオキシン類の耐容一日摂取量 (TDI) の妥当性を検討することである。

B. 研究方法

アカゲザルを交配し、約 60 匹を 3 群に分け、妊娠 20 日に TCDD 0 (溶媒)、30 または 300 ng/kg を皮下投与し、その後 30 日毎に初回投与量の 5% 量を維持量として投与した。妊娠動物は自然分娩させ、児を哺育させた。母体への TCDD 投与は分娩後 90 日まで続けた。出生時に体重を測定

し、外表を肉眼的に観察した。死産児、生後死亡児は外表の肉眼的観察後に剖検し、主要臓器を病理組織学的に検査した。生存児が 1 歳齢以上に達したところで、指迷路試験により学習、認知機能を検査した。

(倫理面への配慮)

実験動物は愛護的に扱い、また実験者が検体からの悪影響を受けないように配慮した。

C. 研究結果考察

TCDD 投与を受けた母体には、投与部の発赤、痂皮形成以外には変化は認められなかった。妊娠期間、生下時体重には各群間に差は見られなかった。流死産率は対照群 2/20、30 ng/kg 群 4/19、300 ng/kg

群 4/20、生後死亡は対照群 3/18、30 ng/kg 群 1/15、300 ng/kg 群 8/16 と、300 ng/kg 群での死亡が目立った。死産児、生後死亡児には粗大な形態異常は認められなかった。生後死亡児の病理組織学的検査で 300 ng/kg 群の 2 例に腎臓の両側性異形成（糸球体と尿細管の形成不全、間質の増生）が認められ、TCDD が腎臓の発生に悪影響を及ぼしている可能性が示唆された。1 歳齢以上の指迷路試験の予備的な結果では、TCDD300 ng/kg 負荷群児の成績が対照群よりも良いことを示唆する結果が得られた。

D. 考察

指迷路予備試験の結果については、例数を増して検討する必要がある。今後は、親動物を再度妊娠させ、第 2 児 (F1b) を分娩させて、第 1 児 (F1a) での所見の再現性を確認する一方、離乳前の母子行動の解析、離乳後の新規出合わせ実験、2 歳齢での薬物負荷試験による行動解析、神経病理学的検索などを行う予定である。

E. 結論

TCDD の妊娠・哺育母体での体内負荷量 300 ng/kg はアカゲザルの児の発生・発育・行動に影響を及ぼす量であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Sugihara K, Kitamura S, Yamada T, Ohta S, Yamashita K, Yasuda M, Fujii-Kuriyama Y (2001) 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.

2. 学会発表

1) Yasuda M, Yamashita K, Matsui KA, Ihara T, Oneda A, Inouye M, Nagata R, Takasuga T, Kubota S (2001) *Teratology*, 63, 257. (Abst.) (Teratology Society 41st Annual Meeting, June 23-28, 2001, Montreal, Canada)

2) Yasuda M, Yamashita K, Matsui KA, Ihara T, Oneda A, Inouye M, Nagata R, Takasuga T, Kubota S (2001) Effects of in utero exposure of dioxin on the development and growth of young in rhesus monkeys. *Cong. Anom.*, 41, 259. (Abst.) (日本先天異常学会第 41 回学術集会, 2001 年 7 月 3-5 日, 横浜)

3) 安田峯生, 隅田寛, 山下敬介, 松井浩二, 杉原数美, 井上稔, 伊原敏夫, 尾根田暁, 永田良一, 高菅卓三, 久保田俊一郎 (2001) ダイオキシン胎生期暴露のアカゲザル外生殖器発育への影響. 環境ホルモン学会第 4 回研究発表会要旨集, 370. (抄録) (環境ホルモン学会第 4 回研究発表会, 2001 年 12 月 14-15 日, つくば)

G. 知的所有権の取得状況

なし。