

加えてE2を単独群と同様に投与)を設け、最終投与後24時間で解剖して、卵巣、子宮、膣、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。子宮についてはプロット後の重量も測定する。この用量でE2の子宮重量に対する影響についてefficacyが求められれば、このTCDDの子宮重量増加抑制を指標として他のダイオキシンについて同様な実験を繰り返す。TCDDの作用がこの用量では強すぎて反応が飽和することも考えられ、そのようなデータが得られた場合にはTCDDの用量を下げて再実験することになる。1群を最終的には6例で構成する予定であるが、各群3例ずつの実験を2回走らせる予定である。生殖器については、片側を組織学的観察用に固定し、片側をERmRNAの測定のために凍結保存する。

雄の生殖器に対する影響については、成熟雄ラットのアンドロゲン枯渇作用に関する $ED_{50}=15\mu\text{g}/\text{kg}$ との報告があるので、この用量を中心に3~4群の投与群(1群5匹、WI系統、7週齢)を設け、1回経口投与後、1週間で解剖し精巣、精嚢、前立腺、精巣上体に着目し、重量と形態学的変化を分析する。解剖時に採血し、血清を分離してT、FSH、LHの測定に備える。また、視床下部下垂体系に属する他の内分泌器官についても摘出、重量測定を行う。これらの臓器についてはいずれも、組織学的検査のために固定保存する。去勢対照群を設け、副生殖器重量による ED_{50} を求める試みをおこなう。これらの影響が確認できた時点で、雌の場合と同じ他のダイオキシンについて実験し、相対力価を求める。

C. 研究結果

今年度においては、上記計画のための予備的検討を行った。実験に必要な試薬がそろい次第、本実験を実施する予定である。ちなみに、これらの諸実験は、ハザード管理に経験がある(財)動物繁殖研究所に委託して実施する。基本的にSPF動物舎の中にラミナフローラックの気流を逆転させた状態で設置し、環境汚染を最小限にとどめる予定である。また、実験に用いた動物の死体等は、外部での焼却処理を旧金子班の実験と同様に考えているが、それまで凍結して保存する。

次年度以降、ダイベンゾフラン、PCBについても、今年度の指標を用いて、実験し相対力価を求める計画である。

D. 考察

E. 結論

F. 研究発表

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. 実用新案登録
なし

分担研究報告書

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 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

研究要旨

本研究は、ダイオキシン類の生体作用、作用機構、などの研究成果を通じて生体障害性などに関するリスクコミュニケーションを計る際の、必要な要件の整理、情報伝達の方法の検討、などについて、背景データと進行しつつある政策などとの関連を中心に具体的方策を検討し、提言することを目的とし、必要な情報を収集するとともに、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。

ダイオキシン類は、受容体原性の作用機構を持つので、必然的に低用量での影響が観察される。その通常化学物質に見られない低用量作用性は、それ自体重要な意味を持ち解明が急がれる。他方、この低用量レベルでの作用を高用量へ直線外挿することにより、ダイオキシン類の毒性を“猛毒”とする考え方が、社会不安を引き起こしている。実際には、この直線外挿は成立しないようであるが、詳細は明らかでない。すなわちここには、ダイオキシン類の毒性に関して、①低用量影響、②作用の外挿性、③そのメカニズムという、少なくとも3つの異なった次元の未知の課題が基礎となっていることが明らかである。

ダイオキシンの障害性に対する方策は、それらのいずれもが明らかになる中ではじめて展開されていくものであり、現段階における社会不安から、適切なリスクコミュニケーションが行われている状態とは言い難い。金子班の研究の内部にそうした課題を位置付ける意義は、班研究との関係で、これを克服することを意図している。金子班における研究成果が、そのような立場から、有効に情報開示され、適切な行政措

置、社会認識の発展へとつながるような必要な提案を行ってゆく方針である。それら手法の一つとして、本年度は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。

F. 研究発表

Byung-II Yoon, Yoko Hirabayashi, Yasushi Kawasaki, Yukio Kodama, Toyozo Kaneko, Dae-Yong Kim, and Tohru Inoue, Mechanism of action of benzene toxicity: Cell cycle suppression in hemopoietic progenitor cells (CFU-GM), *Experimental Hematology*, 29, 278-285, 2001

Kazuko Yoshida, Tohru Inoue, Yoko Hirabayashi, Kumie Nojima, Toshihiko Sado, Calorie restriction and spontaneous hepatic tumors in C3H/HE mice, *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, 3, 121-126, 1999

Hirokazu Kurata, Chang-Bai Liu, Joulieta Valkova, Alisa E. Koch, Hans Yssel, Yoko Hirabayashi, Tohru Inoue, Takashi Yokota, Ken-ichi Arai Recombinant Adenovirus Vectors for Cytokine Gene Therapy in Mice *J Allergy Clin Immunol* 103 S471-484 1999

分担研究報告書

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 国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室

研究要旨

ダイオキシン類による子宮内膜症等の健康影響のリスク評価を行うためには、国内のみならず国際的な動向の最新情報を収集する必要がある。特に、混合物であるダイオキシン類による健康影響を評価するためには、相対的な毒性指標である TEF (Toxicity equivalent factor) を中心としたリスク評価を行う必要がある。本研究は、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、韓国の慶州で開かれた Dioxin' 2001 で得た最新の知見についてまとめた。

A. 研究目的

未だ評価の確定していない子宮内膜症等の健康影響のリスク評価を確実なものにする為には、国際的な動向の最新情報を収集する必要があり、特に、混合物暴露を受けるダイオキシン類に関しては、その相対的な毒性強度の指標である TEF を中心にリスク評価を行う必要がある。本研究は、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ことを目的とする。特にダイオキシン類による子宮内膜症や胎児期・授乳期暴露による次世代への健康影響に対する研究や、Ah レセプターを介した毒性発現メカニズムに関する情報を収集する。

B. 研究方法

本年度は、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シ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についてまとめた。

C. 研究結果と考察

1. Dioxin' 2001

本シンポジウムのセッションは、“Analysis”, “Bioanalytical Approaches”, “Brominated Flame Retardants”, “Dioxin Reduction Technologies”, “Ecotoxicology”, “Endocrine Disrupter”, “Environmental Levels”, “Epidemiology”, “Formation & Sources”, “Human Experience”, “Human Exposure”, “International Treaty”, “Levels in Aquatic Environment”, “Neurotoxicity”, “Other POPs”, “PCDDF gas monitoring”, “POPs in Food”, “Remediation”, “Risk Assessment”, “Toxicology”, “Transport & Fate”, “Use of Agent Orange in Vietnam”の 22 セッションに分けられ、それぞれにおいて口頭発表とポスター発表が行われた。本シンポジウムでは、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、以下の内容に関する発表が行わ

れた。

“Endocrine Disrupter”セッション

ーヒト卵巣carcinoma由来BG-1細胞におけるTCDDの抗エストロゲン作用の解析ー

TCDDによる抗エストロゲン作用はよく知られているが、そのメカニズムは未だ解明されていない。そこで、ヒト卵巣carcinoma由来BG-1細胞およびそれにルシフェラーゼレポーター遺伝子を導入した系を用いて、TCDDによる抗エストロゲンメカニズムの解明を行った。その結果、この系においては、TCDDレセプター複合体が直接エストロゲンレセプターのDNAへの結合を阻害するものではなく、TCDDにより誘導された遺伝子産物がエストロゲンレセプター依存性遺伝子の翻訳あるいは翻訳以後の作用を阻害している可能性が示唆された(Roger et al., 2001)。

ーHoltzmanラットへのTCDD経胎盤および授乳暴露により雄の児動物に対して肛門生殖器間距離の短縮や免疫毒性を引く起こす際の体内負荷量の測定ー

妊娠15日HoltzmanラットへのTCDD単回投与により50ng/kg以上で児動物の肛門生殖突起間距離の短縮と200 ng/kg以上で前立腺腹葉重量の低下が観察されているが、このときの胎児および1児動物のTCDD体内負荷量を測定した。その結果、母動物への最低影響投与量である50ng/kgのときの妊娠16日の胎児におけるTCDDの体内負荷量は7.9 ng/kgと、親の体内負荷推定量：43 ng/kgの約5分の1となった(Miyabara et al., 2001)。この値は、直接ヒトへの外挿に使用できるわけではないが、TCDD標的器官の体内負荷量が示されたことは、今後のリスクアセスメントに対しては、重要な情報となると考えられる。

ーレチノイドPathwayをノックアウトマウスを用いたTCDDのレチノイドシステムへの影響の解析ー

TCDD暴露によりレチノイン酸代謝が影響を受けることが知られているが、そのメカニズムを探る目的で、各種のレチノイン酸レセプター及びレチノイン酸結合タンパクのノックアウトマウスを用いて、

TCDD投与による影響を検討した。その結果、RAR α total、RAR β 2、RAR γ 2、RXR γ totalのいずれのノックアウトマウスを用いた場合、TCDDによって引き起こされる各種毒性（体重減少、胸腺重量減少、肝臓重量増加、肝臓レチノイン酸エステル含量の減少、肝臓CYP1A1酵素誘導）は、野生型と各ノックアウトマウスにおいて顕著な違いは、見いだされなかった。同様の結果は、CRBAP (cellular retinol binding protein) I 及びIIのダブルノックアウトマウスを用いた場合でも認められたが、CRBAP I / IIに加えCRBP I を欠失させたマウスを使用した場合、TCDDを投与しなくても肝臓レチノイン酸エステル含量を44%も減少させたが、TCDDの投与によりその減少は88%にもなることが判明した。これらの結果からは、CRBP I が通常状態およびTCDD投与によるレチノイン酸代謝異常状態の両方において、生体内のレチノイド貯蔵やその恒常性維持に重要な役割を担っていることが示された(Hoegberg et al., 2001)。

ーMCF-7, RL95-2, LNCaP細胞系を使ったTCDDと各種ステロイドホルモンの拮抗作用ー

ヒトガン細胞由来の3種類の細胞系を用いて、AhRシグナル伝達系とアンドロゲン及びエストロゲンレセプターシグナル伝達系との相互作用について、それぞれのレポーター遺伝子を同時に導入することにより検討した。その結果、すべての細胞系において、TCDD-AhRシグナル伝達系はアンドロゲン及びエストロゲンレセプター依存性の遺伝子発現を抑制し、また、テストステロン-アンドロゲンレセプターおよびエストラジオール-エストロゲンレセプターシグナル伝達系はそれぞれ、TCDDによるAhR依存性の遺伝子発現を抑制した。これらのことは、TCDD-AhRシグナル伝達系は、アンドロゲン及びエストロゲンシグナル伝達系と相互に抑制的制御を行っていることが示唆された(Yonemoto et al., 2001)。

“Risk Assessment”セッション

ーEPAのダイオキシンリアセスマント(2000)に対するEPA-Science Advisory Boardの報告書ー

2000年に発表されたEPAのダイオキシンリアセメントのドラフトに対するScience Advisory Boardの報告書(2001年6月にEPAに提出された)の論点について発表があった。まず、ヒトに対する発がん性の分類に関しても、依然Advisory Boardの約半分のメンバーはTCDDが発がん性物質であることを指示していないという現状のあることが述べられていた。その他には、TCDDの数ある毒性に対して、各エンドポイント毎にNOELや用量反応性(体内負荷量や血中濃度、AUCなど)の評価を(あるいはTEFの算出も)行う必要があることや、リスクアセスメント手法としてMOE(Margin of safety)法が行われているが、バックグラウンド暴露量との比較に対する出発点としてED01(1%発現率)が用いられているが、他の化合物との比較する上に置いてあまり用いられていないので、通常使われているED10やED05を使用する選択肢も必要ではないか等のEPAの評価手法に対してコメントがまとめられていた。また、リスク評価の総合結論として今回の再評価にはRfDは求められていないが、リスクマネージメントの立場からはRfDが算出されるべきではないかという意見もあった。しかし、現実的にはRfDを計算するとバックグラウンドレベル以下になるのでEPAとしては適切ではないと判断したようであった(Paustenbach, 2001)。

—生体内測定値に基づいたTEFの必要性:体内負荷量TEQアセスメント—

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る。

“Toxicology”セッション

—p23-hsp90-XAP2 シャペロン複合体のAhRシグナル伝達に対する役割—

AhRとhsp90複合体がダイオキシン類などのリガンドの存在下で核に移行するメカニズムについてp23やXAP2等のコシャペロンがどのような役割を担っているかについて詳細な検討を行った。その結果、リガンドがない状態では、XAP2はAhR-hsp90複合体を細胞質にとどまらせておくように働き、リガンドがきたときには、p23とhsp90複合体がAhRと核移行受容体であるpendulinとの相互作用を媒介していることが明らかにされた。さらに、AhRの核移行シグナルを含むhsp90と相互作用するbHLHドメインがリガンド依存性の核移行を制御し、p23-hsp90-XAP2複合体との結合ドメインが、AhRを細胞質に留まらせておくのに必須であることも明らかにされた(Poellinger et al., 2001)。

—ヒト尿中のAhR依存活性発現物質(indirubin, indigo)の同定—

レポーター遺伝子を組み込んだYCM3系酵母の発現系を用いて、汚水及びヒトの尿中からAhRのリガンド化合物の探索を行ったところ、トリプトファンの代謝産物であるindirubinとindigoがTCDD以上のAhR依存性の遺伝子発現活性を持つ化合物であると同定された。ヒト尿中のindirubinレベルはAhRを活性化するのに十分な量が存在することから、これらの物質が、AhRの生体内リガンドでもあることを示めすと同時に、indirubinがAhRシグナル伝達系を介して細胞周期を制御している可能性が示唆された(Matsuda et al., 2001)。

—TCDDの経胎盤・授乳暴露による前立腺発生異常を引き起こすメカニズムの解析—

TCDD妊娠13日投与は、胎児の前立腺発生の過程で、泌尿生殖器洞上皮と前立腺発芽生成に障害を与えることが判明し、特に腹側の発芽 (VB) 形成を著しく阻害することが示された。また、クロスフォスタリングの手法を使って、生後35日例の腹側前立腺重量と前立腺特異的なmRNAの発現を指標に、前立腺への影響を検討したところ、授乳暴露よりも経胎盤暴露の方が、さらに、妊娠16日からの投与より妊娠13日からの投与の方がその影響は大きいことが明らかになった。

—TCDDの経胎盤・授乳暴露による前立腺発生異常を引き起こすクリティカルウィンドウの同定—

TCDDの経胎盤・授乳暴露による前立腺発生異常を引き起こすために最も感受性の高い時期を同定するために、妊娠15日、18日及び生後2日目のSDラットにTCDD : 1 µg/kgを皮下投与した結果、妊娠15日投与に場合に著しい70日齢の精巢上体精子数の減少 (53~85%)、泌尿器生殖器官重量 (81%) および腹側前立腺重量の減少 (64%) が観察された。それ以外の投与時期においては、有意な変化は認められず、Linら (2001) らのマウスによる報告と類似した結果を示した。これらのことから、TCDDによる次世代の前立腺発生異常・機能障害にはクリティカルウィンドウが存在することが示唆された。 (Ohsako et al., 2001)

E. 参考文献

Roger, J.M., Denison, M. Analysis of the anti-estrogenic effect of TCDD in human ovarian carcinoma (BG-1) cells. *Organohalogen Compounds* (2001) 53 : 5-13.

Miyabara, Y., Ohsako S., Tohyama, C., Yonemoto J. Fetal and infant body burden of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin causing a short anogenital distance and immunotoxicity in male holtzman rats. *Organohalogen Compounds* (2001) 53 : 54-56

Hoegberg, Pi., Schmidt, C.K., Nilsson, C.B., Trossvik, C., Ghyselinck, N.B., .. Chambon,

P., Cenijn, P.H., Slottje, P., Schuur, G., Brouwer, A., Nau, H., Håkansson, H. Studies of the effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on the retinoid system using retinoid pathway knockout mice. *Organohalogen Compounds* (2001) 53 : 117-120.

Paustenbach, D.J. The united states epa science advisory board report (2001) on the epa dioxin reassessment. *Organohalogen Compounds* (2001) 53 : 241-246.

Poellinger, L., Kazlauskas, A., Andersson, P., Hanberg, A., McGuire, J., Pongratz, I., Köhle, C., and Bock, K-W. Mechanism of signal transduction by the dioxin (AH) receptor. *Organohalogen Compounds* (2001) 53 : 284-285.

Matsuda, T., Adachi, J., Mori, Y., Takigami, H., Miller III, C.A., Kato, T., Saeki, K., Matsui, S. Dioxin-like activity in human urine and municipal sewage. *Organohalogen Compounds* (2001) 53 : 286-290.

Lin, T.M., Simanainen, U., Rasmussen, N.T., Ko, K., Peterson, R.E. *In utero* and lactational TCDD exposure in the mouse: impaired prostate development and function. *Organohalogen Compounds* (2001) 53 : 291-294.

Yonemoto, J., Jana, N.R., Sarkar, S., Ishizuka, M., Tohyama, C., Sone, H. Role of target steroid hormones in cellular responsiveness to cyplal inductoin by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in MCF-7, RL95-2 and LNCAP cells. *Organohalogen Compounds* (2001) 53 : 130-132.

Ohsako, S., Miyabara, Y., Ishimura, R., Sakaue, M., Aoki, Y., Yonemoto, J., Tohyama, C. Impairment of vental prostate by mid-gestational but not by late-gestational or

postnatal exposure to 2,3,7,8-
tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD).
Organohalogen Compounds (2001)
Supplement : 65-68.

F. 研究発表

Sai K, Kang KS, Hirose A, Hasegawa R, Trosko JE,
Inoue T (2001) Inhibition of apoptosis by
pentachlorophenol in v-myc-transfected rat
liver epithelial cells: Relation to
down-regulation of gap junctional
intercellular communication. *Cancer Lett.*,
173: 163-174.

G. 知的所有権の取得状況

なし

別添 6.

Ⅲ 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
菅野 純	子宮肥大試験およびハーシュバーガー試験：原理	井上 達 (監修)	内分泌攪乱化学物質の生物試験研究法	シュプリングァー・フェアラーク東京	日本	2000	49-54
高木篤也	胚幹細胞を用いた検討	井上 達 (監修)	内分泌攪乱化学物質の生物試験研究法	シュプリングァーフェアラーク東京	日本	2000	143-149
金子豊蔵	ハーシュバーガー試験	井上 達 (監修)	内分泌攪乱化学物質の生物試験研究法	シュプリングァーフェアラーク東京	日本	2000	69-75

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Jun Kanno, Lesley Onyon, Joseph Haseman, Penelope Fenner-Crisp, John Ashby, and William Owens	The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for in Vivo Estrogenic Responses: Phase I	Environmental Health Perspectives	109	785-794	2001
B.-I. Yoon, Y. Hirabayashi, T. Kaneko, Y. Kodama, J. Kanno, J. Yodoi, D.Y.Kim, T. Inoue	Transgene Expression of Thioredoxin (TRX/ADF) Protects Against 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin(TCDD)-Induced Hematotoxicity	Arch. Environ. Contam. Toxicol	41	232-236	2001
Byung-Il Yoon, Yoko Hirabayashi, Yukio Ogawa, Jun Kanno, Tohru Inoue	Hemopoietic cell kinetics after intraperitoneal single injection of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD) in mice	Chemosphere	43	819-822	2001
菅野 純	ホルモン様化学物質と内分泌攪乱	治療学	34	468-472	2000
Kimie Sai, Jun Kanno, Ryuichi Hasegawa, James E Trosko and Tohru Inoue	Prevention of the down-regulation of gap junctional intercellular communication by green tea in the liver of mice fed pentachlorophenol	Carcinogenesis	21	1671-1676	2000
菅野 純	内分泌攪乱化学物質の生物影響	ファルマシア (日本薬学会)	35	219-223	1999
Mutsunori Fujiwara, Isao Okayasu, Masae Oritsu, Junko	Significant Increase in prostaglandin E-Main Urinary Metabolite by Laxative Administration: Comparison with	Digestion	61	201-206	2000

Komatsu, Michiyasu Yoshitsugu, Yoshihasa Katoh, Takafumi Bandoh, Hiroshi Toyoshima, Yoshio Kasae, Kunio Sugihara, <u>Jun Kanno</u> , Yuzo Hayashi	Ulcerative Colitis				
Byung-II Yoon, Yoko Hirabayashi, Yasushi Kawasaki, Yukio Kodama, Toyozo Kaneko, Dae-Yong Kim, and <u>Tohru Inoue</u>	Mechanism of action of benzene toxicity: Cell cycle suppression in hemopoietic progenitor cells(CFU- GM)	Experimental Hematology	29	278-285	2001
Kazuko Yoshida, <u>Tohru Inoue</u> , Yoko Hirabayashi, Kumie Nojima, Toshihiko Sado	Calorie restriction and spontaneous hepatic tumors in C3H/HE mice	The Journal of Nutrition, Health & Aging	3	121-126	1999
Hirokazu Kurata, Chang-Bai Liu, Joulieta Valkova, Alisa E. Koch, Hans Yssel, Yoko Hirabayashi, <u>Tohru Inoue</u> , Takashi Yokota, Ken-ichi Arai	Recombinant Adenovirus Vectors for Cytokine Gene Therapy in Mice	J Allergy Clin Immunol	103	S471-484	1999
Haraguchi S., Kitajima S., <u>Takagi A.</u> , Takeda H., Inoue T. and Saga Y	Transcriptional regulation of Mesp1 and Mesp2 genes: Differential usage of enhancers during development.	Mechanisms of Development	108	59-69	2001
Takahashi. Y., Koizumi Ken-ichi, <u>Takagi A.</u> , Kitajima S., Inoue T., Koseki H. and Saga Y	Mesp2 initiates somite segmentation through the Notch signalling pathway	Nature genetics,	25	390-396	2000
Kitajima S., <u>Takagi A.</u> , Inoue T., and Saga Y.,	Mesp1 and Mesp2 are essential for the development of cardiac mesoderm	Development	127	3215- 3226	2000
Saga, Y., Miyagawa- Tomita, S., <u>Takagi, A.</u> , Kitajima, S., Miyasaki, J and Inoue, T.	MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube	Development	126	3437- 3447	1999
Naasani,I., Seimiya H., Yamori T. and Tsuruo t.	FJ5002: A potent telomerase inhibitor identified by exploiting the disease- oriented screening program with COMPARE analysis	Cancer Research	56	4004- 4011	1999

Yamori T., Matsunaga A., Sato S., Yamazaki K., Komi A., Isizu K., Mita I., Edatsugi H., Matsuba Y., Takezawa K., Nakanishi O., Kohno H., Nakajima Y., Komatsu H., Andoh T., and Tsuruo T.	Potent antitumor activity of MS-247, a novel DNA minor groove binder, evaluated by an in vitro and in vivo human cancer cell line panel	Cancer Research	59	4042-4049	1999
Dan S. and Yamori T.	Repression of cyclin B1 expression after treatment with adriamycin, but not cisplatin in human lung cancer A549 cells	Biochemical and Biophysical Research Communications	280	861-867	2001
Ogi t., Mimura J., Hikida M., Fujimoto H., Fujii-Kuriyama Y. and Ohmori H.	Expression of human and mouse genes encoding polk: testis-specific developmental regulation and AhR-dependent inducible transcription	Genes to Cells	6	943-953	2001
Kawane T., Mimura J., Fujii-Kuriyama Y. and Horiuchi N	Parathyroid hormone (PTH) suppresses rat PTH/PTH-related protein receptor gene promoter	Biochemical and Biophysical Research Communications	287	313-322	2001
Oikawa K., Ohbayashi T., Mimura J., Iwata r., Kameta A., Evine K., Iwaya K., Fujii-Kuriyama Y., Kuroda M. and Mukai K.	Dioxin suppressed the checkpoint protein, MAD2 by aryl hydrocarbon receptor-independent pathway	Cancer Research	61	5707-5709	2001
Baba T., Mimura J., Gradin K., Kuroiwa A., Watanabe T., Matsuda Y., Inazawa J., Sogawa K., and Fujii-Kuriyama Y	Structure and expression of the Ah Repressor Gene	J. of Biological Chemistry	276	33101-33110	2001
Sugihara K., Kitamura S., Yamada T., Ohta S., Yamashita K., Yasuda M., and Fujii-Kiryama Y.	Aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated induction of xantine oxidase/xanthine dehydrogenase activity by 2,3,7,9-tetrachlorodibenzo-p-dioxin	Biochemical and Biophysical Research Communications	281	1093-1099	2001
Watanabe T., Imoto I., Kosugi Y., Fukuda Y., Mimura J., Fujii Y., Isaka K., Takayama M., Sato	Human arylhydrocarbon receptor repressor (AHRR) gene: genomic structure and analysis of polymorphisms in endometriosis	J. Hum. Genet.	46	342-346	2001

K., and Inazawa J.					
Hosoya T., Oda Y., Takahashi S., Morita M., Kawauchi S., Ema Masatsugu, Yamamoto M., and Fujii-Kuriyama Y.	Defective development of secretory neurons in the hypothalamus of arnt-2-knockout mice	Genes to Cells	6	361-374	2001
Nukaya M., Takahashi Y., Gonzalez F.J. and Kamataki T.	Aryl hydrocarbon receptor-mediated suppression of expression of the low-molecular-weight prekininogen gene in mice	Biochemical and Biophysical Research Communications	287	301-304	2001
Anjo T., Okuyama M., Sato M., Kambegawa A., and Matsuki Y.	Synthesis of new dioxin haptens and development of enzyme immunoassay for dioxins using polyclonal antibodies	Organohalogen Compounds	45	224-227	2001
Okuyama M., Endo W., Anjo T., Kambegawa A., Kobayashi N., Goto J. and Matsuki Y.	Enzyme-linked immunosorbent assay for dioxins based on monoclonal antibodies	Organohalogen Compounds	54	77-80	2001
Shirota M., Kitazawa I., Inoue K., Doyama A., Mukai M., Haishima A., Yamamoto K., Katoh C., Soda S., Kawabata A., Akahori F., and Shirota K.	Adverse effects of in utero and lactational exposure to 3,3',4,4'-pentachlorobiphenyl (PCB126) on the first ovulation in rats	Organohalogen Compounds	49	356-358	2000

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）
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
のための実験的基礎研究（ダイオキシン類：金子班）

議事録

日 時：2002 年 01 月 30 日（水）12：50～17：00

場 所：国立医薬品食品衛生研究所本館 3F 講堂

出席者

【班員】

井上 達：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

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

菅野 純：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

代田真理子：（財）食品薬品安全センター秦野研究所

鈴木勝士：日本獣医畜産大獣医畜産学部

関沢 純：国立医薬品食品衛生研究所化学物質情報部

高木篤也：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

鎌滝哲也：北海道大大大学院薬学研究

平野英之：厚生労働省生活化学安全対策室

広瀬 明彦：国立医薬品食品衛生研究所化学物質評価室

藤井義明：東北大大大学院理学研究科

藤田：北海道大大大学院薬学研究

松木容彦：（財）食品薬品安全センター秦野研究所

安田峯生：広島国際大

矢守隆夫：（財）癌研究会癌化学療法センター分子薬理部

（五十音順・敬称略）

【公開班会議参加者】44 名

国立医薬品食品衛生研究所所内公開班会議

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）
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（ダイオキシン類：金子班）

所内公開班会議プログラム

日時：2002 年 01 月 30 日（水） 12:50～17:00

場所：国立医薬品食品衛生研究所講堂

【開会】 12:50～

班長 挨拶 金子 豊蔵

厚生労働省 挨拶

【H13 年度研究報告及び H14 年度計画】 13:00～15:20

1. 金子 豊蔵（国立衛研動管室）
奇形発生と TEF
2. 安田 峯生（広島国際大学）
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
3. 菅野 純（国立衛研毒性部）
ダイオキシンの発がん性と TEF
4. 矢守 隆夫（(財) 癌研究会）
細胞アレイを指標とした発がん評価
5. 高木 篤也（国立衛研毒性部）
胚幹細胞（ES 細胞）に対するダイオキシンの影響
6. 藤井 義明（東北大大学院）
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
7. 鎌滝 哲也（北海道大学）
Aryl hydrocarbon receptor (AhR) の機能

【閉会】

班会議

【開会】

金子：予定した時間になりましたので班会議を始めさせていただきます。今回は第2期となりますが、第1期は、奇形、発がん、メカニズムの3つを柱に研究を進めてまいりました。第2期は、この柱については同様であります。TEFを中心としたリスク評価を中心課題として、進めることになりました。併せて、新たに鎌滝先生、松木先生に入っていたいただいたこととお知らせいたします。また、補正予算でダイオキシンの暴露施設も完成いたしました。3月から動物を入れて実験が出来る運びとなりました。動物への暴露が容易に出来るようになることでますます大いに張り切っていこうという所存であります。今日は、お忙しいところ、特に大学の先生におかれましては年度末のお忙しい中と思いましたが、ご出席いただきましてありがとうございます。

本日は、所内公開ということで進めてまいりたいと思います。

まず厚生労働省の方から平野さんにおいでいただいておりますのでご挨拶をいただきたいと思います。

平野：平野と申します。本日は、他で内分泌かく乱化学物質の発表会をやっております。ダイオキシン班の発表会をこちらでということで、基礎的な研究を進めていくのは重要と思います。昨今、大きな話題として取り上げられてまいりましたダイオキシンですが、最近は騒ぎも収まってきているようです。だからといってダイオキシンの危険性の疑義がなくなったわけではないので、基本的にはこの班は重要な役割を呈す班と考えられますので今後ともご協力をよろしくお願い申し上げます。

【H13 年度研究報告および H14 年度計画】

井上：それでは、本日の班会議を始めることと致します。最初のお話は、国立医薬品食品衛生研究所毒性部動物管理室の金子先生です。

今日の公開部分がプログラムの No.7 までありますが、その中の 1、2、3 の部分は奇形に関する項目、4、5 が発がん、6、7 はメカニズムということで 3 グループより構成されています。高木先生の ES 細胞系ではポテンシャルとなっていくよう構成しましたので、奇形は 3 人となりました。では、奇形部門の皮切りを金子先生よろしく願いいたします。

金子および高木：発表、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。

井上：今後は、金子先生も高木先生も一人一人が班員であり、お金（研究費）を貰っているわけですから、ご自分の研究を分けて区切りを付けて発表して下さい。

では、ここまでで ES 細胞（胚幹細胞系）について終了したわけですが、ご討論をお願いいたします。

安田：ダイオキシンが上皮・間充織の相互作用に関与することは有りうと思いますが、その作用は型が限られており、たとえば水腎症や口蓋裂といった問題とどのように結びついていくとお考えでしょうか。レチノイン酸は逆に広範囲な障害を起しますよね。

高木：上皮・間充織の相互作用障害が直接の原因かどうかは今後明らかにしていきたいと思いますが、上皮・間充織の相互作用が障害されることにより、細胞の増殖や分化が阻害されることが知られています。また、障害の差をもたらす要因として受容体発現部位の相違が一つ考えられます。Embryoid body は、上皮・間充織の相互作用を見る系として適していることが分かりましたので、この系を利用して、まずは分子レベルで実験を進めていこうとしています。

井上：現在分かっているストラテジーは？。定量性を定量 PCR で確認を取っておくことでしょうかね。

高木：はい、それに加えて蛋白合成阻害剤のシクロヘキシミドや、タイロシンカイネース阻害剤などの inhibitor を添加することでダイオキシンがどのように上述の遺伝子発現に影響を与えているか見ようとしています。

井上：先の発表では、初期では下がっていなかったということで、もっと時間が経ってから変化が出るのではないかというお話でしたよね。しかし、今は、もう少し早い時期でみようとしているのはどういうことですか。

高木：今回見いだした標的遺伝子の変動には、ある程度の時間が必要であるということで、次のステップとしてはその上流となる遺伝子の変化を見つけるため、より早い時期で検索してみようということです。

鈴木：iv vivo でダイオキシンの奇形を実験していると、その障害があまり早期にみられることはない。奇形は発生するのは胎生 15day の投与では生殖器の奇形が出ます。ここで ES 細胞を使用したことの意味は何ですか？

高木：まず最初に、初期胚への影響をみようという試みで ES 細胞を使用しました。特に遺伝子レベルでみたかったので、これまで、エクトダーム、メソダーム、エンドダームのマーカーに注目してきましたが、どうもそれらへの影響はないらしいという結果が得られています。

井上：どうもありがとうございました。では引き続き高木先生ご自身の発表をお願いいたします。

高木：発表、研究要旨：発生初期の胎児は小さく、かつ、培養も出来ないため、一般に解析が難しい。一方 ES 細胞から形成される胚様体は胎児の卵筒胚に近似している。そこで、この ES 細胞培養系を用いて、TCDD の初期発生過程への影響を検索した。ES 細胞を LIF を除いた ES 培地で浮遊培養し、2,3,7,8-TCDD は 10nM の濃度で添加した。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、マイクロアレイを用いて影響を受ける遺伝子を検索した。この結果、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。

井上：TCDD を投与すると毛嚢での発現を押さえるということに対しのご質問はありませんか？

川西：In vivo で hair follicle が変化するというのは何例中何匹ですか。

高木：2 例です。

西川：20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ というのは高い用量ですね。この用量設定の理由は？。

高木：100%口蓋裂が発生する用量ということで、最初の実験ですから高用量を設定しました。

西川：この変化は、レセプターとは関与しないとお考えですか。

高木：いえ、受容体を介すると思います。

井上：用量の点など安田先生よろしいのでしょうか。PCT については遺伝子発現はみていないのですよね。PCT はみるつもりでしょうか、金子先生。

金子：コルチコステロンも受容体を介して口蓋上皮を抑制するので、最後はダイオキシンと同じだと思います。しかし、動く遺伝子が同じか否かは興味のあるところですので是非みたいです。

井上：AhR KO マウスを用いた実験で口蓋裂がでなかったとのことですが、最初から出来ないのでは PCT は AhR を介さない口蓋裂であると決めつけずに実験をきちんと詰めて仕事をして欲しい。

では、広島国際大学の安田先生、演題は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です。よろしくお願いします。

安田：発表、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 300ng/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。

井上：安田先生はダイオキシンのお仕事を多々進めていらっしゃると思いますが、今回はご無理を申し上げ、この班に入らせていただいたようなわけです。先生のご発表にコメント、ご質問はありますでしょうか。

代田：これから継続して実験をなさる F1b は今回用いたのと同じ母親で妊娠させて、ということでしょうか。

安田：そうです。生後は、90 日まで投与して、その後中止しています。衛研の大野先生ともご相談し、総体で 300ng となるようにしようと思っております。

井上：サル児の腎臓におけるダイオキシンの影響ですが、ハイドロネフローシ

スはその通りだと思いますが、その前に displasia が先行するのでしょうか。

安田：そのようなことはありません。胎生児には有ると思いますが。社会的に問題となるのは生後ではないかと思う。

西川：腎臓の所見は、糸球体が広範囲やられている様ですが、そうするとこの腎臓障害が他の臓器への障害と結びつくような所見は何か有りますか。

安田：肝臓にも障害がみられます。一応、臓器は一通りみています。

井上：鈴木先生いかがですか。

鈴木：私は、齧歯類を用いてダイオキシンの発生初期に対する影響をみておりますが、発生初期はマウスとサルではかなり違いますよね。腎機能は複雑なのでそこに障害がおきると血中の Ca 代謝などいろいろな影響が出てくるのではないかと思います。

井上：次は、発がん関係のグループにお願いいたします。最初は、菅野先生で演題はダイオキシンの発がん性と TEF です。よろしくお願いいたします。

菅野：発表、研究要旨：ダイオキシソ類を WHO-TEF を基準に（矢守班員選択リストを利用）少数、代表化学物質として選択し、後述の各種遺伝子改変モデル実験に遺伝子発現プロファイリング手法を新たに取り入れて、AhR 依存性・非依存性影響を含むリガソド依存性生体影響メカニズソ解析に基づいた TEF 評価を目指す。

井上：ありがとうございました。ご質問、サジェスチソソ、コメントはありますか。

西川：p53KO mice を使用されておられるようですが、最近の知見では、nongenotoxic な chemical は p53KO に投与しても発がん性の亢進はみられないと報告されていますが。

菅野：米国の NTP の長期癌原性試験の報告では wild mice に高濃度のダイオキシソを暴露すると肝臓、甲状腺に腫瘍が発生するとの報告があります。今回は、肝臓などに腫瘍がみられないことより、その様なダイオキシソの標的遺伝子は動いていないと思われます。むしろ、p53KO マウスで発生する自然発生腫瘍がみられることから、今回の実験は、p53KO マウスの自然発生腫瘍の acceleration かもしれません。

西川：私の質問は、ダイオキシソは、遺伝子障害性であるか否かです。どちら

であると認識されているのでしょうか。

菅野：ダイオキシンは、DNA adduct を形成しなくても暴露により、例えば肝臓で CYP1A1 が誘導され、長期間の暴露により肝臓で CYP1A1 の発現が継続すれば肝臓に障害が出てくるわけですから、最終的には gene 障害性というものがあると言って良いのかもしれませんが。更に、腫瘍発生には閾値があるのか否かという問題では、シグナルが入れば必ずイベントが起こるとすると、閾値無しでもっていくべきで、シグナルの入り口で議論しなくてはならなくなる。しかし、そのところは明らかになっていないと思います。

西川：閾値の問題に関しては、TEF はこの班の主旨でもあり、そこへの関わりが強いが、その辺をどのようにお考えですか。

菅野：今は、TEF を見直そうとしているので、TEF を修正しようとしているわけではありません。すなわち、閾値の有無と TEF の根本問題とは別個に考えられると思います。

本間：一般の人は、エームス試験でネガティブとなったものを変異原性陰性であると言っておりますが、それだけでは短絡過ぎるので、non-genotoxic であるなどあまり簡単に言わない方が良いでしょう。

井上：今回の菅野先生の実験は、carcinogen である DEN が全ての動物に投与してあるのですが、これが肝以外にも作用したと考えられませんか。

菅野：ダイオキシンは rat では肝臓が標的であるので、C3H との F1 というのももあり DEN 10mg/kg を 1 回投与しました。しかし、腫瘍の発生をみると p53heteroKO と同様の腫瘍スペクトラムが見られました。

鈴木：DEN100-150mg/kg 投与では、肺と肝臓に adduct 形成が positive で、骨髄は negative です。今回の菅野先生の実験は、DEN 10mg/kg 1 回投与であり、dose が低かったため腫瘍発生がみられなかったのではないのでしょうか。ですから、この実験では DEN の効果はみられていないようです。P53 関連の遺伝子は動いていないのでしょうか。

菅野：まだそこまで詳しくはみておりません。詳しく解析をかけ直してみますが、動いていないと思います。

本間：ダイオキシンはリコンビノジェニックに働くこともあるので genotoxic と言えるかもしれませんが、それが発がんに関連するかは不明です。

井上：では、矢守先生。演題は細胞アレイを指標とした発がん評価です。お願いいたします。

矢守：発表、研究要旨：抗ガン剤スクリーニングのためのガン細胞パネルは、そのインフォマティクスが毒性影響に対しても十分対応可能である可能性がすでに示されている。本研究のねらいは、そのインフォマティクスをダイオキシン毒性、特にその細胞増殖に関連する影響を切り口として活用し、もって毒性分子機構の解析に当てることにある。今年度は、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、これらはおしなべて増殖阻害効果が弱いかあるいはほとんどなかったが、唯一 TCDF のみが有意な細胞増殖阻害を示し、その阻害パターンは種々の抗がん剤、阻害剤とは異なる特有の様相を呈した。わずかな構造上の違いが大きな増殖阻害能の違いを生じること、ならびに TCDF に対し高感受性と抵抗性のがん細胞のあることが明らかとなった。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。

井上：面白い結果をお出しいただきました。ありがとうございました。質問、コメントはありますか。

本間：39 系統のヒトがん細胞を選ばれた根拠は？

矢守：このご質問は、初めて講演するところでは必ず聞かれるのですが、実は、そこにあって、使いやすいものであったというだけで根拠はありません。プラクティカルには、どの細胞も 48 時間同じに培養しなければならないという現実がありますので、取り扱いやすいものを選びました。

井上：一貫性がなく、ランダムだからパネルとしての意味があるのですよね。インフォマティクスを独立させてやっておられるので、もう一度戻って cell line を減らしてみた時、どれがどのような役目をしているとか、あるいはもう少し cell line を増やすと情報がもっと得られるとか、この 39 種の細胞というのは適切なのか、という点についてはどうでしょうか。

矢守：おっしゃられるように、米国 NCI では 60 cell line パネルを流しており、39 種は「がん研バージョン」であります。NCI に比し cell line が少ないので具合が悪くなるかなと思ったのですが、実際そのようなことはありませんでした。Cell line を減らすことは可能で、減らすと情報量も減るのは確かです。パネル中のメンバーを替えることで、得られる情報も異なってきますし、ダイオキシンの評価がこの 39 種で十分であるかどうかも分かりません。