

厚生労働科学研究費補助金  
食品・化学物質安全総合研究事業

ダイオキシン胎生期暴露のアカゲザルの発育、  
生殖への影響に関する研究

平成 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 安田 峯生

平成 15 (2003) 年 3 月

## 目 次

I. 総括研究報告書	
ダイオキシン胎生期暴露のアカゲザルの発育、生殖への影響に関する研究	----- 1
安田 峯生	
II. 分担研究報告	
1. 2,3,7,8-四塩化ジベンゾパラジオキシン(TCDD)胎生期・授乳期 暴露のアカゲザル外生殖器への影響に関する研究	----- 7
安田 峯生、杉原 数美	
2. 2,3,7,8-四塩化ジベンゾパラジオキシン(TCDD)胎生期・授乳期 暴露のアカゲザル児の行動発育への影響に関する研究	----- 11
安田 峯生、浅岡 一雄	
3. 2,3,7,8-四塩化ジベンゾパラジオキシン(TCDD)の胎生・授乳期 暴露による腎病変に関する研究	----- 17
隅田 寛、山下 敬介	
4. 2,3,7,8-四塩化ジベンゾパラジオキシン(TCDD)の胎児・授乳期 暴露によるアカゲザル肝細胞の形態解析	----- 23
隅田 寛、山下 敬介	
5. 2,3,7,8-四塩化ジベンゾパラジオキシン(TCDD)胎生期・授乳期 暴露のアカゲザル歯及び口蓋ヒダ発生への影響に関する研究	--- 31
安田 峯生、浅岡 一雄	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 37
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 39

ダイオキシン胎生期暴露のアカゲザルの発育、生殖への影響に関する研究

主任研究者 安田 峯生

広島国際大学保健医療学部教授

**研究要旨** 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目的で、妊娠 20 日から生後 90 日まで、母体に 2, 3, 7, 8-四塩化ジベンゾパラジオキシン（TCDD）30 ng/kg または 300 ng/kg の体内負荷をかけたアカゲザル母体の児について、外生殖器の発生・成長、神経行動学的発達、死亡児臓器の病理組織学的変化、死亡児の歯及び口蓋ヒダなどを観察した。300 ng/kg 群では流死産、生後死亡の頻度が高かった。外生殖器の発達、知能の発達には各群間に顕著な差は見られなかった。300 ng/kg 群死亡児の一部で腎臓及び肝臓に病理組織学的変化が認められ、また歯や口蓋ヒダの異常が観察された。これらの結果から、胎生期、授乳期を通じての TCDD の暴露は、30 ng/kg の体内負荷量では次世代に明らかな障害を起こさないが、300 ng/kg の負荷では児の発生、発達に有害な作用を及ぼすものと判断される。現時点で得られている本研究の成果からは、現在の 4 pg/kg/日の TDI は妥当なものといえる。

分担研究者

隅田 寛 広島国際大学保健医療学部教授  
山下 敬介 広島大学大学院医歯薬学総合研究科助教授

浅岡 一雄 京都大学霊長類研究所助手  
杉原 数美 広島大学医学部総合薬学科教務員

と生殖への影響を調べることにより、妥当な TDI 決定のための基礎的なデータを得ることである。

A. 研究目的

ダイオキシン類の環境ホルモン様作用が疑われ、精子数の減少や子宮内膜症との関連が懸念されている。平成 11 年にわが国でダイオキシン類の耐容一日摂取量（TDI）を定めた際には、胎生期に 2, 3, 7, 8-四塩化ジベンゾパラジオキシン（TCDD）暴露を受けたラットの生殖器系の異常を述べたデータがよりどころとなった。現在の 4 pg/kg の TDI は再検討中であるが、ラットなど小動物のデータをヒトに外挿することには疑問がある。本研究の目的は、よりヒトに近いと考えられるアカゲザルを用い、妊娠サルに 30 または 300 ng/kg という微量の TCDD を投与し、その後も胎生期・授乳期を通じて体内負荷量を一定に保つように維持量の投与を続け、児の胎生期・生後発育

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 2, 3, 7, 8-四塩化ジベンゾパラジオキシン（以下 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。初産児（F1a）の離乳後、期間において母体を再度交配、妊娠させ、同様に TCDD を投与して第二産児（F1b）を得た。これらの児について以下の観察を行った。なお、これらの全てを平成 14 年度に行ったわけではないが、研究の全貌を理解しやすいように、前年度から継続している観察についても記載した。

- (1) 外生殖器の発達：生後 1 日、90 日、270 日に肛門－生殖器間距離を測定した。
- (2) 神経行動学的発達：生後 12～15 ヶ月齢で 4 段指迷路試験、13～15 ヶ月齢で新奇出合わせ試験、23～26 ヶ月齢でアイコンタクト試験を行った。

- (3) 死亡児臓器の病理組織学的変化: 生後死亡児について、主要臓器のパラフィン包埋ヘマトキシリン・エオシン染色標本を作製し、光学顕微鏡で観察した。
- (4) 死亡児歯及び口蓋ヒダの変化: 死産児及び生後死亡児の上下顎を切り出し、歯を実体顕微鏡及びX線で観察した。口蓋の口腔面にあるヒダの形態を実体顕微鏡で観察した。

#### 倫理面への配慮

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

#### C. 研究結果

平成14年度末におけるアカゲザルの交配、分娩、生存状況を表1に示す。F1a児の多くは生後100日に達している。F1b児は生後およそ200~300日である。各群の流死産、生後死亡を表2にまとめた。300 ng/kg群ではF1a児の生後死亡が多く、本研究の最終目的である児の生殖能力の検定を行うには例数が少な過ぎると考えられたので、9妊娠母体をこの群に追加したが、この追加群では流死産が多発した。年度末に生存している児はF1aとF1bを合わせて対照群24匹、30 ng/kg群22匹、300 ng/kg群19匹である。

観察結果の概要を以下にまとめた。詳細については分担研究報告書に記述する。

##### 1) 肛門—生殖器間距離の測定

F1aオスの生後1日の肛門—陰茎基部間距離(mm)平均値が対照群で $37.6 \pm 1.8$ 、30 ng/kg群で $37.3 \pm 8.1$ 、300 ng/kg群で $31.3 \pm 8.4$ と、300 ng/kg群で短縮の傾向を示した。しかし、生後90日、生後270日と成長につれて対照群の値に近づいた。F1bでは生後1日の平均値が対照群で $56.6 \pm 5.2$ 、30 ng/kg群で $54.2 \pm 4.8$ 、300 ng/kg群で $56.9 \pm 7.2$ とF1aのような差は認められなかった。メス児の肛門—膣口間距離については、各群間に差は認められなかった。

##### 2) 神経行動学的発達評価

各群4匹をランダムに抽出して行った4段式指迷路試験では、馴化と練習課題を経た後には、いずれの群も90%以上の正反応率を示し、群間には有意差は認められなかった。各群オス・メス2匹ずつ選んだ児での出会わせ

15分間の行動を解析したところ、対照群では、ステレオ環境探索行動が、低用量群では他個体に接近・接触する友好的行動が、高用量群では移動する環境探索行動が、比較的多く観察された。各群オス・メス5匹(高用量群のみオス3匹)について行ったアイコンタクト試験では、いずれの群でもメスのアイコンタクト数が多い傾向が見られたが、TCDD投与の影響は認められなかった。

##### 3) 死亡児腎臓及び肝臓の病理組織学的変化

300 ng/kg群の2例(死亡時日齢406日、422日)で、両側性の腎臓形成異常が認められた。多くの腎小体が対照に比べて小さく、一部の腎小体が代償的に肥大していた。尿細管上皮には空胞化が認められ、間質が增生していた。コンピュータを用いた形態計測でも、300 ng/kg群では腎小体面積の平均値は対照群に比べて有意に小さく、分布にばらつきが大きいたことが確認された。また、300 ng/kg群の1例(死亡時日齢425日)で肝臓の好酸性変異病巣が認められた。また、3例の対照群児(死亡時日齢465日、435日、395日)と5例の300 ng/kg群児(死亡時日齢468日、425日、422日、406日、301日)肝臓の病理組織学的検査とコンピュータ解析で、300 ng/kgで肝細胞の肥大と脂肪蓄積を示唆する所見が得られた。

##### 4) 死亡児歯及び口蓋ヒダの変化

対照群4例、30 ng/kg群8例、300 ng/kg群8例の死産児と生後100日以内に死亡した乳児について、口腔内を観察したところ、対照群及び300 ng/kg群では特に異常は認められなかったが、300 ng/kgで3例に上顎切歯の早期萌出、動揺、歯根形成不全、欠如などの異常が認められた。これらの個体では口蓋ヒダの肥厚、分断、走行の乱れなどの異常も見られた。

#### D. 考察

肛門—生殖器間距離は多くのほ乳動物でオスでは長く、メスでは短い。オスでこれが短縮することはメス化を示すとされる。F1aオスの生後1日の肛門—生殖器間距離が300 ng/kg群で短縮の傾向を示したことから、TCDDの内分泌かく乱作用の影響が疑われた。しかし、成長とともにこの差は消失し、また、F1bでは各群間に差がみとめられなかったことから、300 ng/kgの母体負荷は児の外生殖器発育には顕著な影響は及ぼさないものと考

えられる。

児の神経行動学的発達の観察により、アカゲザルでは生後1年で既に指迷路試験での知能評価が可能であること、300 ng/kg の母体体内負荷量でも、児の知能発達に悪影響を及ぼさないことが明らかになった。出合わせ試験では、群間の行動パターンに若干の差が認められ、対照群に比べてダイオキシン暴露群では環境への興味を示している傾向が見られたが、これは暴露群でむしろ行動の成熟が進んだのではないかと考えられる。アイコンタクト試験では、明らかな性差が認められたが、TCDD 投与による差は見られず、この指標で評価する限り、オス個体のメス化が起こっているとは考えられない。

生後1年以上経って死亡した300 ng/kg 群Fla に2例の腎臓形成異常が認められたが、生後1年での血液生化学検査で、これらの個体の血液尿素窒素 (BUN) 値 (mg/dl) は45.3 及び98.2 と対照群の平均値  $26.9 \pm 6.5$  よりはるかに高く、生前から腎機能が低下していたことが分かった。2例で両側性の変化が見られたことは、この変化がTCDDの影響によるものである可能性を示唆しており、今後、他の個体についても精査する必要がある。肝臓もダイオキシンの毒性に鋭敏に反応する器官であり、300 ng/kg 死亡児に見られた組織変化はTCDDの影響によるものである可能性が高い。

歯はダイオキシンの発生毒性に感受性の高い組織であることがげっ歯類の実験で明らかにされている。ヒトの疫学調査でダイオキシン類に暴露された集団で歯の異常の頻度が高まるとの報告があり、300 ng/kg 群死亡児の3例で歯の異常が見られたことは、注目に値する。今後、生存児での観察を進める予定である。また口蓋ヒダの形態変異はげっ歯類で発生毒性検出指標として有用であることが知られており、生存児での観察を合わせて評価する必要がある。

## E. 結論

現在のわが国でのTDIの設定根拠となったラットでの最小毒性体内負荷量86 ng/kg は、対数目盛で30 ng/kg と300 ng/kg のほぼ中間に相当する。TCDD30 または300 ng/kg の母体体内負荷に妊娠20日から生後90日まで暴露されたアカゲザル児を生後およそ1000日

で観察した結果、胎生期、授乳期を通じてのTCDDの暴露は、30 ng/kg の体内負荷量では次世代に明らかな障害を起こさないが、300 ng/kg の負荷では児の発生、発達に有害な作用を及ぼすものと判断される。今後の児の成長を待つて精査すべき評価項目も多いが、現時点で得られている本研究の成果からは、現在の4 pg/kg/日のTDIは妥当なものといえる。

## F. 健康危惧情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Sugihara K, Yamada T, Kitamura S, Ohta S, Yamashita K, Okamura S, Yasuda M, Fujii-Kuriyama Y, Saeki K, Matsui S, Matsuda T: Ah-receptor-mediated induction of drug-metabolizing enzymes by indirubin and indigo. *Organohalogen Compounds*, 59, 453-456, 2002.

### 2. 学会発表

- 1) 安田峯生, 隅田寛, 浅岡一雄, 山下敬介, 角崎英志, 井上稔: ダイオキシン胎生期・授乳期暴露のアカゲザル生殖器発育への影響. 環境ホルモン学会第5回研究発表会要旨集, 355 (抄録), 2002. (環境ホルモン学会第5回研究発表会, 2002年11月25-26日, 広島)
- 2) 飯田景子, 釜中慶朗, 鈴木樹理, 渡辺邦夫, 安田峯生, 久保田俊一郎, 浅岡一雄: ダイオキシン類のサル子宮内膜におよぼす影響のDNAチップによる解析. 環境ホルモン学会第5回研究発表会要旨集, 109 (抄録), 2002. (環境ホルモン学会第5回研究発表会, 2002年11月25-26日, 広島)
- 3) 安田峯生, 隅田寛, 角崎英志, 井上稔, 山下敬介: ダイオキシン胎生期・授乳期暴露を受けたアカゲザル児の腎臓異常. 第42回日本先天異常学会学術集会抄録集, 107, 2002. (第42回日本先天異常学会学術集会, 2002年7月10-12日, 浜松)
- 4) Yasuda M, Koito A, Sumida H, Tsusaki H, Inouye M, Yamashita K: Renal

dysgenesis in rhesus monkeys exposed to dioxin during gestation and lactation.  
(22<sup>nd</sup> International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, August 11-16, Barcelona, Spain)

H. 知的財産所有権の出願、登録状況  
なし。

表 1-1 アカゲザルの交配、分娩、生存状況 (F1a)

群	動物	交配日 (GD0)	分娩 (流産) 日	GD	性別	備考	F1 死亡日	LD	2003/3/31 日齢	備考
対照	1	1999/11/30	2000/5/9	161	♀				1056	
	2	1999/12/3	2000/5/18	167	♀				1047	
	3	1999/12/11	2000/5/30	171	♀		2001/8/29	456		F1 死亡
	4	1999/12/11	2000/5/23	164	♂				1042	
	5	1999/12/14	2000/2/12	60		胎児死亡				
	6	1999/12/15	2000/6/3	171	♀				1031	
	7	1999/12/15	2000/5/7	144	♀				1058	
	8	1999/12/16	2000/1/25	40		胎児死亡				
	9	1999/12/17	2000/6/3	169	♀		2001/8/12	435		F1 死亡
	10	1999/12/18	2000/5/12	146	♂	死産				
	11	1999/12/19	2000/5/21	154	♀				1044	
	12	1999/12/19	2000/5/31	164	♀				1034	
	13	1999/12/23	2000/5/21	150	♂				1044	
	15	1999/12/28	2000/6/10	165	♀		2002/6/3	723		F1 死亡
	46	1999/12/31	2000/6/10	162	♀				1024	
49	2000/1/28	2000/7/7	161	♀		2001/8/6	395		F1 死亡	
58	2000/1/10	2000/6/25	167	♀		2000/10/1	98		F1 死亡	
61	2000/1/16	2000/6/17	153	♂				1017		
62	2000/1/17	2000/7/6	171	♂				998		
63	2000/1/24	2000/7/6	164	♀				998		
64	2000/1/29	2000/7/2	155	♂				1002		
30ng/kg	16	1999/11/28	2000/5/15	169	♂		2003/3/25	1044		F1 死亡
	17	1999/12/6	2000/5/4	150	♂	死産				
	18	1999/12/8	2000/5/26	170	♀				1038	
	19	1999/12/9	2000/5/13	156	♂				1052	
	20	1999/12/11	2000/5/22	163	♀	死産				
	21	1999/12/15	2000/5/22	159	♀				1043	
	22	1999/12/18	2000/5/30	164	♂				1035	
	23	1999/12/19	2000/6/3	167	♀				1031	
	24	1999/12/28	2000/6/3	158	♂		2000/11/10	160		F1 死亡
	25	1999/12/22	2000/5/25	155	♂				1040	
	26	1999/12/22	2000/6/10	171	♀		2002/8/25	806		F1 死亡
	27	1999/12/25	2000/6/17	175	♂				1017	
	28	1999/12/26	2000/6/1	158	♀	死産				
	29	1999/12/26	2000/5/31	157	♀	脱臍/死産				
	30	1999/12/28	2000/6/7	162	♀				1027	
47	1999/12/31	2000/6/10	162	♂				1024		
50	2000/1/2	2000/6/22	172	♀	死産					
53	2000/1/4	2000/6/18	166	♂				1016		
59	2000/1/11	2000/6/18	159	♀				1016		
65	2000/3/3	2000/8/14	164	♀				959		
300ng/kg	31	1999/11/28	2000/5/17	171	♂				1048	
	32	1999/11/30	2000/5/16	168	♂		2001/8/27	468		F1 死亡
	33	1999/12/1	2000/4/29	150	♀				1066	
	34	1999/12/6	2000/4/12	128		流産				
	35	1999/12/12	2000/5/22	162	♀				1043	
	37	1999/12/14	2000/5/26	164		死産				
	38	1999/12/15	2000/5/27	164	♂		2001/7/26	425		F1 死亡
	39	1999/12/18	2000/6/6	171	♀				1028	
	40	1999/12/19	2000/5/24	157	♀		2000/6/19	26		F1 死亡
	41	1999/12/19	2000/5/10	143	♀		2001/7/6	422		F1 死亡
	42	1999/12/20	2000/6/1	164	♂				1033	
	43	1999/12/23	2000/6/16	176		死産				
	44	1999/12/25	2000/6/1	159	♂				1033	
	45	1999/12/27	2000/6/11	167	♂		2001/8/6	421		F1 死亡
	51	2000/1/2	2000/6/22	172	♂		2001/8/2	406		F1 死亡
57	2000/1/9	2000/7/12	185	♂		2000/7/13	1		F1 死亡	
60	2000/1/14	2000/6/26	164	♂				1008		
66	2000/2/25	2000/8/15	172	♂				958		
67	2000/2/28	2000/4/8	40		流産					
68	2000/3/1	2000/8/17	169	♂		2001/8/13	361		F1 死亡	
101	2001/11/21	2001/12/18	27		流産					
102	2001/11/27	2002/5/8	162	♂		2003/5/5	362		F1 死亡	
103	2001/12/9	2002/5/31	173		死産					
104	2001/12/11	2002/1/18	38		流産					
105	2001/12/13	2002/1/12	30		流産					
106	2001/12/15	2002/5/29	165	♀				306		
107	2001/12/18	2002/1/14	27		流産					
108	2001/12/20	2002/1/29	40		胎児死亡					
109	2001/12/21	2002/6/7	168	♂				297		

表 1-2 アカゲザルの交配、分娩、生存状況 (F1b)

群	動物	交配日 (GD0)	分娩 (流産) 日	GD	性別	備考	F1 死亡日	LD	2003/3/31 日齢	備考
対照	1b	2002/3/4	2002/8/17	166	♂				226	
	2b	2002/2/5	2002/7/22	167	♀				252	
	3b	2001/11/29	2002/5/10	162	♀				325	
	4b	2002/3/3	2002/8/18	168	♂				225	
	5b	2002/1/13	2002/2/13	31		流産				
	7b	2001/12/8	2002/5/6	149		死産				
	9b	2002/1/31	2002/7/17	167	♀				257	
	11b	2001/12/27	2002/6/13	168	♂				291	
	13b	2001/12/5	2002/1/1	27		流産				
	46b	2001/12/11	2002/5/24	164	♀				311	
	49b	2001/12/14	2002/6/2	170	♀				302	
	61b	2002/1/25	2002/7/5	161	♀				269	
	63b	2002/2/2	2002/7/16	164	♀				258	
	64b	2002/2/4	2002/7/15	161	♀				259	
30ng/kg	16b	2001/12/23	2002/5/20	148		死産				
	18b	2001/12/11	2002/1/5	25		母体死亡				
	20b	2001/12/12	2002/5/29	168	♀				306	
	21b	2002/1/21	2002/7/7	167	♂				267	
	22b	2001/12/10	2002/1/4	25		流産				
	23b	2001/12/7	2002/5/18	162	♀				317	
	24b	2001/12/31	2002/6/3	154	♂				301	
	25b	2002/1/23	2002/7/7	165	♂				267	
	26b	2001/12/6	2002/5/23	168	♀				312	
	27b	2002/1/22	2002/7/12	171	♂				262	
	47b	2002/2/9	2002/7/13	154	♂				261	
	50b	2002/1/6	2002/6/23	168	♀				281	
	53b	2001/12/19	2002/5/27	159		死産				
	59b	2002/1/4	2002/6/12	159		死産				
	65b	2001/12/17	2002/6/3	168	♂				301	
300ng/kg	31b	2002/2/4	2002/7/15	161	♂				259	
	32b	2001/12/13	2002/5/24	162		死産				
	33b	2002/1/3	2002/6/6	154	♀				298	
	35b	2002/1/25	2002/6/21	147	♀				283	
	37b	2001/12/3	2002/1/18	46		流産				
	38b	2002/1/19	2002/6/11	143	♂				293	
	39b	2001/12/22	2002/6/9	169	♀				296	
	41b	2002/2/21	2002/4/22	60		胎児死亡				
	42b	2001/12/10	2002/5/22	163	♂				313	
	44b	2002/1/11	2002/6/24	164	♂				280	
	45b	2001/12/15	2002/6/2	169	♂				302	
	51b	2001/12/25	2002/6/16	173	♂				288	
	60b	2002/1/16	2002/7/4	169	♂		2002/7/29	25		F1 死亡
	66b	2002/1/22	2002/6/14	143		死産				
	68b	2002/1/27	2002/7/15	169	♂				259	



厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）  
分担研究報告書

2, 3, 7, 8-四塩化ジベンゾパラジオキシン (TCDD) 胎生期・授乳期暴露の  
アカゲザル外生殖器への影響に関する研究

分担研究者 安田 峯生  
杉原 数美

広島国際大学保健医療学部教授  
広島大学医学部総合薬学科教務員

**研究要旨** 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目的で、妊娠 20 日から生後 90 日まで、母体に 2, 3, 7, 8-四塩化ジベンゾパラジオキシン (TCDD) 30 ng/kg または 300 ng/kg の体内負荷をかけたアカゲザル母体の児について、生後 1 日、90 日、270 日に肛門-生殖器間距離を測定した。F1a オスの生後 1 日の肛門-陰茎基部間距離 (mm) 平均値が対照群で  $37.6 \pm 1.8$ 、30 ng/kg 群で  $37.3 \pm 8.1$ 、300 ng/kg 群で  $31.3 \pm 8.4$  と、300 ng/kg 群で短縮の傾向を示した。しかし、生後 90 日、生後 270 日と成長につれて対照群の値に近づいた。F1b では生後 1 日の平均値が対照群で  $56.6 \pm 5.2$ 、30 ng/kg 群で  $54.2 \pm 4.8$ 、300 ng/kg 群で  $56.9 \pm 7.2$  と F1a のような差は認められなかった。メス児の肛門-膣口間距離または膣口については、各群間に差は認められなかった。この結果から、TCDD 30 ng/kg または 300 ng/kg の母体負荷は児の外生殖器発達には影響しないものと考えられる。

#### A. 研究目的

ダイオキシン類には内分泌かく乱作用があるとされ、状況によってはエストロゲン様作用を示す。本研究の目的は、妥当なダイオキシン類の耐容一日摂取量 (TDI) TDI 決定のための基礎的なデータを得ることである。妊娠アカゲザルに 30 または 300 ng/kg という微量の TCDD を投与し、その後も胎生期・授乳期を通じて体内負荷量を一定に保つように維持量の投与を続け、児の胎生期・生後発育と生殖への影響を調べているが、その一環として、オスのメス化の指標となる肛門-生殖器間距離や陰茎長など、外生殖器の発達を観察した。

#### 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 2, 3, 7, 8-四塩化ジベンゾパラジオキシン (以下 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。初産児 (F1a) の離乳後、期間において母体を

再度交配、妊娠させ、同様に TCDD を投与して第二産児 (F1b) を得た。これらの児について生後 1 日、90 日、270 日に肛門-生殖器間距離、陰茎長をノギスで測定した。オスの肛門-生殖器間距離は肛門から陰茎基部までを測定した。メスの肛門-生殖器間距離は肛門から膣口までと肛門から陰核までの 2 種類測定した。

#### 倫理面への配慮

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

#### C. 研究結果

各群の計測結果を表 1 に示す。

F1a オスの生後 1 日の肛門-陰茎基部間距離 (mm) 平均値が対照群で  $37.6 \pm 1.8$ 、30 ng/kg 群で  $37.3 \pm 8.1$ 、300 ng/kg 群で  $31.3 \pm 8.4$  と、300 ng/kg 群で短縮の傾向を示した。しかし、生後 90 日、生後 270 日と成長につれて対照群の値に近づいた。F1b では生後 1 日の平均値が対照群で  $56.6 \pm 5.2$ 、30 ng/kg 群で  $54.2 \pm 4.8$ 、300 ng/kg 群で  $56.9 \pm 7.2$  と F1a

のような差は認められなかった。F1a オスの生後1日の陰莖長(mm)平均値が対照群で20.6 ± 2.9、30 ng/kg 群で21.5 ± 4.5、300 ng/kg 群で19.4 ± 3.0 と、300 ng/kg 群で僅かに短く、この傾向は生後270日でも認められた。メス児の肛門-膣口間距離については、各群間に差は認められなかった。生後1日F1b オスの肛門-陰莖基部間距離はF1aのそれに比べて長く、陰莖長は逆にF1aよりも短かった。メスでの計測値には、F1a と F1b 間に著差はなかった。

#### D. 考察

肛門-生殖器間距離は多くのほ乳動物でオスでは長く、メスでは短い。オスでこれが短縮することはメス化を示すとされる。F1a オスの生後1日の肛門-生殖器間距離が300 ng/kg 群で短縮の傾向を示したことから、TCDDの内分泌かく乱作用の影響が疑われた。しかし、成長とともにこの差は消失し、また、F1b では各群間に差がみとめられなかった。陰莖長についても300 ng/kg 群で短縮の傾向が認められたが、有意な差ではなかった。測定値にはかなりのばらつきがあり、とくにF1a と F1b の測定値にかなりの差が認められることから、測定者による差がある可能性が考えられる。アカゲザルでの肛門-生殖器間距離はげっ歯類のように信頼性の高い指標とはいえないようである。これらの所見を総合的に評価すると、300 ng/kg の母体負荷は児

の外生殖器発育には顕著な影響は及ぼさないものと考えられる。

#### E. 結論

現在のわが国でのTDIの設定根拠となったラットでの最小毒性体内負荷量86 ng/kgは、対数日盛で30 ng/kg と 300 ng/kg のほぼ中間に相当する。TCDD30 または300 ng/kg の母体体内負荷に妊娠20日から生後90日まで暴露されたアカゲザル児の外生殖器の発達には現時点で明確な影響は認められず、現在の4 pg/kg/日のTDIは妥当なものといえる。

#### F. 健康危機情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし。

##### 2. 学会発表

- 1) 安田峯生, 隅田寛, 浅岡一雄, 山下敬介, 角崎英志, 井上稔: ダイオキシン胎生期・授乳期暴露のアカゲザル生殖器発育への影響. 環境ホルモン学会第5回研究発表会要旨集, 355 (抄録), 2002. (環境ホルモン学会第5回研究発表会, 2002年11月25-26日, 広島)

#### H. 知的財産所有権の出願、登録状況

なし。

表1 胎生期・授乳期に TCDD に暴露された児の外生殖器の発育

表1-1 F1a オス

群	生後1日			生後90日			生後270日		
	例数	陰茎基部まで (mm)	陰茎長 (mm)	例数	陰茎基部まで (mm)	陰茎長 (mm)	例数	陰茎基部まで (mm)	陰茎長 (mm)
対照	5	37.6±1.8	20.6±2.9	5	51.0±4.8	22.0±1.6	5	56.6±4.4	27.4±6.3
30ng/kg	8	37.3±8.1	21.5±4.5	8	51.8±6.0	23.4±5.3	7	55.1±5.2	27.0±5.3
300ng/kg	8	31.3±8.4	19.4±3.0	8	47.8±6.4	21.8±2.5	8	54.0±3.1	23.5±1.5

表1-2 F1a メス

群	生後1日			生後90日			生後270日		
	例数	膣口まで (mm)	陰核まで (mm)	例数	膣口まで (mm)	陰核まで (mm)	例数	膣口まで (mm)	陰核まで (mm)
対照	13	12.2±3.0	20.3±1.7	13	15.0±2.3	25.8±3.4	12	18.9±2.6	31.8±4.3
30ng/kg	7	10.9±1.7	20.6±1.7	7	13.1±2.0	26.3±2.3	7	20.0±3.7	32.1±2.5
300ng/kg	7	11.7±2.4	19.9±2.0	6	15.3±2.2	25.7±2.9	6	20.8±3.0	31.8±4.1

表1-3 F1b オス

群	生後1日		
	例数	陰茎基部まで (mm)	陰茎長 (mm)
対照	3	56.6±5.2	13.1±2.7
30ng/kg	6	54.2±4.8	12.9±1.7
300ng/kg	8	56.9±7.2	11.9±2.1

表1-4 F1b メス

群	生後1日		
	例数	膣口まで (mm)	陰核まで (mm)
対照	8	11.4±1.0	21.2±0.9
30ng/kg	4	11.4±2.0	21.4±1.5
300ng/kg	3	11.0±1.0	22.3±0.9

注：オスの肛門-生殖器間距離は肛門から陰茎基部までを測定した。

メスの肛門-生殖器間距離は肛門から膣口までと肛門から陰核までの2種類測定した。

2, 3, 7, 8-四塩化ジベンゾパラジオキシン（TCDD）胎生期・授乳期暴露の  
アカゲザル児の行動発育への影響に関する研究

分担研究者 安田 峯生 広島国際大学保健医療学部教授  
浅岡 一雄 京都大学霊長類研究所助手  
(研究協力者 吉川 泰弘 東京大学大学院農学生命科学研究科)

研究要旨 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目的で、妊娠 20 日から生後 90 日まで、母体に 2, 3, 7, 8-四塩化ジベンゾパラジオキシン（TCDD）30 ng/kg または 300 ng/kg の体内負荷をかけたアカゲザル母体の児について、生後 12～15 ヶ月齢で 4 段指迷路試験、13～15 ヶ月齢で新奇出合わせ試験、23～26 ヶ月齢でアイコンタクト試験を行った。指迷路試験では、馴化と練習課題を経た後には、いずれの群も 90%以上の正反応率を示し、群間には有意差は認められなかった。児を出合わせ 15 分間の行動を解析したところ、対照群ではステレオ環境探索行動が、低用量群では他個体に接近・接触する友好的行動が、高用量群では移動する環境探索行動が、比較的多く観察された。アイコンタクト試験では、いずれの群でもメスのアイコンタクト数が多い傾向が見られたが、TCDD 投与の影響は認められなかった。これらの結果から、300 ng/kg の母体内負荷量でも、児の知能発達に悪影響を及ぼさないことが明らかになった。出合わせ試験では、対照群に比べてダイオキシン暴露群では環境への興味を示している傾向が見られたが、これは暴露群でむしろ行動の成熟が進んだのではないかと考えられる。アイコンタクト試験では、明らかな性差が認められたが、TCDD 投与による影響は見られず、この指標で評価する限り、オス個体のメス化が起こっているとは考えられない。以上の結果から、現在の 4 pg/kg/日の TDI は妥当なものといえる。

#### A. 研究目的

ダイオキシン類の胎生期・授乳期暴露により、児の知能低下、行動異常が誘発されるのではないかと懸念が社会に広がっている。げっ歯類や霊長類でダイオキシン類が神経行動学的影響を及ぼしたとの報告もなされている。本研究の目的は、げっ歯類よりヒトに近いと考えられるアカゲザルを用い、妊娠サルに 30 または 300 ng/kg という微量の TCDD を投与し、その後も胎生期・授乳期を通じて体内負荷量を一定に保つように維持量の投与を続け、児の生後の行動を観察することにより、妥当な TDI 決定のための基礎的なデータを得ることである。

#### 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 2, 3, 7, 8-四塩化ジベンゾパラジオキシン（以下 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。

生後 12～15 ヶ月齢で 4 段指迷路試験、13～15 ヶ月齢で新奇出合わせ試験、23～26 ヶ月齢でアイコンタクト試験を行った。各試験の方法を以下に記述する。

##### 1) 4 段指迷路試験

各群 4 匹の子ザルを選び、図 1 に示す非修正法型 4 段指迷路を施行した。その手続きは次のとおりである。

馴化:実験装置と実験者に馴れさせるために、餌箱丈夫からリンゴ片を落とし、これを拾わせる訓練を2日間行う。

訓練1:迷路第1段中央に置かれた報酬(リンゴ片)を指先で移動させ、餌箱へ落とす訓練。15試行からなるセッションを1日2回。2セッション連続で14試行以上正試行であることを習得基準とした(以下同様)。

訓練2:迷路第2段中央に置かれた報酬を指先で移動させ、餌箱へ落とす訓練。

訓練3:迷路第3段中央に置かれた報酬を指先で移動させ、餌箱へ落とす訓練。

訓練4:迷路第4段中央に置かれた報酬を指先で移動させ、餌箱へ落とす訓練。

ランダムテスト:迷路第1段から第4段までのいずれかに擬似ランダムな順序で報酬を置き、餌箱へ落とすことができるか否かをテスト。

## 2) 新奇出合わせ試験

各群オス2匹、メス2匹の子ザルについて試験した。実験装置と試行の様子を図4に示す。幅122 cm、奥行き75 cm、高さ69 cmの透明なアクリル製ケージの中央部に取り外せるステンレス板とアクリル板の仕切が付けられている。この仕切の両側に子ザルを1匹ずつ入れ、10分間馴化させる。に2匹の子ザルを入れ、まずステンレス板のみを外し、5分間お互いに姿が見えるが直接の接触はできない状態に置く。その後アクリル板も外してお互いに接触可能な状態にする。15分間そのままに保ち、その間の行動をビデオカメラで撮影する。行動を社会行動32種類、その他8種類に分類し、その頻度を解析した。第1回試験から12ヶ月後に第2回試験を行った。

## 3) アイコンタクト試験

合計28匹の子ザルについて試験した。試験の様子を図6に示す。ケージの前面から85 cm離れて試験者が座り、1分間に子ザルと目の合う回数を数えた。

## 倫理面への配慮

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

## C. 研究結果

### 1) 指迷路試験

各群4匹をランダムに抽出して行った4段式指迷路試験の結果を各子ザルについて図2に示す。図の上部に各子ザルの動物番号が表示されている。習得の進行にはかなりの個体差が認められたが、どの個体も訓練を経るにつれて正反応率が上昇することが分かる。図3に群別の正

反応率を示す。馴化と練習課題を経た後には、いずれの群も90%以上の正反応率を示し、群間には有意差は認められなかった。また、2回の試行の間にも顕著な差は認められなかった。

### 2) 新奇出合わせ試験

各群オス・メス2匹ずつ選んだ児を出会わせて15分間の行動を解析した結果を図5に示す。群間の行動パターンに若干の差が認められ、対照群では、ステレオ環境探索行動が、低用量群では他個体に接近・接触する友好的行動が、高用量群では移動する環境探索行動が、比較的多く観察された。1回目と2回目を比較すると、どの群でも2回目が自己中心性行動が高まる傾向が認められた。

### 3) アイコンタクト試験

各群オス・メス5匹(高用量群のみオス3匹)について行ったアイコンタクト試験では、いずれの群でもメスのアイコンタクト数が多い傾向が見られたが、TCDD投与の影響は認められなかった。

## D. 考察

児の神経行動学的発達の観察により、アカゲザルでは生後1年で既に指迷路試験での知能評価が可能であること、300 ng/kgの母体体内負荷量でも、児の知能発達に悪影響を及ぼさないことが明らかになった。出合わせ試験では、対照群に比べてダイオキシン暴露群では環境への興味を示している傾向が見られたが、これは暴露群でむしろ行動の成熟が進んだのではないかと考えられる。1回目と2回目の差は、約1年間の行動面での成長を示したものであろう。アイコンタクト試験では、明らかな性差が認められたが、TCDD投与による差は見られず、この指標で評価する限り、オス個体のメス化が起こっているとは考えられない。

## E. 結論

現在のわが国でのTDIの設定根拠となったラットでの最小毒性体内負荷量86 ng/kgは、対数目盛で30 ng/kgと300 ng/kgのほぼ中間に相当する。TCDD30または300 ng/kgの母体体内負荷に妊娠20日から生後90日まで暴露されたアカゲザル児の認知・行動評価では、発育個体の社会性に影響がある可能性が示唆されたが、児の知能や警戒心に悪影響を与えないことが示された。この結果から、現行のTDIは妥当なものであることが示唆された。

G. 研究発表

なし。

H. 知的財産所有権の出願、登録状況

なし。

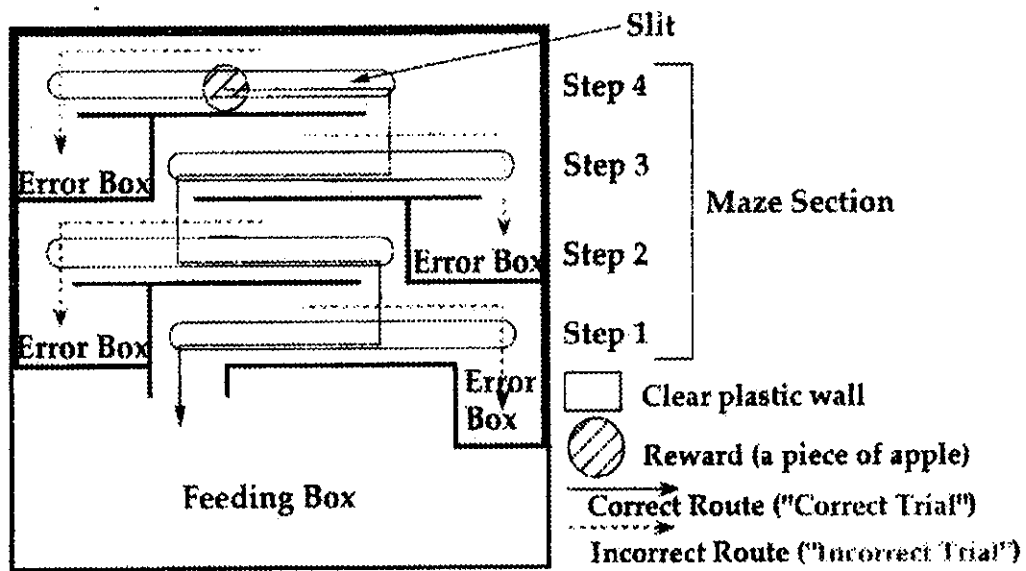


図1 4段指迷路試験装置

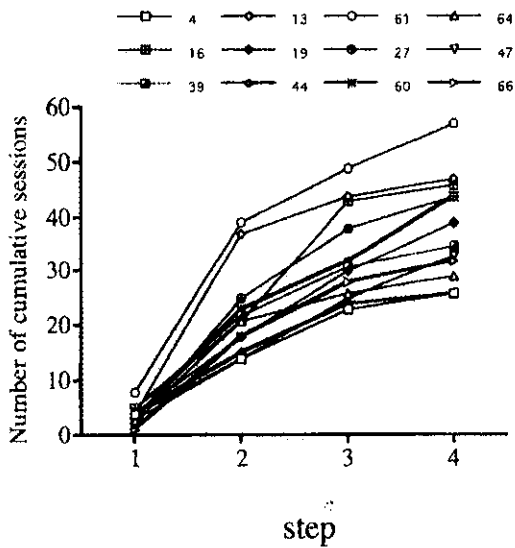


図2 各個体が4段目まで到達する累積度数

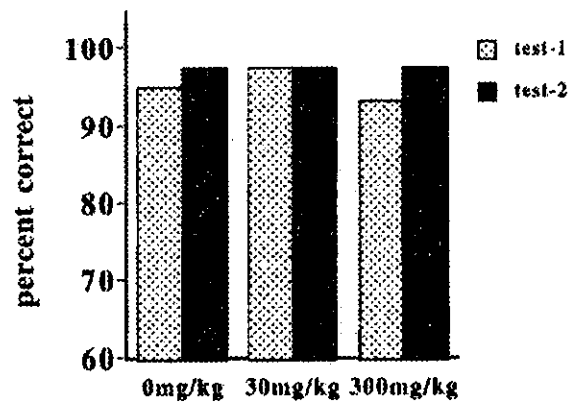


図3 各群の正反応率

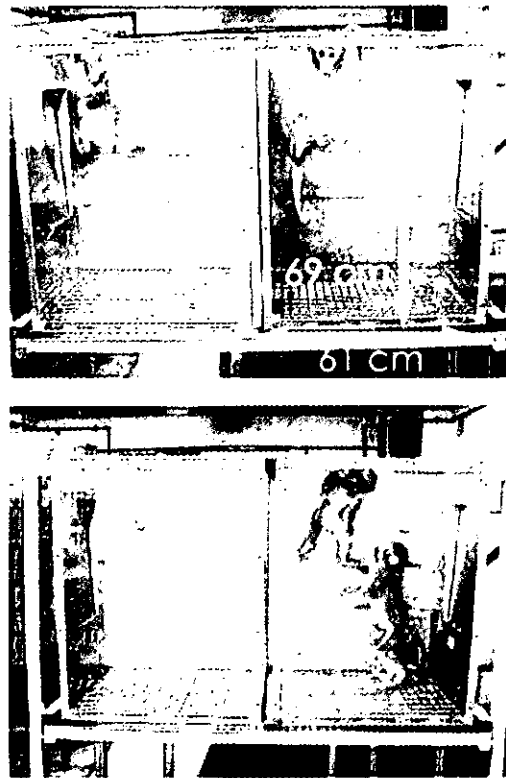


図4 新奇出合わせ試験の様子。上図中央の隔壁を取り、その後の2匹の行動を観察する。

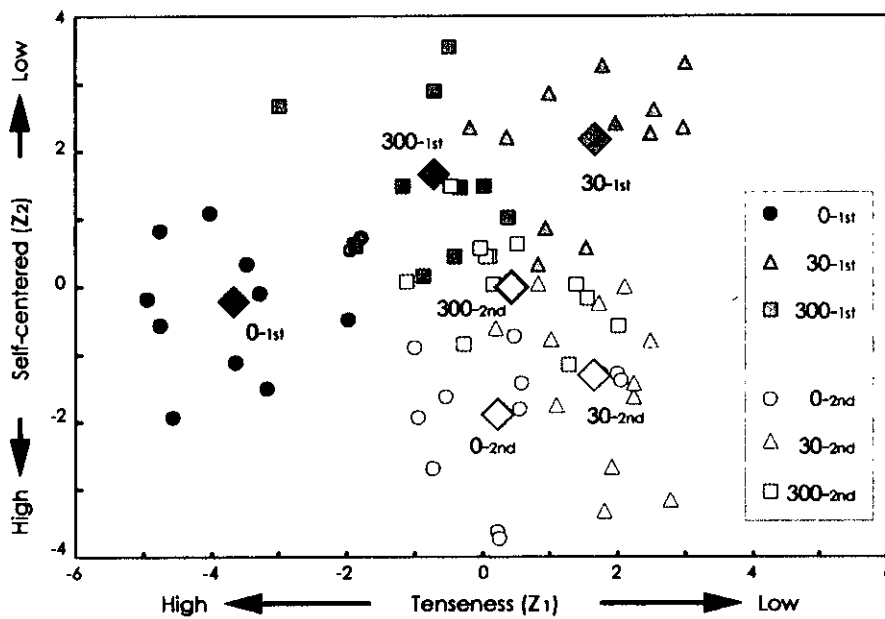


図5 新奇出合わせ試験の結果を示す散布図  
横軸には緊張度を示す。右へ行くほど緊張度は低い。  
縦軸には自己中心性を示す。上へ行くほど自己中心性は低い。



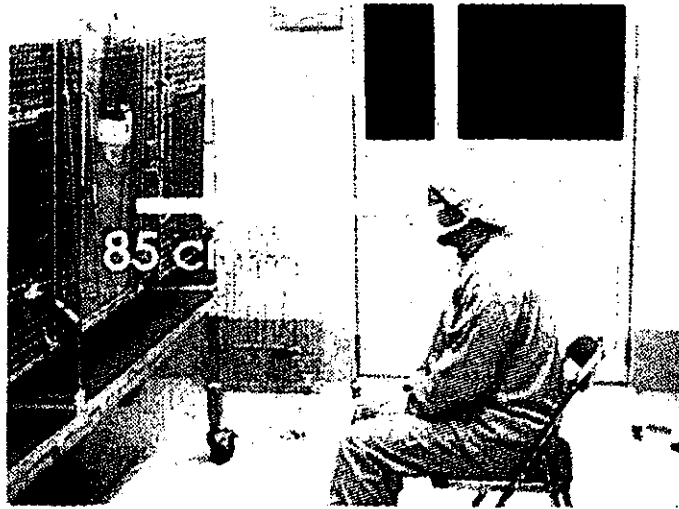


図6 アイコンタクト試験の様子

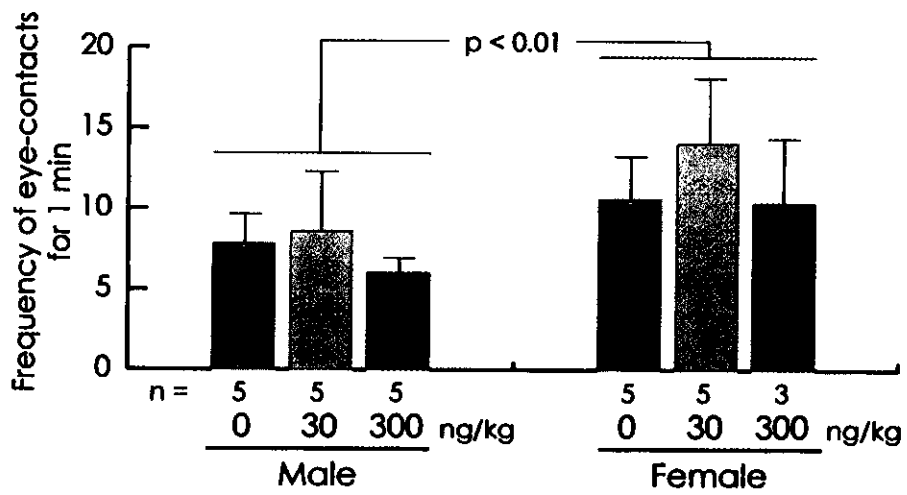


図7 アイコンタクト試験結果

2,3,7,8-四塩化ジベンゾパラジオキシン (TCDD) の  
胎生・授乳期暴露による腎病変に関する研究

分担研究者 隅田 寛 広島国際大学保健医療学部教授  
山下 敬介 広島大学大学院医歯薬総合研究科助教授

研究要旨： 人体に生殖機能の低下や発ガン等の影響を及ぼすとされるダイオキシン類の毒性発現は一日当りの暴露量より、血中濃度や体内負荷量に依存するといわれる。本研究では、一定の体内負荷量になるように、妊娠したアカゲザルにダイオキシン類の中でも最も毒性の強い2,3,7,8-四塩化ジベンゾパラジオキシン (以下 TCDD) を妊娠 20 日に 300 ng/kg 皮下投与した。対照には溶媒のみを同様に投与した。その後 30 日毎に初回投与量の 5 %を維持量として投与して、その児の腎発生にあたる影響を調べた。生後死亡した対照児 (死亡日齢 432 日) と TCDD 暴露を受けた児 (死亡日齢 425 日) の腎臓の組織切片標本からそれぞれ腎小体の個数、その面積を数値化し、その差を比較、検討した。

その結果、TCDD 暴露を受けた児の腎には異形成が認められた例が確認された。正常な児のそれに比べ、TCDD 暴露による異形成腎には変形した腎小体が多く認められた。腎小体の個数に大きな違いは見られなかったが、異形成腎の腎小体の面積は小さいものが多く、ばらつきも大きかった。BUNの数値から、異形成腎は児の生前から腎機能が著しく低下していたことが判明した。以上の結果より TCDD300 ng/kg の母体負荷は児の腎発生に何らかの悪影響を及ぼしていることが示唆された。

A. 研究目的

ダイオキシン類は消化管、皮膚及び肺から吸収され、ヒトは日常生活でのダイオキシン類の総摂取量の 90%以上を経口摂取している。一般にダイオキシン類は代謝されにくく、代謝には大きな種差がある。ダイオキシン類の発生毒性のメカニズムは、十分に解明されている段階には至っていないが、アリーール炭化水素受容体 (AhR) の

仲介で DNA の特定部位に結合し、遺伝子の発現を乱して、哺乳類に奇形を生じるなどの影響を及ぼしていると考えられている。つまり、妊娠 AhR ノックアウトマウスと野生型のマウスにダイオキシンを投与すると、野生型のマウスにはその仔に尿管異常、口蓋裂、水腎症などの異常が惹起されるが、ノックアウトマウスではこれらの異常は出現しない。ダイオキシン類はヒトにおいて

も発ガン性や催奇形性が疑われている。母親の体内に蓄積されたダイオキシン類は胎児へ移行する。また母乳中に分泌されるので乳汁を通して児に移行する。現在、わが国におけるヒトのダイオキシン類の耐容一日摂取量 (TDI) は  $4 \text{ pg/kg}$  とされている。この値は胎生期に TCDD の暴露を受けたラットの実験から算定したものである。ところが、ダイオキシン類の生体内半減期は、齧歯類とヒトでは大きく異なるものと考えられ、齧歯類のデータを単純にヒトに応用することができるかどうか検討の余地がある。本研究の目的は、長期間、微量のダイオキシン類の暴露を受けた霊長類を使用し、長期的スパンの見地から次世代への影響を調べることである。この実験において生後死亡した児の中に腎の異形成が認められた例があった。この研究では、腎異形成例の微細構造を対照腎と比較することで、腎発生にあたる影響について検討した。

## B. 研究方法

妊娠 20 日のアカゲザルに TCDD $300 \text{ ng/kg}$  を皮下投与し、30 日毎に初回投与量の 5% を追加投与することにより体内負荷量を維持する条件で妊娠を継続させ、自然分娩の後 90 日まで投与を続けた。このように母動物の体内負荷量を一定に保つように投与し、生後死亡した 1 例の児 (♀、生後 425 日に死亡) と対照群で生後死亡した 1 例 (♀、生後 432 日に死亡) の腎臓のパラフィン包埋ヘマトキシリン-エオシン染色組織切片標本を材料に、腎小体の個数、その面積を数値化した。

顕微鏡にデジタルカメラを装着し、各群 1 枚の組織切片につき撮影範囲が重ならないよう、かつ腎断面全体をカバーするように撮影し、パーソナルコンピューターに取

り込んだ。1 画像で撮影された範囲は  $2.9 \text{ mm} \times 3.3 \text{ mm}$  であった。その画像を Scion Image を使用して腎小体の個数と面積を算出した。面積は対物マイクロメーターの写真を利用しキャリブレーションを行った。

また生後 12 ヶ月に血液尿素窒素 (BUN) を調べた。

## C. 研究結果

TCDD 暴露は 20 母体に対して行われた。その中で、出生は 16 例であった。生後死亡 8 例の中で、顕微鏡的に腎異形成が認められたのは 2 例であった。したがって、腎異形成は生後死亡例の 25% に出現した割合となる。

顕微鏡所見において異形成が認められた腎の腎小体は、対照腎のそれに比べ変形が認められた。ボウマン囊の上皮には対照群と比較して変化は認められなかった。また腎表面に凹凸が認められ、腎線維被膜の肥厚と剥離も同時に認められた (図 1, 2)。異形成腎は線維化の傾向があった。皮質においては、特に血管周囲の間質の増殖が顕著であった。皮質の萎縮は認められなかったが、一部、尿細管の萎縮と消失が認められた (図 1, 2)。髓質の線維化は部位によっては著しく、腎細管がほとんど消失している部も観察された。

計測の結果、単位面積あたりの腎小体の個数は対照腎と異形成腎とでほぼ同数であり、有意差はみられなかった。しかし腎小体の面積には対照腎と異形成腎の間に差が認められた (図 3)。対照腎の腎小体面積の平均は  $9.2 \pm 3.3 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$  で、 $9 \sim 10 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$  の面積を有する腎小体が最も多く認められた (図 3)。また面積の最小値は  $3 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$ 、最大値は  $16 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$  であった。一方、異形成腎の平均腎小体面積は

$6.8 \pm 5.3 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$ 、モード値は  $3 \sim 4 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$  で対照腎に比較して腎小体の明らかな萎縮が認められた (図 3)。また、異形成腎の腎小体面積のばらつきは大きく、対照腎には認められない非常に萎縮した腎小体 ( $1 \sim 2 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$ ) が認められた一方で、一部は  $22 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$  と肥大していた (図 3)。対照腎と異形成腎の腎小体面積の分散、平均値とも統計的検定 (t 検定) で有意差が認められた ( $p < 0.01$ )。

生後 12 ヶ月に行われた血液生化学検査において、血中尿素窒素の値が TCDD 暴露により腎異形成が認められた児では  $45.3 \text{ mg/dl}$  であり、対照群平均値  $26.9 \pm 6.5 \text{ mg/dl}$  より高かった。

#### D. 考察

本研究結果から、TCDD 暴露群の腎に異形成が生じる可能性があることが判明した。異形成腎では、特に腎小体の矮小化が著しかった。本研究では薄切された腎小体を計測対象としているので、仮に全ての腎小体の大きさが同じだとしても、切片上に現れる面積にはばらつきが生じる。しかし異形成腎の腎小体面積の分布は、対照群と比べ明らかに異なっており、腎小体の多くが萎縮していたと考えられる。BUN 量から、異形成腎は生前から機能低下していたと考えられる。萎縮した腎小体が機能低下の原因であることが示唆される。また、異形成腎では著しく萎縮した腎小体が多いのにもかかわらず、腎小体面積の平均値がモード値よりも比較的大きいのは、一部に肥大化した腎小体が認められるためである。この腎小体の肥大は萎縮した腎小体の機能低下を補うため、代償的に生じたものかもしれない。

腎発生過程はまず初期の尿管芽が伸び

るところから始まり、この誘導作用で造腎間葉内にボーマン嚢が形成される。その中に血管が陥入して糸球体となり、両者が腎小体を形成する。観察した切片上での腎小体の数に大きな差は無かったところから、腎の初期発生における尿管芽の分枝は正常に進行し、その後の腎小体の分化、成長の過程が TCDD により障害されたと推測される。TCDD の胎生期暴露はマウスで腎臓障害を起こすことが知られているが、これは尿管上皮の過形成によって尿管狭窄が生じ、その結果尿が腎盂に溜まり二次的に水腎症を起こしたものである。今回観察されたアカゲザルでの腎障害は水腎症に特徴的な所見は得られておらず、マウスに認められる腎障害とは明らかに発生病理過程が異なるものと考えられる。

異形成腎では、腎小体の萎縮の他に、間質の増殖が認められ、線維化をおこしていたと考えられる。一部の尿細管は線維化のために消失しており、腎機能低下の原因の一部であった可能性が高い。特に髄質においてはほとんど腎細管が消失していた部もあり、最終的にはこの異形成腎はほとんど機能が失われていたかも知れない。間質の増殖は、特に血管周囲に著しかったが、その原因は不明である。一方、TCDD は TGF- $\beta$  の過剰発現を引き起こすことが報告されている。TGF- $\beta$  の過剰発現は種々の器官に線維化を生じさせるという報告があり、異形成腎に認められた線維化も TCDD により TGF- $\beta$  の過剰発現を介して引き起こされた可能性がある。

#### E. 結論

胎生・授乳期のアカゲザルに TCDD300 ng/kg 暴露したところ、児の腎形成に腎小体の萎縮を中心とする異形成が認められた。