

20031167

厚生労働科学研究費補助金  
厚生労働科学特別研究事業

## 臭素化ダイオキシン類の毒性評価に関する研究

平成 15 年度 総括研究報告書

主任研究者 山本 静護

平成 16(2004)年 3 月

## 目 次

I 総括研究報告書	
臭素化タイオキシン類の毒性評価に関する研究	1
山本静護	

臭素化ダイオキシン類の毒性評価に関する研究

主任研究者 山本 静護

中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター 副所長

研究要旨

臭素化ダイオキシンによる労働者の健康障害を防止する施策を行うための基礎データを得ることを目的として、臭素化ダイオキシン類の（１）労働現場における暴露形態に合わせた経気道投与による毒性（動物への吸入暴露代替法としての経気道投与技術の開発・検討を含む）、及び（２）塩素化ダイオキシン類との毒性比較に必要な経口投与による毒性（臓器毒性や生殖毒性等）を評価するための研究を３年計画で行う。Ⅰ 塩素化ダイオキシン類との毒性比較に必要な経口投与による毒性（臓器毒性や生殖毒性等）を評価するための研究では、先年度（平成 14 年度）は、臭素化ダイオキシンの単回経口投与毒性に関する研究を行った。すなわち、2,3,7,8 四臭化シベンゾ-パラ-シオキシン（2,3,7,8-TBDD）を Crj Wistar ラット雌雄に 100 $\mu$ g/kg、10 $\mu$ g/kg、1 $\mu$ g/kg 及び 0 $\mu$ g/kg（対照群 溶媒のみ）を一回強制経口投与し、投与後 2 日、7 日及び 36 日にそれぞれ 5 匹の動物を解剖し、その生態影響を検索した。その結果、（１）胸腺、肝臓及び脾臓への臓器毒性が明らかとなり、過去の報告（Ivens 等 1992 年）とも良く一致していた。さらに、（２）2,3,7,8-TBDD の生体影響の新たな知見として、① 肝臓と血液系、特に血液凝固能への毒性が主な死因であること、② 骨髄にも顕著な毒性影響がみられること、及び③ 1 回投与でも時間の経過とともにの毒性影響が強くなる遅延性の毒性が起きることが明らかとなった。本年度（平成 15 年度）は、2,3,7,8-TBDD を親動物（妊娠 8 日の母動物）に単回経口投与（投与量は前年度の結果を考慮した）し、母動物、胎児及び出生児への影響と TBDD の親と児への体内負荷量を検索した。その結果、①母動物には、体重増加の抑制、血小板数の減少、肝組織変化、死産等、②胎児には全身浮腫、子宮内死亡、胎児重量と胎盤重量の低下、外表および内臓奇形（全身性浮腫、口蓋裂、水腎症および心室中隔欠損）、骨格変異や骨化の遅延、内臓変異等、③出生児には 上顎切歯の萌出と眼瞼開裂の早期化、血液学的パラメーターの低下、甲状腺ホルモン(T4)の低下と甲状腺刺激ホルモンの増加、肝臓中の誘導酵素群の増加、肝細胞質の空胞化、前立腺重量の低下等が認められた。さらに、④TBDD 体内負荷量測定の結果、TBDD の胎盤移行と乳汁移行が確認された。これらの所見はいずれも従来全く報告されていない新知見であり、臭素化ダイオキシンには、塩素化ダイオキシン類と類似した生体影響があることが初めて見出された。Ⅱ 動物への吸入暴露代替法としての経気道投与技術の開発 検討では、前年度（平成 14 年度）は TBDD の経気道投与に用いる動物種及び投与方法 器材の選定等を目的とした投与技術の基礎的検討を行い、① 動物種は、ラットを選定し、② 麻酔法は、イソフルランを使用した吸入麻酔法が有効であり、③ 投与方法は、液体気管内投与器具を使用した液体気管内噴霧法が最も良好であったとの結論を得た。これに基づき本年度（平成 15 年度）は、経気道投与に用いる媒体、投与量、投与回数を検討を行った結果、①液体気管内噴霧法により、被験物質は肺に適切に投与され、各葉へ拡散 分布する。②媒体は、エタノールが適切であると判断し 投与溶液のエタノール濃度は 20%とする。③投与量、回数は 1 日 1 回、体重 1kg 当たり 0.5mL が適切である判断し、隔日 3 回投与が可能と考えた。TBDD を肺内に均一に投与可能な経気道投与技術を確立した。

# I 2, 3, 7, 8 - 四臭化ジベンゾ-パラ-ジオキシン (TBDD) の次世代への影響 に関する基礎的検討

## A 研究目的

労働環境や一般環境に排出される臭素化タイオキシンによるヒトへの影響が懸念されている。臭素化タイオキシンのヒトへの暴露は主に吸入による経路が考えられるが、動物実験において、臭素化ダイオキシンの体内での吸収、分布に経気道と経口の投与経路による差はないと報告されている (Kedderiss et al 1992)。

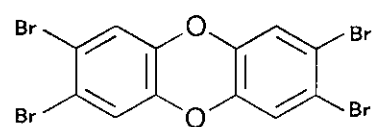
一般に、ダイオキシン類は、ヒト、動物ともに母親から胎盤および乳汁を介して次世代に移行し、動物実験では次世代に様々な生体影響をおよぼすことが報告されている (Schector et al 1996, Tsutsumi et al 2000, Yonemoto 2000)。その多くはダイオキシン類の中で最も毒性が強いとされる 2,3,7,8-tetrachloro-p-dioxin(TCDD)を用いた研究報告である。臭素化ダイオキシンのうち、2,3,7,8 tetra dibromo p-dioxin(TBDD)は、構造や生物活性が TCDD と類似していることから、ヒトや動物に対して TCDD に類似した生体影響をおよぼすことが推測されている (Mason et al 1987a,b)。しかしながら、臭素化ダイオキシンが次世代に与える影響に関する研究報告は少ない。

そこで、本研究では、TBDD を妊娠期のラットに単回経口投与し、母動物、胎児および出生児への生体影響に関する基礎研究を行なった。

## B 研究方法

### 1 被験物質

被験物質の 2,3,7,8-四臭化シベンゾ パラ シオキシンは、Cambridge Isotope Laboratories, Inc より購入した。



(2,3,7,8-Tetrabromodibenzo-p-dioxin)

各濃度の TBDD 溶液は、TBDD をごく少量のトルエンに溶解し、さらに各設定濃度になるようにコーン油を加え、マグネチックスターラを用いて混合、投与液量が 5mL/kg 体重になるように調製した。TBDD は紫外線による分解が速いため (Buser et al 1988, Neupert et al 1988) 溶液の調製を投与直前に黄色灯下で行った。TBDD 溶液中に含まれる被験物質の含量は、島津テクノリサーチ(株)に測定を依頼し、確認した。

### 2 動物および飼育方法

動物は、日本チャールス リハー(株)筑波飼育センター生産の Wistar 系 (Crj Wistar, SPF) ラットを用いた。雄は 12 週齢、雌は 11 週齢で購入し、1 週間の検疫後、妊娠雌を得るために雌雄 11 対で連日同居させた。交尾の確認は膣スミア中の精子の存在 または膣栓の存在により行い これらの認められた日を妊娠日(妊娠 0 日)とした。交尾した雌を妊娠 0 日の体重を基に適正層別方式により 25 匹ずつ 4 群に群分けし それぞれの群の中で、分娩用として 8 匹、帝王切開用として 17 匹を用意した。また、TBDD の組織中濃度測定の

ためのサテライト動物として、3匹の妊娠雌と9匹の未交尾雌（処女雌）を用意した。

投与日より、動物はTBDD管理区域の動物飼育用チャンパー内で飼育し、環境は、温度 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50\pm 20\%$ 、換気回数12回/時、12時間点灯（8:00～20:00）/12時間消灯（20:00～8:00）で維持された。動物は、妊娠中はステンレス製網ケージで単飼育され、分娩用の動物は妊娠20日に紙パルプ製チップ（ALPHA-dri™、Shepherd Specialty Papers Inc）を敷いたアルミ製箱型ケージに移し、飼育した。

動物には、 $\gamma$ 線照射滅菌したCRF-1固型飼料（オリエンタル酵母工業(株)）と、フィルターろ過し、紫外線照射した水道水を自由摂取させた。

### 3 投与量の設定および投与方法

投与量は、前年度に実施したラットを用いたTBDDの単回経口投与毒性試験（投与量 0, 10, 30, 100, 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$  体重）の結果を基に決定した。前年度の研究結果では300 $\mu\text{g}/\text{kg}$  体重のTBDD投与で死亡が認められたことから、この投与量では毒性影響が強すぎると判断し、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$  体重を高用量と設定し、以下、公比10で減して、中用量に10 $\mu\text{g}/\text{kg}$  体重を、低用量には1 $\mu\text{g}/\text{kg}$  体重を設定した。また 投与時期は着床の完了している妊娠8日とした。

### 4 帝王切開用母動物と胎児の観察および検査

#### 1) 一般状態観察および体重測定

一般状態観察は毎日行った。体重測定は、妊娠8（投与直前）、10、15、20日に行った。

#### 2) 帝王切開

帝王切開用の母動物は妊娠20日にエーテル麻酔下で腹大動脈から採血後、放血致死させ解剖し 器官 組織の肉眼観察を行った。肉眼観察の終了後、受胎が確認してきた動物については帝王切開により胎児を摘出した。

#### 3) TBDD 組織中濃度の測定

帝王切開後、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$  群の3匹の母動物について肝臓と脂肪組織を採取、重量を測定後、 $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。また、1 $\mu\text{g}/\text{kg}$  群、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$  群および100 $\mu\text{g}/\text{kg}$  群の各3匹の母動物から得られた生存胎児を用いて、腹毎に、1匹の胎児は胎児全体のTBDD未変化体濃度を、残りの胎児は肝臓を摘出し、腹毎にプールしたTBDD未変化体濃度を測定した。これらの組織中のTBDD未変化体濃度は、島津テクノリサーチ(株)に測定を依頼した。

#### 4) 母動物の臓器重量測定および臓器保存

各群10匹以上の母動物について、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、脳、甲状腺および下垂体を採取し、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓および脳については湿重量を測定し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定して保存した。下垂体と甲状腺は10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定した後に周囲組織から切り離して湿重量を測定し、再度、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定、保存した。

なお、動物の最終体重に対する各臓器の湿重量の比率（体重比）も算出した。

#### 5) 病理組織学検査

各群5匹の母動物から採取 固定した肝臓を常法に従ってパラフィン切片とし、ヘマトキシリン エオシン染色を行って病理組織標本を作製し、光学顕微鏡で病理組織学検査を行った。

#### 6) 血液学検査および血液生化学検査

各群10匹以上の母動物について、帝王切開時に採血した血液を用いて血液学検査および血液生化学検査を行った。血液学検査は 総合血液学検査装置（ADVIVA 120 ハイエル社）全自動血液凝固測定装置（Sysmex CA 5000 シスメックス(株)）および血液細胞自動分類装置

(MICROX HEG-120NA オムロン(株))により、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、平均赤血球ヘモグロビン量、平均赤血球ヘモグロビン濃度、血小板数、網赤血球比、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間、フィブリノーゲン量、白血球数および白血球分類を測定した。血液生化学検査は、自動分析装置(日立 7070 (株)日立製作所)により、総蛋白、アルブミン、総ビリルビン、グルコース、総コレステロール、リン脂質、尿素窒素、クレアチニン、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム、無機リンの各濃度とA/G比、およびGOT、GPT、LDH、ALP、 $\gamma$ -GTP、CPKの各活性値を測定した。

#### 7) 血清中の甲状腺ホルモン濃度の測定

各群 10 匹以上の母動物について、帝王切開時に採血した血液を用いて血清中甲状腺ホルモン濃度の測定を行った。検査は ARVOSX マルチラヘルカウンターにより、Truodothyronine (T3)、Thyroxin (T4)、Thyroid-Stimulating Hormone (TSH) の各濃度を測定した。

#### 8) 胎児の検査

受胎が確認された母動物のうち対照群 15 腹、1 $\mu$ g/kg 群 14 腹、10 $\mu$ g/kg 群 12 腹および 100 $\mu$ g/kg 群 13 腹の胎児について、生存および死亡数の計数後、生存胎児は性別の確認、体重測定、胎盤重量測定および外表観察を行った。その後、腹単位で生存胎児の半数は内臓検査、残りの半数は骨格検査を行った。

内臓の検査は、胎児を 10% 中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定、さらにブアン固定液で再固定した後、実体顕微鏡下で剖検、観察した。骨格の検査は、胎児を剥皮し、内臓を摘出後エタノールで固定、アリザリンレッド S 染色を施した後、実体顕微鏡下で観察した。

なお、母動物の黄体数及び子宮の着床痕数を

計数し、着床率「(着床痕数/黄体数)  $\times$  100, %」および子宮内胚損失率「(死亡・吸収胚数/着床痕数)  $\times$  100, %」を算出した。

#### 5 分娩用母動物と出生児の観察および検査

##### A 分娩用母動物の観察および検査

###### 1) 分娩および哺育

分娩用の母動物は、自然分娩をさせた。分娩の確認は、妊娠 20 日から分娩の完了まで毎日行い、16 時までに分娩が完了した動物は、その日を分娩日(哺育 0 日)とした。分娩状態を直接観察してきた動物については、分娩状態の異常の有無を観察した。また、妊娠 0 日~分娩日の日数を妊娠期間として算定した。

分娩後は、児動物を 21 日齢まで授乳、哺育させた。分娩はしたが、哺育する児動物のいない母動物は分娩後 21 日まで飼育した。

###### 2) 一般状態観察および体重測定

一般状態観察は毎日行った。体重測定は、妊娠 8 (投与直前)、10、15、20 日、および哺育 0 (分娩日)、4、7、14、21 日に行った。

###### 3) 剖検

哺育 21 日(分娩後 21 日)に、エーテル麻酔下で腹大動脈から採血後、放血致死させ解剖し、器官・組織の肉眼観察を行った。剖検後、子宮を摘出し、着床痕数を計数した。

###### 4) TBDD 組織中濃度の測定

剖検後、10 $\mu$ g/kg 群の 3 匹の母動物について肝臓と脂肪組織を採取し、重量測定後、 $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。これらの組織中の TBDD 未変化体濃度は、島津テクノリサーチ(株)に依頼して測定した。

###### 5) 臓器重量測定および臓器保存

全動物について、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、

脳、甲状腺および下垂体を採取し、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓および脳については湿重量を測定し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定して保存した。下垂体と甲状腺は10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定した後に周囲組織から切り離して湿重量を測定し、再度、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定、保存した。

なお、動物の最終体重に対する各臓器の湿重量の比率（体重比）も算出した。

#### 6) 病理組織学検査

全動物について、採取 固定後の肝臓を切り出し 常法に従ってパラフィン切片とし、ヘマトキシリン・エオシン染色を行って病理組織標本を作製し、光学顕微鏡で病理組織学検査を行った。

また、対照群と100 $\mu$ g/kg群の各2匹の肝臓について、グルタルアルデヒドおよびオスミウム固定を施し、樹脂包埋後、酢酸ウランにて染色し、透過型電子顕微鏡で病理組織学検査を行った。

#### 7) 血液学検査および血液生化学検査

全動物について、解剖時に採血した血液を用いて血液学検査および血液生化学検査を行った。血液学検査は、総合血液学検査装置（ADVIVA 120 パイエル社）、全自動血液凝固測定装置（Sysmex CA-5000 シスメックス(株)）および血液細胞自動分類装置（MICROX HEG-120NA オムロン(株)）により、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、平均赤血球ヘモグロビン量、平均赤血球ヘモグロビン濃度、血小板数、網赤血球比、プロトンヒン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間 フィブリノーゲン量、白血球数および白血球分類を測定した。血液生化学検査は自動分析装置（日立 7070 (株)日立製作所）により、総蛋白、アルブミン、総ヒリルヒン、グ

ルコース、総コレステロール、リン脂質、尿素窒素、無機リンの各濃度とA/G比、およびGOT、GPT、LDH、ALP、 $\gamma$ -GTP、CPKの各活性値を測定した。

#### 8) 血清中の甲状腺ホルモン濃度の測定

全動物について、解剖時に採血した血液を用いて、血清中の甲状腺ホルモン濃度の測定を行った。検査はARVO<sub>SX</sub> マルチラヘルカウンターにより、Triiodothyronine (T3)、Thyroxin (T4)、Thyroid Stimulating Hormone (TSH)の各濃度を測定した。

#### B 児動物の観察および検査

##### 1) 一般状態観察および体重測定

出生児は、出生時（哺育0日）に、雌雄別に産児数（生存児+死亡児）を調べ、分娩率「(産児数/着床痕数) $\times$ 100,%」、生児出産率「(出生産生児数/着床痕数) $\times$ 100,%」および出生率「(出生産生児数/産児数) $\times$ 100,%」を算出した。生存児については性比「雄生児数/総生児数」を算出、および外表奇形の有無を観察した。哺育期間中は、毎日、一般状態を観察し、哺育0、4、7、14日には各腹雌雄別の合計体重を測定、また、哺育21日には個体別に体重を測定した。

なお 哺育4日に同腹児の調整（原則として1腹当り雌雄各4匹に調整）を行った。

##### 2) 胃内ミルク中のTBDD濃度の測定

10 $\mu$ g/kg群の3腹について 同腹児の調整で間引かれた児動物を、エーテル麻酔下で放血死させ、胃内に残存する乳汁を採取し、腹毎にプールしてTBDDの未変化体濃度を測定した。濃度測定は 島津テクノリサーチ(株)に依頼した。

##### 3) 肛門生殖器間距離(AGD)の測定

哺育4日の同腹児の調整後、哺育を継続する

全児動物について、肛門生殖器間距離(AGD 生殖隆起後端と肛門前端的距離)を測定した。

また、AGD を測定した児動物の体重を測定し、体重補正值「 $AGD/\sqrt[3]{\text{体重}}$ 」を算出した。

#### 4) 行動発達および身体発達の検査

生存している全ての児について、行動発達検査の指標として背地走性(哺育9日)と空中正向反射(哺育18日)を、また、身体発達検査の指標として歯牙の萌出(哺育9日から13日)、眼瞼の開裂(哺育12日から17日)および乳頭の有無(哺育12日)の観察を行った。

#### 5) 剖検

児動物は哺育21日に、エーテル麻酔下で腹大動脈から採血後、放血致死させ解剖し、器官・組織の肉眼観察を行った。

#### 6) 肝臓中のTBDD濃度の測定

剖検後、 $1\mu\text{g}/\text{kg}$  群および  $10\mu\text{g}/\text{kg}$  群の各3腹雌雄各1匹の児動物について肝臓を採取し、重量測定後、 $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。これらの組織中のTBDD未変化体濃度は、島津テクノリサーチ(株)に依頼して測定した。

#### 7) 肝臓中の誘導酵素量の測定

肉眼観察の終了後、各群1腹当り雌雄各1匹の児動物の肝臓を採取し、重量を測定したのちKCl溶液で還流し液体窒素で凍結後、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存し次の誘導酵素を測定した。

- ・ Ethoxycoumarin O-deethylase(ECOD)
- Ethoxyresorufin O-deethylase(EROD)
- A<sub>1</sub>yl hydrocarbon hydroxylase(AHH)
- Uridine phosphate glucuronyl transferase (UDP GT)

なお、これらの酵素活性は(株)三菱化学安全科学研究所に依頼して測定した。

#### 8) 臓器重量測定および臓器保存

1腹当り雌雄各2匹の児動物について、脳、下垂体、甲状腺、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、精巣上体、子宮、卵巣(卵管を除く)、腹側前立腺、精嚢、骨髄(大腿骨)、腸間膜リンパ節を採取した。脳、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、精巣上体、子宮、卵巣(卵管を除く)は湿重量を測定後、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定保存した。また、腹側前立腺と精嚢は10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定後、周囲組織から切り離し、湿重量を測定し、再度、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定保存した。

なお、動物の最終体重に対する各臓器の湿重量の比率(体重比)も算出した。

#### 9) 病理組織学検査

1腹当り雌雄各1匹の児動物について、採取固定後の脳、下垂体、甲状腺、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、精巣上体、子宮、卵巣、腹側前立腺、精嚢、骨髄(大腿骨)、腸間膜リンパ節を切り出し、常法に従ってパラフィン切片とし、ヘマトキシリン-エオジン染色を行って病理組織標本を作製し、光学顕微鏡で病理組織学検査を行った。

#### 10) 血液学検査および血液生化学検査

1腹当り雌雄各1匹の児動物について、解剖時に採血した血液を用いて血液学検査および血液生化学検査を行った。血液学検査は、総合血液学検査装置(ADVIVA 120 ハイエル社)および血液細胞自動分類装置(MICROX HEG 120NA オムロン(株))により赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、平均赤血球ヘモグロビン量、平均赤血球ヘモグロビン濃度、血小板数、網赤血球比、白血球数および白血球分類を測定した。血液生化学検査は自動分析装置(日立7070(株)日



立製作所)により 総蛋白、アルブミン、総ヒ  
リルビン、グルコース、総コレステロール、リ  
ン脂質、尿素窒素、無機リンの各濃度と A/G  
比、および GOT、GPT、LDH、ALP、 $\gamma$ -GTP、  
CPK の各活性値を測定した。

#### 11) 血清中の甲状腺ホルモン濃度の測定

1 腹当り雌雄各 2 匹の児動物について、解剖  
時に採血した血液を用いて、血清中の甲状腺ホ  
ルモン濃度の測定を行った。検査は ARVO<sub>SX</sub> マ  
ルチラヘルカウンターにより、Triiodothyronine  
(T3)、Thyroxin (T4)、Thyroid-Stimulating  
Hormone (TSH) の各濃度を測定した。

#### 6 サテライト動物の設定

妊娠動物と未妊娠動物の組織中 TBDD 濃度の  
経時的変化を比較するために、妊娠雌を 3 匹、未  
妊娠雌(処女雌)を 9 匹用意した。妊娠雌の 3 匹  
は妊娠 8 日の投与 2 日後(妊娠 10 日)に、処女  
雌の 9 匹は、投与 2 日後、12 日後(妊娠雌の妊  
娠 20 日に相当) および 35 日後(分娩後 21 日に  
相当)に、エーテル麻酔下で放血致死させ、肝臓  
と脂肪組織を採取し、重量を測定後、 $-20^{\circ}\text{C}$ で凍  
結保存した。これらの組織中の TBDD 未変化体  
濃度は、島津テクノリサーチ㈱に依頼して測定し  
た。

#### 7 統計解析

体重、臓器重量、血液学検査、血液生化学検査  
及びホルモン検査などの各データは、最初に  
Bartlett 法により等分散の予備検定を行い、等分  
散の場合には一元配置分散分析を行い、群間に有  
意差が認められた場合は Dunnett の多重比較に  
より平均値の差の検定を行った。また、分散の等  
しくない場合には、各群を通して測定値を順位化  
して Kruskal Wallis の順位検定を行い、群間に  
有意差が認められた場合には Dunnett 型の多重  
比較を行った。

胎児の外表、骨、内臓異常の発生数については、  
 $\chi^2$ 検定を対照群と各投与群間で行った。

各検定は 5%の有意水準で両側検定を行い、  
検定結果を表示する場合には 5%及び 1%の有  
意水準の表示を行った。

#### (倫理面への配慮)

- ① 本研究は、動物愛護の観点から当センターの  
「動物実験に関する指針」に基づき実施した。
- ② 本研究は、研究者の安全衛生対策及び周囲環境  
の汚染防止の観点から、「特定化学物質  
(2,3,7,8-TBDD)安全管理規定」及び「特定化  
学物質(2,3,7,8-TBDD)の取扱い管理指針」に  
基づき実施した。

#### C 研究結果

##### 1 母動物への影響

###### 1) 生存状況および一般状態

100 $\mu\text{g}/\text{kg}$  群で妊娠期間に 2 匹の母動物が死亡  
した。死亡した 2 匹は死亡前に排便量が減少し、  
自発運動量の減少が観察された。

解剖日まで生存した動物については一般状態  
の異常は観察されなかった。

###### 2) 体重 (TABLE 1)

100 $\mu\text{g}/\text{kg}$  群に体重増加の抑制がみられ、妊娠  
期および哺育期を通して有意な低値を示した。

10 $\mu\text{g}/\text{kg}$  以下の群には有意差は認められな  
かった。

###### 3) 血液学検査所見 (TABLE 2)

帝王切開用動物では、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$  以上の群にプ  
ロトンヒン時間 (PT)、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$  群に活性化

部分トロンボプラスチン時間 (APPT) の有意な短縮が認められた。また、100 $\mu$ g/kg 群には赤血球数、ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値の有意な増加、MCV、血小板数、白血球百分比における好酸球の比率およびフィブリノーゲン量の有意な低下が認められた。

分娩用動物では、100 $\mu$ g/kg 群に、MCV、MCH、血小板数、白血球百分比における好中球の比率および好酸球の比率の有意な低下、およびリンパ球の比率の有意な増加が認められた。なお、1 $\mu$ g/kg 群には、血小板数およびフィブリノーゲン量の有意な高値が認められたが、用量に対応した変化ではないため、TBDD 投与に関連した変化とは判断しなかった。

#### 4) 血液生化学検査所見 (TABLE 3)

帝王切開用動物では、10 $\mu$ g/kg 以上の群に、総ビリルビン濃度の有意な低下、総コレステロール濃度の有意な増加、および GOT 活性の有意な上昇が認められた。また、100 $\mu$ g/kg 群には、総タンパク濃度の有意な低下、GPT 活性と LDH 活性の有意な上昇、および無機リン濃度の有意な増加が認められた。なお、10 $\mu$ g/kg 群にリン脂質濃度の有意な増加が認められたか、用量に対応した変化ではないため、TBDD 投与に関連した変化とは判断しなかった。

分娩用動物では、100 $\mu$ g/kg 群に、総タンパク、アルブミン、総ビリルビン、総コレステロールリン脂質、カルシウムおよび無機リンの各濃度に有意な増加が認められた。また 同群には、GPT 活性および尿素窒素濃度の有意な低下が認められた。なお、1 $\mu$ g/kg 群にクロール濃度の有意な低下が認められたが、用量に対応した変化ではないため、TBDD 投与に関連した変化とは判断しなかった。

#### 5) 甲状腺ホルモン濃度 (TABLE 4)

帝王切開用動物では、TSH、T3、T4 の各濃

度に対照群と TBDD 投与群との間で有意差は認められなかった。

分娩用動物では、100 $\mu$ g/kg 群に TSH 濃度の有意な減少と T3 濃度の有意な増加が認められた。

#### 6) 剖検所見

TBDD 投与に起因した異常は観察されなかった。

#### 7) 臓器重量 (TABLE 5)

帝王切開用動物では、10 $\mu$ g/kg 以上の群において胸腺の湿重量および体重比が有意な低値を示した。また、100 $\mu$ g/kg 群において脾臓の湿重量が有意な低値を示した。なお、脳および下垂体の体重比が有意な高値を示したが、これは体重の低値に対応した変化と判断した。

分娩用動物では、100 $\mu$ g/kg 群において胸腺の湿重量および体重比が有意な低値を示した。また、同群において肝臓および腎臓の湿重量が有意な低値を示した。なお、脳の体重比が有意な高値を示したが、これは体重の低値に対応した変化と判断した。

#### 8) 肝臓の病理組織学検査所見 (TABLE 6, 写真 1~6)

帝王切開用動物の肝臓には、10 $\mu$ g/kg 以上の群で、小葉中心域にある肝細胞に細胞質が虎斑状にヘマトキシリンに好染する、いわゆる好塩基性化が認められた。これに加えて、100 $\mu$ g/kg 群では小葉中心域にある肝細胞が肥大し、さらに、肝細胞の細胞質には空胞化が認められた。

分娩用動物の肝臓には 100 $\mu$ g/kg 群で小葉中心域にある肝細胞が肥大し、肝細胞の細胞質の好塩基性化と空胞化が認められ さらに肝細胞の多核化が認められた。また、炎症性細胞の集簇や繊維化も認められた。これらの変化は、10 $\mu$ g/kg 以下の群には認められなかった。

100 $\mu$ g/kg 群の分娩用動物の肝臓を電子顕微鏡レベルで観察すると、粗面小胞体の凝集や細胞内小器官密度の低い領域が認められた。

## 9) 分娩および哺育状態 (TABLE 9)

分娩用動物の対照群、1 $\mu$ g/kg 群および10 $\mu$ g/kg 群の全動物は生存児を分娩したが、100 $\mu$ g/kg 群の全動物に生存児の分娩は認められなかった。100 $\mu$ g/kg 群の分娩の直接観察かてきた例では、産児はすべて死亡しており、また、親が食殺している状況も観察てきた。産児の存在を確認てきなかった動物もいたが、母動物の膣口からの出血痕、腹囲の減少および体重の著しい低下は、児動物が分娩されたことを示していた。なお、100 $\mu$ g/kg 群以外の動物には分娩状態および哺育状態に異常は認められなかった。

100 $\mu$ g/kg 群の妊娠期間は他の群に比較して有意な増加を示した。

## 2 胎児への影響

### 1) 生死および重量 (TABLE 7)

胚 胎児死亡数の有意な増加が10 $\mu$ g/kg 以上の群に認められたが、着床後胚損失率の有意な増加や生存胎児数の有意な減少は100 $\mu$ g/kg 群のみに認められた。100 $\mu$ g/kg 群の胚 胎児死亡の多くは胎盤遺残として認められたか、浸軟胎児も多く認められた。また、100 $\mu$ g/kg 群の雌雄ともに生存胎児数は有意に低下したか、性比に有意差は認められなかった。生存胎児の重量や胎盤重量も有意に低下した。

### 2) 形態観察所見 (TABLE 8, 写真9~12)

#### <外表観察>

100 $\mu$ g/kg 群て外表異常のみられた胎児の総数およびその母動物の総数に有意な増加が認められた。

異常 100 $\mu$ g/kg 群に全身性浮腫あるいは口蓋裂が観察された胎児の有意な増加が認められた。

また、これらの外表異常が観察された胎児かいた母動物の有意な増加も認められた。10 $\mu$ g/kg 以下の投与群および対照群の胎児に上記の外表異常は認められなかった。

#### <内臓観察>

100 $\mu$ g/kg 群て内臓奇形、10 $\mu$ g/kg 以上の群には内臓変異がみられた胎児の総数およびその母動物の総数に有意な増加か認められた。

奇形 100 $\mu$ g/kg 群に水腎症あるいは心室中隔欠損が観察された胎児の有意な増加が認められた。また、これらの内臓奇形が観察された胎児かいた母動物の有意な増加も認められた。100 $\mu$ g/kg 群の1匹の胎児には横隔膜ヘルニアも観察された。10 $\mu$ g/kg 以下の投与群および対照群の胎児に上記の内臓奇形は認められなかった。

変異 10 $\mu$ g/kg 以上の群に胸腺位置異常あるいは左臍帯動脈が観察された胎児の有意な増加が認められた。また、100 $\mu$ g/kg 群には脾臓小型化あるいは腎盂拡張化が観察された胎児の有意な増加が認められた。腎盂拡張化を除いて、これらの内臓変異か観察された胎児をもつ母動物も有意な増加を示した。

#### <骨格観察>

1 $\mu$ g/kg 群と100 $\mu$ g/kg 群に骨格変異かみられた胎児の総数が有意な増加を示したか、母動物の総数には有意差はなかった。

奇形 骨格奇形は全投与群および対照群ともに認められなかった。

変異 100 $\mu$ g/kg 群に胸椎体のダンヘル状骨化あるいは2分骨化が観察された胎児の有意な増加が認められた。また、これらの骨格変異か観察された胎児をもつ母動物の有意な増加も認められた。また1 $\mu$ g/kg 群ては有意に増加した特定の変異はなかった。

骨化遅延 100 $\mu$ g/kg 群ては胃化遅延のみられ

た胎児数とその母動物数が有意に増加した。骨化遅延のみられた部位は外後頭骨と頸椎弓で、両部位ともに有意な増加を示した。また、骨化仙尾椎数の有意な減少も認められた。

### 3 出生児への影響

#### 1) 生存状況および一般状態 (TABLE 9)

100 $\mu$ g/kg 群の母動物が分娩した児動物の中に、生存が確認された児動物はいなかった。対照群および 10 $\mu$ g/kg 以下の投与群では全母動物から生存児の出生が認められ、出生児数や分娩率に有意な差は認められなかった。ただし、対照群と 10 $\mu$ g/kg 群の各 1 腹では出生生児数が著しく低値であったため、出生率、哺育 0 日の生存率および哺育 4 日の平均生存率が低値を示したが、有意な差はなかった。また、10 $\mu$ g/kg 群の出生生児数が著しく低値であった 1 腹の全児動物は、哺育期間中成育が悪く、離乳時までに全児が死亡した。

#### 2) 体重 (TABLE 10)

哺育期間中の児動物の体重は、10 $\mu$ g/kg 群において全期間を通して平均値が低値であったが、有意な差は認められなかった。

#### 3) 肛門生殖器間距離(AGD) (TABLE 11)

哺育 4 日における雌雄児動物の AGD に、有意な差は認められなかった。

#### 4) 行動発達および身体発達 (TABLE 12)

行動発達検査の指標として実施した背地走性と空中正向反射に異常は認められなかった。

身体発達検査の指標として観察した項目のうち、歯牙の萌出の完成は 10 $\mu$ g/kg 群の雌雄ともに早期に認められ、雄では有意差が認められた。また、眼瞼の開裂の完成も 10 $\mu$ g/kg 群の雌雄ともに早期に認められ、雌雄ともに有意差が認められた。眼瞼の開裂は 1 $\mu$ g/kg 群の雌雄にもやや

早期化の傾向が認められた。なお、乳頭の有無については雌雄ともに異常は認められなかった。

#### 5) 剖検所見

10 $\mu$ g/kg 群の雄 1 匹で精巣の小型化が片側にみられたが、他の動物には肉眼的な変化はみられなかった。

#### 6) 血液学検査所見 (TABLE 13)

雄では、10 $\mu$ g/kg 群で赤血球数、血小板数、白血球数および白血球球分類比における好酸球比の有意な低下とリンパ球比の有意な増加が認められた。

雌では、10 $\mu$ g/kg 群で MCHC および白血球数の有意な低下が認められた。

#### 7) 血液生化学所見 (TABLE 14)

雄では、1 $\mu$ g/kg 以上の群で GPT 活性の有意な低下が認められた。

雌では、1 $\mu$ g/kg 以上の群で GPT 活性の有意な低下、10 $\mu$ g/kg 群で CPK 活性の有意な低下が認められた。なお、1 $\mu$ g/kg 群で BUN 濃度の有意な低下が認められたが、用量に対応した変化ではないため、TBDD 投与に関連した変化とは判断しなかった。

#### 8) 甲状腺ホルモン濃度 (TABLE 15)

雄では、10 $\mu$ g/kg 群で TSH 濃度の有意な増加、T4 濃度の有意な低下が認められた。

雌では、10 $\mu$ g/kg 群で T4 濃度の有意な低下が認められた。1 $\mu$ g/kg 群で T3 濃度の有意な低下が認められたか、用量に対応した変化ではないため TBDD 投与に関連した変化とは判断しなかった。

#### 9) 臓器重量 (TABLE 16)

雄では、1 $\mu$ g/kg 以上の群において肝臓の体重比が有意な高値を示し、10 $\mu$ g/kg 群では湿重量

も有意な高値を示した。また、10 $\mu$ g/kg 群では腎臓の体重比が有意な高値を示し、前立腺の湿重量と体重比が有意な低値を示した。

雌では、1 $\mu$ g/kg 以上の群において肝臓の湿重量と体重比が有意な高値を示した。また、10 $\mu$ g/kg 群では腎臓および子宮の体重比が有意な高値を示した。

#### 10) 病理組織所見 (TABLE 17, 写真 7,8)

雌雄ともに、10 $\mu$ g/kg 群において、肝細胞の細胞質に空胞化が認められた。

他の臓器には、TBDD 投与による変化は認められなかった。

#### 11) 肝臓の酵素活性 (TABLE 18)

ECOD、EROD、AHH および UDPGT の各活性は、雌雄ともに 1 $\mu$ g/kg 以上の群で有意な上昇が認められた。

### 4 TBDDの組織中濃度

#### 1) 処女雌と妊娠 出産雌の組織中濃度推移の比較 (TABLE 19)

肝臓 TBDD10 $\mu$ g/kg 投与 2 日後 (妊娠 10 日) の肝臓 1g 当りの TBDD 濃度は、処女雌と妊娠雌ともにほぼ同であった。しかし、投与 12 日後 (妊娠 20 日) の濃度は、処女雌では投与 2 日後の約 50% に、妊娠雌では投与 2 日後の約 10% に低下した。さらに、投与 35 日後 (哺育 21 日) の濃度は、処女雌では投与 12 日後の約 34% に、妊娠雌では投与 12 日後の約 10% に低下した。また 投与 2 日後の濃度と比較すると、処女雌では約 17% に、妊娠雌では約 1% に低下した。

脂肪 TBDD10 $\mu$ g/kg 投与 2 日後 (妊娠 10 日) の脂肪 1g 当りの TBDD 濃度は 処女雌と妊娠雌ともにほぼ同であった。しかし 投与 12 日後 (妊娠 20 日) の濃度は、処女雌では投与 2 日後の約 263% に、妊娠雌では投与 2 日後の約 132% に上昇した。投与 35 日後 (哺育 21 日)

の濃度は、処女雌では投与 12 日後の約 51% に、妊娠雌では投与 12 日後の約 82% に低下した。また、投与 2 日後の濃度と比較すると、処女雌では約 135%、妊娠雌では約 108% であった。

肝臓/脂肪比 TBDD10 $\mu$ g/kg 投与 2 日後 (妊娠 10 日) の肝臓/脂肪比は、処女雌と妊娠雌ともにほぼ同であった。しかし、投与 35 日後 (哺育 21 日) は、投与 2 日後の値と比較すると、処女雌では約 1/10 に、妊娠雌では約 1/100 であった。

#### 2) 子宮内胎児の組織中濃度 (TABLE 20)

子宮内胎児の全身 1g 当りの TBDD 濃度は、母動物への投与量比にほぼ対応して増加した。

子宮内胎児の肝臓 1g 当りの TBDD 濃度は、1 $\mu$ g/kg 群と 10 $\mu$ g/kg 群では投与量比にほぼ対応していた。しかし、100 $\mu$ g/kg 群の濃度は、投与量比と相関しておらず、高い値を示した。

TBDD10 $\mu$ g/kg を投与した母動物とその胎児の肝臓 1g 当りの TBDD 濃度を比較すると、胎児の濃度は、母動物の約 5% であった。

#### 3) ミルク中の濃度 (TABLE 21)

TBDD10 $\mu$ g/kg を投与した母動物から出生した哺育 4 日の児動物の胃中ミルク 1g 当り 平均 2.3ng の TBDD が検出された。

#### 4) 21 日齢児の肝臓中濃度 (TABLE 21)

TBDD10 $\mu$ g/kg 群の 21 日齢児の肝臓 1g 当りの TBDD 濃度は、1 $\mu$ g/kg 群の濃度の約 30 倍の値を示し、雌雄差は認められなかった。

また、10 $\mu$ g/kg 群の 21 日齢児の肝臓 1g 当りの TBDD 濃度は、雌よりも雄で高い傾向が認められた。

TBDD10 $\mu$ g/kg 群の肝臓 1g 当りの TBDD 濃度は、その母動物の肝臓の濃度と比較して、雄では約 26 倍、雌では約 23 倍であった。10 $\mu$ g/kg 群の胎児肝臓の濃度と比較すると、50 倍以上の濃度であった。

## D 考察

### 1 TBDDの次世代への移行

ラットに投与されたTBDDは、TCDDと同様に、主に肝臓と脂肪組織に蓄積され、糞中に主に排泄される(Nagao et al 1996, Abraham et al 1989, Keddens et al 1991<sup>a</sup>)。ラットにおけるTBDDの算出半減期は、肝臓では12~27日、脂肪組織では58日、肝臓からの排泄はTCDDに比べて早いか、あるいは同してあり、脂肪組織からの排泄はTCDDに比べて非常に遅いと報告されている(Ivens et al 1990, Keddens et al 1991<sup>a</sup>, Nagao et al 1996)。前年度の研究結果も、ラット肝臓中のTBDDの算出半減期は11-15日であることを示した。これらの研究から、TBDDはラットに1回投与されることにより、長期間にわたって体内に残存していることが判明した。そこで、まず初めに、妊娠8日のラットおよび同じ週齢の処女ラットにTBDDを経口投与し、その後のTBDD組織中濃度を経時的に測定し、両者を比較した。なお、ラットの妊娠8日は着床胚が形成期に入る時期に相当する(谷村 1989)ため、TBDDが母親から胎盤を介して胚・胎児に、さらに、乳汁を介して乳児に移行する現象をみるのには適切な投与時期であると言える。投与2日後(妊娠10日)の妊娠ラットと処女ラットの肝臓1g当りのTBDD濃度に違いはなかったが、投与12日後(妊娠20日)の妊娠ラットの濃度は、処女ラットに比較して低く、投与35日後(哺育21日)においては、妊娠ラットの濃度は処女ラットの約6%にまで低下していた。投与2日後の肝臓1g当りのTBDD濃度と比較すると、処女ラットでは肝臓からTBDDの約83%が排泄されたのに対し、妊娠哺育ラットでは約99%が排泄された。すなわち、妊娠哺育中のラット肝臓からのTBDD排泄は、著しく速いことが証明された。

一方、脂肪組織中のTBDD濃度の時間的推移は肝臓での推移とは異なる動態を示した。投与2日

後(妊娠10日)の妊娠ラットと処女ラットの脂肪1g当りのTBDD濃度に違いは認められなかったが、投与12日後(妊娠20日)には、妊娠ラットと処女ラットともに投与2日後(妊娠10日)に比較して脂肪中の濃度は増加し、その値は処女ラットの方が高かった。投与35日後(哺育21日)には、哺育ラットと処女ラットともに脂肪中のTBDD濃度は低下したか、投与2日後よりもまだ高い値であった。ただし、投与12日後(妊娠20日)からの脂肪からのTBDDの排泄は、処女ラットのほうが多かった。すなわち、ラットに投与されたTBDDの脂肪への蓄積は、肝臓に比較して時間を要し、また、妊娠中の脂肪への蓄積量は未妊娠状態と比較して少ないことが示された。肝臓と脂肪組織中のTBDD濃度の時間経過を肝臓/脂肪比に換算して比較すると、処女ラットに比べて妊娠・哺育ラットの肝臓/脂肪比の低下が大きく、特に、投与35日後(哺育21日)には哺育ラットは処女ラットの約1/10になっていた。これらの結果が示すことは、ラットでは妊娠哺育中の体内からのTBDD排泄は、主に肝臓から行われるということである。

妊娠・哺育動物の体内からのダイオキシン類の排泄は、糞中だけでなく、胎盤や乳汁を介しての排泄、すなわち次世代に移行することで母親の体内から除去されることが知られている(Nau et al 1981, Van Den Berg et al 1987, Schecter et al 1996)。妊娠8日にTBDDを投与したラットを妊娠20日に帝王切開して胎児を摘出し、胎児全身および胎児肝臓中のTBDD濃度を測定した結果、母ラットへのTBDD投与量に対応して胎児全身および胎児肝臓中のTBDD濃度が増加した。胎児肝臓/胎児全身比からもわかるように1 $\mu$ g/kgのTBDDを母動物に投与した場合の胎児肝臓中のTBDD濃度は胎児全身の濃度よりやや低い値であった。しかし、10 $\mu$ g/kgの投与では胎児肝臓中のTBDD濃度は胎児全身の濃度よりやや高い値を呈した。さらに、母動物へ100 $\mu$ g/kgのTBDDを

投与した場合は、胎児肝臓中のTBDD濃度は胎児全身の約6倍の値を示した。TCDDあるいはTBDDの成熟ラットへの投与後の体内分布は、投与濃度に対応して、肝臓中に分布、蓄積する割合が高くなると言われている (Abraham et al 1988, Kedderis et al 1991<sup>a</sup>) か、胎盤通過後の胎児組織分布においても、この現象が認められた。ただし、母親にTBDD10 $\mu$ g/kgを投与したときの胎児肝臓中のTBDD濃度は、そのときの母親の肝臓中の濃度の約5%にしかすぎなかった。Nauら (1981) は、TCDDを妊娠マウスに投与し、母マウス肝臓と胎児肝臓中のTCDD濃度を比較したところ、胎児肝臓中のTCDD濃度は母肝臓中の濃度の約4%であったと報告している。使用した動物種は異なるものの、母親に蓄積したTBDDあるいはTCDDが胎児に移行する量はそれほど多くはなく、胎盤バリアが強く働いていることが示唆された。

ヒトの母親の体内に蓄積しているダイオキシン類は、乳汁を介して児に移行される (Tsutsumi et al 2000)。現在のダイオキシン類の1日耐用摂取量 (TDI) は、日本では4pg/kg/dayと定められているのに対し、母乳中のダイオキシン類量は、50-100pg/kg/dayとTDIをはるかに超えている (Tsutsumi et al 2000)。よって、母乳から乳児へのダイオキシンの移行が、児の生体に様々な障害をおよぼす危険性があることが危惧されている (Feeley et al 2000, Tsutsumi et al 2000)。そこで本研究では TBDD10 $\mu$ g/kgを投与した母ラットの哺育4日目の乳汁を集めてTBDDの検出を試みたところ、乳汁1g当たり平均2.3ngという高濃度のTBDDが検出され、母親の体内に蓄積したTBDDが乳汁を介して児へ移行することが証明された。TBDDを含む乳汁で育てられた児について 哺育終了時 すなわち21日齢に肝臓を摘出しTBDD濃度を検査した。すると、児動物の肝臓中のTBDD濃度は 胎児肝臓の濃度と比較した場合母ラットへのTBDD1 $\mu$ g/kg投与で約26倍

10 $\mu$ g/kg投与で約53倍に増加、濃縮されていた。また、それはTBDD10 $\mu$ g/kgを投与した母ラットの哺育21日目の肝臓1g当りのTBDD濃度の約25倍であった。哺育をした母ラットの肝臓中のTBDDがほとんど排泄されたのに対して、その児動物の肝臓の濃度は非常に高い値を示した。これらの結果は、TBDDの母親から次世代への移行は、胎盤を介してよりも、乳汁による量が多いことを示していた。西村ら (2002) の研究によると、TCDDを投与した母ラットに哺育された生後21日齢の児の肝臓中TCDD量は、生後49日齢では激減したと報告している。本研究では 離乳後の児動物の飼育を継続していないため、検査できなかったが、同様に推移するものと推測される。

Van Den Bergら (1987) は、妊娠18日の母ラットの肝臓中TCDD濃度と哺育10日の母ラットの肝臓中濃度はほとんど同しかったか、脂肪中の濃度は哺育ラットで低下することから、児へのTCDD移行は母親の脂肪組織から乳汁を介して移行すると報告している。これに対し、本研究において妊娠 哺育中のラット体内からのTBDD排泄は、主に肝臓から行われていることが確認されていることから、児へのTBDD移行は母親の肝臓から乳汁を介して移行することが示唆された。TBDDはTCDDに比較して脂肪中の半減期が長いという性質 (Nagao et al 1996) と関連しているのかも知れない。

## 2 TBDDによるラット胎児の催奇形作用

TCDDを用いた以前の研究での最も特徴的な影響は、マウスにみられる強い催奇形作用、特に母親に影響がみられない投与量において胎児に口蓋裂や水腎症が誘発されることであった (Neubert et al 1973)。TCDDによるマウスの催奇形性実験は その後も多く報告されている。TBDDの催奇形作用については、マウスを用いた催奇形性実験で TCDDと同様に、母体毒性がほとんど認められず、かつ、胎児死亡のみられない

投与量で口蓋裂や水腎症を誘発することが認められ、マウスにおけるTBDDの催奇形作用はTCDDの約1/2であると報告されている（Nagao et al 1990<sup>b</sup>, Birnbaum et al 1991）。一方、TCDDのSDラットを用いた催奇形性実験（Sparschu et al 1971）では、TCDDを0.03, 0.125, 0.5, 2.0及び8.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重の用量で、妊娠6日から15日に毎日経口投与した結果、0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量では胎児に全く影響はなかったが、0.125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で皮下の浮腫や腸管出血がみられるようになり、0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ から生存胎児数が低下、8.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ では全胎児が死亡、さらに母親にも毒性影響が認められた。しかしながら、マウスで報告されたような口蓋裂や水腎症の増加はなかった。TBDDのラットを用いた催奇形性実験はこれまでに報告されておらず、本研究でラットを用いた催奇形性実験を行った結果、以下のような結果が得られた。妊娠8日のラットへ体重1kg当り100 $\mu\text{g}$ のTBDDを経口投与したことにより、妊娠20日の帝王切開時に多くの胎児の死亡が確認され、また、生存胎児では体重の低値が認められた。生存胎児の外表、内臓および骨格の形態観察から、TBDDはラットに全身浮腫、口蓋裂、水腎症および心室中隔欠損の奇形を誘発した。なお、骨奇形は認められなかった。この投与量は25匹中2匹の母親を死亡させ、また、母親の体重増加の抑制も顕著である用量であった。母親に死亡や体重低下がみられなかった10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重の用量では、胎児の死亡は僅かに増加し、生存胎児には内臓の変異の増加はみられたが、胎児体重の低値や奇形は認められなかった。1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重の用量では、母親および胎児ともに影響はみられなかった。すなわち、TBDDは母毒性がみられる用量で胎児致死作用を認め、また催奇形作用も認めることが確認できた。Sparschuら（1971）がラットを用いて行ったTCDDの投与実験では、1日0.125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の10日間の投与、体内総摂取量に換算すると1.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の投与量から胎児に変化がみられるよ

うになり、体内総摂取量5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上で胎児の死亡がみられるようになる。本研究の胎児の変化は10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上でみられるようになったことから、マウスでの催奇形性実験結果に類似して、ラットでのTBDDの催奇形性作用はTCDDよりも弱く、TCDDの1/2以下であることが示唆された。しかし、本研究ではSparschuら（1971）によるTCDDでのラットを用いた催奇形性実験ではみられなかった水腎症や口蓋裂の発生も増加し、ラットへのTBDD投与により認められる奇形のタイプがTCDDやTBDDを投与したマウスでの結果と類似していることが示唆された。また、TCDDの投与はマウスに骨奇形を誘発しない（Birnbaum et al 1989）という結果とも一致していた。本研究では、先に述べたように母親に投与したTBDDの胎児および胎児肝臓中に移行したTBDD量を測定している。胎児死亡、あるいは胎児奇形がみられた投与量の胎児のTBDD濃度は胎児1g当り約1ng、肝臓1g当りでは約7ngであった。また、胎児奇形は誘発されなかったが、変異が認められたTBDD濃度は、胎児および肝臓1g当り、約0.1ngであった。胎児および肝臓1g当り、約0.01ngでは胎児に影響はみられなかった。

### 3 乳汁を介してTBDDを摂取した児にみられた変化

動物実験では、ダイオキシンの毒性は、発がん性、生殖発生毒性、皮膚障害、ホルモン代謝異常、免疫抑制など多岐にわたって認められているがその毒性は種差や系統差が大きく、また、ヒトはダイオキシンに対して感受性が低い動物種であるとみなされている（Jana et al 1998）。これはヒトの疫学調査においてダイオキシンとその影響を明確に関連付けるような証拠は得られていないことから言える。しかし、ヒトでの疫学調査の中には、母親の血中あるいは母乳中のダイオキシンとその子供でみられた影響との関連性を疑うような報告もみられる。日本での調査で



は、母乳中のタイオキシンの量と乳児の血清中T4値やTSH値との間に関連性が疑われると報告されている (Nagayama et al 1998)。また、オランダの調査では、タイオキシンの経胎盤あるいは乳汁を介して、児の単球や顆粒球が減少したり、Tリンパ球分類比が変化、さらに、母親の母乳中のダイオキシン類の濃度が高いグループでは子供の認知能力が低下したと報告されている (Lanting et al 1998, Patandin et al 1999)。

先に述べたように、本研究において、母ラットに投与されたTBDDは胎盤を経由し、特に乳汁を介して次世代に移行することが示された。TCDDを用いて行った母動物に投与されたダイオキシンが児に与える影響に関する研究報告は多い。しかし、母親へのTBDD投与による出生児への影響をみた研究報告はまだない。そこで、TBDDによる出生児への影響を検査したところ、以下のような結果が得られた。

#### (1) 乳児の身体・行動発達への影響

胎児死亡および奇形のみられたTBDD 100 $\mu$ g/kgを投与した母親から生まれた児は、すべて死亡していた。10 $\mu$ g/kgおよび1 $\mu$ g/kgを投与した母動物から生まれた児の数、外表および体重には影響はみられず、乳児の生存状況や体重推移にもTBDD投与によると判断できるような明らかな変化はみられなかった。また、肛門生殖器官距離や行動発達の指標として実施した背地走性と空中正向反射に変化はなかった。しかし、TBDD10 $\mu$ g/kgを投与した母親から生まれた児では、眼瞼開裂および上顎切歯萌出の完成がわずかに早まることが示された。特に、眼瞼開裂の完成はTBDD1 $\mu$ g/kgを投与した母親から生まれた児においても早まる傾向が示された。タイオキシン暴露による眼瞼開裂の早期完成は、Mablyら (1992a) は妊娠15日のHoltzmanラットにTCDD10 $\mu$ g/kg体重を単回経口投与した母親から生まれた児で観察されており、また、Grayら

(1997) は、妊娠15日のLong EvansラットにTCDD0.05 $\mu$ g/kg体重を単回経口投与した母親から生まれた児で認められたと報告している。ただし、本研究を含めて、何れの報告でも僅かな早期化が認められたに過ぎなかった。なお、上顎切歯萌出の完成が早まることについての報告はない。

#### (2) 肝ミクロゾーム酵素の誘導と甲状腺ホルモン濃度

タイオキシンはAhレセプターと結合した後に、薬物代謝酵素系のチトクロームP450 (CYP1A1や1A2) やUDP glucuronosyl- transferase (UDPGT) を誘導し、毒性を発現する (Andersen et al 1997, Kedderis et al 1991b)。TCDDあるいはTBDDを投与したときの肝臓のEROD活性は、類似していると報告されている (Nagao et al 1990a, Schulz-Schalge et al 1991)。また、Ivensら (1993) は、TBDDのラットを用いた亜慢性投与実験においてTBDD投与によりUDPGTの活性が亢進することを示した。先に述べたように本研究では、TBDDを投与した母親に哺育された生後21日齢の肝臓中のTBDD量が非常に高いことを示した。21日齢児の剖検の結果 母親への1 $\mu$ g/kgの投与により、児には肝臓の重量増加や、EROD、ECOD、AHH及びUDPGTの活性の亢進が認められた。母親への10 $\mu$ g/kgの投与では、児には組織学的に肝細胞の細胞質に空胞が認められたか、壊死などの不可逆的変化はみられなかった。また、血液生化学検査でもGOT活性に変化はなく、GPT活性には低下が認められた。西村ら (2002) はTCDDを投与した母親からの授乳により哺育された21日齢児の肝臓中のTBDD量は、離乳した後の49日齢には激減し、また、ミクロゾーム酵素活性も低下したと報告している。先に述べたようにラット肝臓中からのTBDDの排泄速度は速いため、離乳後には児の肝臓からTBDDは激減し、酵素活性も正常値に近づくものと推測される。

しかし、離乳前の乳児におけるUDPGTの活性の亢進は、児の発育、特に脳の発育に問題が生じる恐れがある。肝臓のミクロゾーム酵素のUDPGTは、甲状腺ホルモンの代謝、排泄に重要な役割を担っている。すなわち、UDPGT活性の亢進は結果的に血中のT4濃度を減少させる。成熟ラットへのTCDD投与が甲状腺に形態的、機能的変化を起し、また、UDPGT活性を亢進させ、血中T4の低下を起すことが報告されている (Van Birgelen et al 1995, Sewall et al 1995, Nishimura et al 2002)。TBDDでも同様な影響がみられることが報告され (Ivens et al 1992, 1993)、また、前年度の研究においてもTBDD投与による血中T4の低下がみられている。Seoら (1995) は、PCBを含むダイオキシン類を妊娠ラットに投与し、哺育された児の甲状腺機能への影響を検査したところ、離乳児のUDPGT活性は亢進し、T4濃度は減少したと報告している。本研究では母親へのTBDD1 $\mu$ g/kg以上の投与により児動物のUDPGT活性が亢進し、10 $\mu$ g/kgの投与では雌雄児動物のT4濃度を減少させた。また、雄児動物では、TSHの増加も認められた。ただし、血中T4濃度の低下は10 $\mu$ g/kgを投与した母ラットでは認められなかった。甲状腺ホルモンは物質代謝に関わっているのみならず、胎児期や乳児期の甲状腺ホルモン不足は、知能低下、発育遅延、神経系の異常をもたらす原因となる (Porterfield et al 1993)。そして、ダイオキシン類の摂取が児の脳の発達に影響をおよぼすことも示唆されている (MacLusky et al 1998)。ヒトでは脳の発達中に甲状腺ホルモンが低下すると重篤な知的発達障害を伴うクレチン症を引き起こすことはよく知られている。本研究結果でみられた児動物のT4濃度の減少は、今後、知能低下や神経系の異常などの障害を起す可能性を示唆していた。

### (3) 血液細胞および胸腺への影響

前年度の研究において、TBDDの成ラットへの

30 $\mu$ g/kg以上の単回経口投与により、赤血球数、白血球数および血小板数の減少がみられ、骨髄の組織学検査で造血巣の減少が認められたことから、TBDDの造血機能への影響を疑った。また、Ivensら (1992) による、TBDDの単回投与実験においても、血球パラメーターに変化がみられたと報告しているが、彼らは骨髄には組織学的変化を認めていない。本研究でTBDDを投与した母ラットでは、体重増加抑制が顕著で、また、生存児を分娩できなかった100 $\mu$ g/kgの投与量で、血小板数の減少がみられたが、赤血球数や白血球数の減少は認められなかった。しかしながら、10 $\mu$ g/kgを投与した母ラットにより授乳された児には、雄で赤血球数、白血球数および血小板数が減少、また、雌で血小板数が減少した。ただし、組織学的に、骨髄での造血巣の減少はみられなかった。母ラットでみられたのと同様に、児動物でみられた血球数の減少は、母親から移行したTBDDが児の造血機能障害を起す可能性があることを示唆していた。一方、ダイオキシン投与による造血系への影響については、主に免疫毒性として成熟ラットで研究され、また、次世代への影響として胸腺の萎縮や免疫機能の変化に関する研究報告が多くみられる (Vos et al 1998, Blaylock et al 1992, Gehrs et al 1997<sup>a,b</sup>, Nohara et al 2000)。本研究では10 $\mu$ g/kg体重の用量で母動物では胸腺重量が低下していたが、児の胸腺重量および組織学的には変化はなかった。

### (4) 生殖機能への影響

TCDDの周産期暴露が雄児動物に精子数の減少、精巣重量の低下、テストステロン濃度の低下、AGDの減少、前立腺や精嚢重量の低下などの生殖器および生殖機能への影響をおよぼすことからラットやマウスの実験で多数報告されている (Mably et al 1992<sup>a,b,c</sup>, Gray et al 1997, Faqi et al 1998, Bjerke et al 1994, Hamm et al 2000, Ohsako et al 2001, Theobald et al 1997)。

本研究は、21日齢て児の飼育を終了したため、離乳以降の性成熟等への影響をみることはできなかったが、母親にTBDD10 $\mu$ g/kgを投与したときの21日齢児の前立腺重量の低下が認められた。なお、精巣や精巣上体重量、生後4日に測定したAGDには変化はみられなかった。

また、TCDDが雌ラットやマウスの生殖機能に影響を与えることも報告されている（Theobald et al 1997, Li et al 1995, Gray et al 1995）。しかし、本研究は21日齢て児の飼育を終了したため、性成熟などへの影響は検査できなかった。母親にTBDD10 $\mu$ g/kgを投与した児の子宮相対重量が僅かに増加したが、TBDD投与と関連したものではないと推測される。なお、生後4日に測定したAGDや卵巣重量には変化はみられなかった。

## E 結論

臭素化タイオキシンのTBDDを体重1kg当たり0（溶媒対照）、1、10および100 $\mu$ g/kgの用量で、妊娠8日のWistarラット（25匹/群）に単回経口投与し、TBDDの次世代への移行、そして胚胎児および乳児への影響を調べた結果、以下の結論を得た。

### 1 次世代への移行

TBDDは、胎盤と乳汁を介して次世代に移行した。乳汁を介する移行が顕著であった。

### 2 胚胎児への影響

TBDDは、母体毒性がみられる用量（100 $\mu$ g/kg）で、強い胚致死作用と催奇形作用（全身性浮腫、口蓋裂、水腎症、心室中隔欠損）を誘発した。

### 3 乳児への影響

TBDDを母親に投与したことにより、

1) 児の上顎切歯萌出と眼瞼開裂の早期化（10 $\mu$ g/kg）。

2) 肝臓のECOD EROD、AHHおよびUDPGTの各酵素活性が高かった（1, 10 $\mu$ g/kg）。

3) 血中の甲状腺ホルモン（T4）濃度が低下した（10 $\mu$ g/kg）。

4) 赤血球数、白血球数および血小板数が減少した（10 $\mu$ g/kg）。

5) 前立腺重量が低下した（10 $\mu$ g/kg）。

なお、100 $\mu$ g/kgを投与された母親からは生存児は分娩されなかった。

以上から、TBDDは経胎盤移行により胚致死や奇形を誘発し、また、経胎盤および乳汁移行により児の身体発育や機能、脳の発育や機能、そして造血機能や生殖機能に影響をおよぼす可能性があることが示唆された。

## F 健康危険情報

なし

## G 研究発表

1 論文発表

なし

2 学会発表

なし

## H 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1 特許取得

なし

2 実用新案登録

なし

3 その他

なし

## I 参考文献

- Abraham K, Wiesmuller T, Brunner H, Krowke R, Hagenmaier H, Neubert D (1989) Elimination of various polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PCDDs and PCDFs) in rat faeces Arch Toxicol 63, 75-78
- Andersen ME, Birnbaum LS, Barton HA, Eklund CR (1997) Regional hepatic CYP1A1 and CYP1A2 induction with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin evaluated with a multi-compartment geometric model of hepatic zonation Toxicol Appl Pharmacol 144, 145-155
- Birnbaum LS, Morrissey RE, Harris MW (1991) Teratogenic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and three polybrominated dibenzofurans in C57BL/6N mice Toxicol Appl Pharmacol 107, 141-152
- Birnbaum LS, Harris MW, Stocking LM, Clark AM, Morrissey RE (1989) Retinoic acid and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin selectively enhance teratogenesis in C57BL/6N mice Toxicol Appl Pharmacol 98, 487-500
- Bjerke DL, Sommer RJ, Moore RW, Peterson RE (1994) Effects of in utero and lactational 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure on responsiveness of the male rat reproductive system to testosterone stimulation in adulthood Toxicol Appl Pharmacol 127, 250-257
- Blaylock BL, Holladay SD, Comment CE, Heindel JJ, Luster MI (1992) Exposure to tetrachloro-dibenzo-p-dioxin (TCDD) alters fetal thymocyte maturation Toxicol Appl Pharmacol 112, 207-213
- Buser H-R (1988) Rapid photolytic decomposition of brominated and chlorinated dibenzo-dioxins and dibenzofurans Chemosphere 17, 889-903
- Faqi AS, Dalsenter PR, Merker H J, Chahoud I (1998) Reproductive toxicity and tissue concentrations of low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male offspring rats exposed throughout pregnancy and lactation Toxicol Appl Pharmacol 150, 383-392
- Feeley M, Brouwer A (2000) Health risks to infants from exposure to PCBs, PCDDs and PCDFs Food Addit Contam 17, 325-333
- Gehrs BC, Riddle MM, Williams WC, Smialowicz RJ (1997<sup>a</sup>) Alterations in the developing immune system of the F344 rat after perinatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin II Effects on the fetus and the neonate Toxicology 122, 219-228
- Gehrs BC, Riddle MM, Williams WC, Smialowicz RJ (1997<sup>b</sup>) Alterations in the developing immune system of the F344 rat after perinatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin II Effects on the pup and the adult Toxicology 122, 229-240
- Gray LE, Ostby JS (1995) In utero 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters reproductive morphology and function in female rat offspring Toxicol Appl Pharmacol 133, 285-294
- Gray LE, Ostby Jr JS, Kelce WP (1997) A dose-response analysis of the reproductive effects of a single gestational dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male Long Evans Hooded rat offspring Toxicol Appl Pharmacol 146, 11-20
- Hamm JT, Sparrow BR, Wolf D, Birnbaum LS (2000) In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters postnatal development of seminal vesicle epithelium Toxicol Sci 54, 424-430
- Ivens IA, Neupert M, Loser E, Thies J (1990) Storage and elimination of 2,3,7,8-tetrabromo