

ないように細心の注意をはらった。

### C. 研究結果

1. F1a では、流産、死産、生後死亡が、対照群、30ng/kg 投与群に比較して、300ng/kg 群で多発した（詳細は、アカゲサルの交配、分娩、生存状況表、血統一覧表を参照）。しかし、F1b では、F1a で見られた顕著な差は見られなかった。

#### 2. F0 の剖検に関して

2004年1月10日と2月25日にF0サルの剖検（計10頭）を行い、TCDDの長期間（3年～）投与による影響を解析する実験を遂行した。現在も、継続して実験中であるが、これまでに得られたデータを記載する。30ng/kg, 300ng/kg 群の両方において、ウエスタンブロット法による蛋白解析において、肝臓のみならず、脳で、複数のタンパク質の異常な発現が見られた。さらに、詳細な解析を続けている。

コントロール群 3頭

サル番号 6, 12, 15

30ng/kg TCDD 投与群 4頭

19, 28, 29, 30

300ng/kg TCDD 投与群 3頭

34, 40, 57

TCDD 投与後長期（3年～）の肝臓のウエスタンブロットによる解析

TCDD 投与により、コントロール（1として倍数で示す）と有意差を認めたタンパクは、以下のとおりである。

	30ng/kg	300ng/kg
Caspase-8	2.94 倍	5.03 倍
Bad	1.41 倍	1.22 倍
EGFR	8.09 倍	3.07 倍
p-Akt	1.26 倍	2.04 倍
Bcl-x <sub>s</sub> /L	1.06 倍	2.17 倍
Akt	0.43 倍	0.72 倍

TCDD 投与後長期（3年～）の脳（扁桃体）のウエスタンブロットによる解析

TCDD 投与により、コントロール（コントロールを1として倍数で示す）と有意差を認めたタンパクは、以下のとおりである。

30ng/kg 300ng/kg

AhR	6.73 倍	8.93 倍
Arnt	4.11 倍	5.33 倍
EGFR	0.53 倍	2.24 倍
p-Akt	4.52 倍	3.34 倍
Bad	4.16 倍	4.64 倍
Akt	0.43 倍	0.72 倍
VE-cadherin	0.18 倍	0.23 倍
Raf-1	2.33 倍	1.34 倍
c-jun	1.72 倍	3.78 倍
BDNF	9.46 倍	22.13 倍
AMPK-alpha	1.69 倍	6.01 倍
PI3Lp110	3.05 倍	1.66 倍
Bad	4.16 倍	4.64 倍

TCDD 投与後長期（3年～）  
脳（中心前回）のウエスタン  
ブロットによる解析

TCDD 投与により、コントロール（コントロールを1として倍数で示す）と有意差を認めたタンパクは、以下のとおりである。

	30ng/kg	300ng/kg
CYP1A1	1.66 倍	1.38 倍
Arnt1	0.57 倍	0.25 倍
HSP60	0.82 倍	2.03 倍
p-Akt	1.10 倍	1.93 倍
Bad	0.30 倍	0.24 倍
Akt	0.43 倍	0.72 倍
VE-cadherin	0.32 倍	1.13 倍
Raf-1	1.69 倍	2.20 倍

Caspase3	0.70 倍	4.05 倍
Akt	0.78 倍	1.73 倍

#### D. 考察

F1a では、コントロールと比較して、TCDD300ng/kg 投与で、流死産、生後死が多発した。F1b を誕生させて、追試験を行った。その結果、流死産、生後死は出現したが、30ng/kg, 300ng/kg 投与での用量依存性は見られず、コントロールでも流死産および死亡が見られており、F1a のような顕著な差が見られなかった。F1a と F1b での実験結果の差の明かな原因は明瞭ではないが、F0 を対象としたタンパク質および遺伝子解析で、TCDD 投与により、多くのタンパク質が、コントロールと比較して有意に変化している実験結果を考えあわせて総合的に考察すると、F1a の実験結果を重視して研究を進める必要がある。

TCDD 投与後長期（3年～）の肝臓のウエスタンブロットによる解析

癌化に伴って（増殖能増強）誘導され则认为られている

EGFR が TCDD 特に、30ng/kg で8倍に誘導されていること、

および、病理組織学的に増殖性病変が肝臓と胆管に見られたことから、TCDD による肝臓病変、特に、F0 の癌化を *in vivo* で確認することは重要であると考えられる。細胞のアポトーシスに伴い誘導される caspase8 も 30ng/kg および 300ng/kg の TCDD で強く誘導されたことから、現在進めている 3ng/kg 投与実験の持つ意味がさらに裏付けられたと考えられる。

TCDD 投与後長期（3年～）の脳（扁桃体）のウエスタンブロットによる解析

中枢神経系（扁桃体）では、さらに多くのタンパク質が、30ng/kg TCDD 投与で誘導されており、現在進めている 3ng/kg 投与実験の持つ意味がさらに裏付けられたと考えられる。特に、興味深くかつ意義深いのは、TCDD のレセプターである AhR および Arnt が TCDD 30ng/kg, 300ng/kg 投与で顕著に誘導されており、TDI 設定の有益な情報となる可能性が高く、さらに詳細な解析を進めている。

TCDD 投与後長期（3年～）の

脳（中心前回）のウエスタンブロット

による解析

中枢神経系（中心前回）では、扁桃体と比較して、タンパク質の変動レベルは異なる。特に、300ng/kg でより強い変化が見られる。脳でも、部位により異なる反応を示す結果は、極めて興味深く、TCDD の受容体である AhR の発現様式の差による可能性も考えられる。

E. 結論

ダイオキシン類の体内動態および臓器障害性の解析を行い、より妥当性の高い TDI の設定に役立てるため、ヒトに最も近縁の霊長類であるアカゲザルを用いて、妊娠 20 日から分娩後 90 日までの期間、TCDD 初回投与後、30 日毎に初回投与の 5% 量を追加投与する実験（体内負荷量を維持する実験）では、コントロールと比較して、TCDD 300ng/kg 投与で、流死産、生後死が多発した(F1a)。そこで、F1b を誕生させて、追試験を行った。その結果、流死産、生後死は出現したが、30ng/kg, 300ng/kg 投与での用量依存性は見られず、コントロールでも

流死産および死亡が見られており、F1aのような顕著な差が見られなかった。F1aとF1bでの実験結果の差の明かな原因は明瞭ではないが、タンパク質解析で、TCDD投与により、多くのタンパク質が、コントロールと比較して有意に変化している実験結果を考えあわせて総合的に考察すると、F1aの実験結果を重視して研究を進める必要がある。

TCDD(30ng/kg および 300ng/kg)の長期投与(3年以上)の影響を解析するため、F0サルを剖検し、タンパク質レベルでの解析を行った。30ng/kg, 300ng/kg 群の両方において、肝臓および脳のタンパク質レベルでの解析をウエスタンブロット法で行った。30ng/kg および 300ng/kg 投与群の両方で多くのタンパク質が変動していた。本研究は、TCDDのヒトへの影響を、よりヒトに近いサルで行うことを考えて、TCDD30ng/kg と 300ng/kg を投与する実験を設定した。マクロレベルでは、TCDD30ng/kg と比較して、300ng/kg の影響が強く、現行のTDIは概ね妥当と考えられるが、タンパク質レベルでの解析

の結果を総合的に解析すると、30ng/kg の影響も大きいと考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Asaoka, K., Iida, H., Suzuki, J., Watanabe, K., Inoue, M., Fukusato, T., Murata, N., Nomizu, M., Nagata, R., Kubota, S. (2003) Gene expression disorder in various tissues in rhesus monkeys treated with 2,3,7,8-

tetrachlorodibenzo-p-dioxin vis subcutaneous single injection. Organohalogen Compounds 64, 423-426

### 2 学会発表

#### 国際学会

23rd International Symposium on Halogenated Organic & Persistent Organic Pollutants  
Boston, Massachusetts, U.S.A., August 24-29, 2003

Asaoka, K., Iida, H., Suzuki, J., Watanabe, K., Inoue, M., Fukusato, T., Murata, N., Nomizu, M., Nagata, R., Kubota, S. (2003) Gene expression disorder in various tissues in rhesus monkeys treated

with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-  
p-dioxin via subcutaneous single  
injection.

国内学会

S. Kubota, T. Ihara, Y. Nishida, T.  
Fukusato, N. Murata, M. Nomizu,  
H. Iida, K. Asaoka (2003) Effect of  
2,3,7,8-TCDD on gene expression  
in tissues in rhesus monkeys. 日本  
内分泌攪乱化学物質学会第 6 回研究  
発表会（平成 15 年 12 月 2-3 日、仙  
台市）講演要旨集 p.334

G 知的所有権の取得状況

なし

TCDD 投与 (control, 30 ng/kg, 300 ng/kg) アカゲザル肝臓サンプル Western blotting 結果：

1. [バンドが検出され対照群と差があったもの]

No.	一次抗体名	Cat. No.	control との差		備考
			30 ng/control	300 ng/control	
1	Ah-R	sc <sup>*</sup> -5579	2.04	0.46	50 kDa 付近のバンドのみ確認
2	EGFR (1005)	sc-03	8.09	3.07	-
3	p-Akt1/2/3	sc-7985	1.26	2.04	-
4	VE-cadherin	sc-6458	0.56	1.11	-
5	caspase 8 p20(H134)	sc-7890	2.94	5.03	-
6	Bcl-x s/L	sc-1041	1.06	2.17	-
7	c-Fos (4)	sc-52	1.58	2.34	-

\* sc: Santa Cruz Biotechnology, Inc.

2. |バンドは検出されたが対照群と差がなかったもの]

No.	一次抗体名	Cat. No.	control との差		備考
			30 ng/control	300 ng/control	
8	CYP1A1	299124*1	0.91	1.14	-
9	HSP60	sc*2-1052	0.75	0.95	-
10	Bad (C7)	sc-8044	1.41	1.22	-
11	Akt	sc-1042	0.43	0.72	-
12	caspase 3, H277	sc-7148	0.68	0.50	-
13	L-Myc	sc-790	-	-	-

\*1 第一化学薬品株式会社

\*2 sc: Santa Cruz Biotechnology, Inc.

3. [バンドが検出されなかったもの]

No.	一次抗体名	Cat. No.	備考
14	Arnt1	sc <sup>*</sup> 1-8076	
15	Ah R	sc-8088	
16	Erk 1	#9102	
17	p-Erk (phospho-p44/42 MAP kinase (Thr202/Tyr204))	#9101 <sup>*2</sup>	
18	p-p53 (phospho-p53 (Ser392))	Sc-7997	
19	p-p38 (phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182))	#9211	
20	PI3K p85 $\alpha$	Sc-423	
21	PI3K p110 $\alpha$	sc-1332	
22	p-c-Src (Tyr527)	#2105	
23	p-Tyr	sc-7020	
24	caspase-7 p20	sc-8512	
25	caspase 9 p10 (H83)	sc-7885	



26	TGF $\beta$	Sc-398	
27	NGF	sx-548	
28	PDGFR $\alpha$	sc-338	
29	VEGF	Sc-507	
30	p-VEGF-R2 (Tyr 996)	#2474	
31	p-GSK $\alpha / \beta$	#9331	
32	p-GSK $\beta$	#9336	
33	Ob	sc-842	
34	Ob-receptor	sc-8391	
35	p70 s6 kinase (C18)	sc-230	
36	c-Jun	sc-45	
37	PARP (N20)	sc-1561	
38	Bcl-2	sc-7382	
39	Bax (N20)	sc-493	
40	N-Myc	sc-791	
41	c-Myc	sc-40	
42	MMP2	sc-6838	

43	catenin	sc-9565	
44	catenin	sc-9561	
45	Fak	0061-3 MBL*3	
46	cas	#4011	

\*1 sc: Santa Cruz Biotechnology, Inc.

\*2 #: Cell Signaling Technology

\*3 MBL: Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.

TCDD 投与 (control, 30 ng/kg, 300 ng/kg) アカゲザル大脳 (中心前回) サンプル Western blotting 結果 :

[バンドが検出され対照群と変化のあったもの]

No.	一次抗体	Cat. No.	control との差		備考
			30 ng/control	300 ng/control	
1	CYP1A1	299124*1	1.66	1.38	-
2	p-Akt (Ser473)	#4051*2	1.10	1.93	-
3	caspase 3, H277	sc-7148*3	0.70	4.05	-
4	Bad (C-7)	sc-8044	0.30	0.24	-
5	VE-cadherin	sc-6458	0.32	1.13	-
6	HSP60	sc-1052	0.82	2.03	-
7	Raf1	sc-227	1.69	2.20	-
8	Akt 1/2	sc-8312	0.78	1.73	-
9	Arnt1	sc-8076	0.57	0.25	-

\*1 第一化学薬品株式会社

\*2 #: Cell Signaling Technology

\*3 sc: Santa Cruz Biotechnology, Inc.

[バンドは検出されたが対照群と差がなかったもの]

No.	一次抗体	Cat. No.	control との差		備考
			30 ng/control	300 ng/control	
10	Ah-R	sc*-5579	0.83	1.17	48 kDa 付近のバンドのみ確認
12	c-Jun	sc-45	0.64	1.39	
13	p-Akt1/2/3-R	sc-7985	1.24	0.81	
14	EGFR	sc-03	1.03	1.17	

\* sc: Santa Cruz Biotechnology, Inc.

[バンドが検出されなかったもの]

No.	一次抗体名	Cat. No.	備考
15	caspase 7, p20 (K20)	sc <sup>*1</sup> -8512	
16	caspase 8, p20 (H134)	sc-7890	
17	PI3K p85	sc-423	
18	PI3K p110	sc-1332	
19	p-Tyr	sc-7020	
20	integrin- $\beta$ 1	sc-8978	
21	Laminin $\alpha$ -1	sc-5582	
22	MMP2	sc-6838	
23	AMPK- $\alpha$	#2532 <sup>*2</sup>	

\*1 sc: Santa Cruz Biotechnology, Inc.

\*2 #: Cell Signaling Technology

TCDD 投与 (control, 30 ng/kg, 300 ng/kg) アカゲザル扁桃体サンプル Western blotting 結果 :

1. [バンドが検出され対照群と差があったもの]

No.	一次抗体	Cat. No.	control との差		備考
			30 ng/control	300 ng/control	
1	Ah-R	sc <sup>*1</sup> -5579	6.73	8.93	-
2	Arnt1	sc-8076	4.11	5.33	-
3	CYP1A1	299124 <sup>*2</sup>	0.88	0.57	-
4	p-Akt1/2/3-R	sc-7985	4.52	3.34	-
5	p-Akt (Ser473)	#4051 <sup>*3</sup>	0.61	3.08	-
6	EGFR	sc-03	0.53	2.24	-
7	VE-cadherin	sc-6458	0.18	0.23	-
8	Raf1	sc-227	2.33	1.34	-
9	c-Jun	sc-45	1.72	3.78	-

10	BDNF	sc-546	9.46	22.13	-
11	AMPK- $\alpha$	#2532	1.69	6.01	-
12	PI3K p110	sc-1332	3.05	1.66	-
13	Bad (C-7)	sc-8044	4.16	4.64	-

\*1 sc: Santa Cruz Biotechnology, Inc.

\*2 第一化学薬品株式会社

\*3 #: Cell Signaling Technology

2. [バンドは検出されたが対照群と差がなかったもの]

No.	一次抗体	Cat. No.	control との差		備考
			30 ng/control	300 ng/control	
14	Akt 1/2	sc-8312	1.43	1.22	-
15	HSP60	sc-1052	1.04	0.63	-
16	E2F1	sc-251	1.50	1.41	-

\* sc: Santa Cruz Biotechnology, Inc.



3. [バンドが検出されなかったもの]

No.	一次抗体	Cat. No.	備考
17	p-c- <i>Src-R</i>	sc-12350R	-
18	Ah-R	sc-8088	-
19	p-Erk 42/44	#9101	-
20	p-p53	sc-7997	-
21	p53	sc-1314	-
22	caspase 7, p20 (K20)	sc-8512	-
23	caspase 8, p20 (H134)	sc-7890	-
24	caspase 9, p10 (H83)	sc-7885	-
25	p-JNK	sc-6254	-
26	HGF $\alpha$	sc-7949	-
27	c-Myc	sc-40	-
28	Bax	sc-493	-

29	NGF	sc-548	-
30	Bcl-2	sc-7832	-
31	CNTF	sc-13996	-
32	PARP	sc-1561	-
33	PI3K p85	sc-423	-
34	caspase 3, H277	sc-7148	-
35	Met (c-28)	sc-161	-
36	p-Tyr	sc-7020	-
37	c-Fos	sc-52	-
38	Bcl-Xs/L	sc-1041	-
39	BDNF	sc-546	-
40	MKP2	sc-1200	-
41	Ob-R	sc-8391	-
42	p-MEK1/2	#9121	-
43	p-p42/44 MAPK	#9106	-
44	p-SAPK/JNK	#9255	-



平成15年度厚生労働科学研究費  
分担研究報告書

ダイオキシン類による発癌の解明に関する研究

分担研究者 村田 宣夫 帝京大学医学部教授  
福里 利夫 帝京大学医学部教授  
久保田俊一郎 東京大学大学院 教授

研究要旨

ダイオキシン類によるヒト健康への悪影響が懸念されている。ダイオキシン類の TDI が、4pg/kg/day と設定されているが、その妥当性を検討する目的でアカゲザルを用いて本研究を行なった。妊娠アカゲザルに 2,3,7,8-TCDD (30, 300 ng/kg 体重)負荷をかけて、母獣および F1 への影響を検討した。黄疸を認めた F1 の解析から TCDD による肝障害が考えられた。また、F1 で見出された肝臓の altered cell foci (腫瘍) について、発癌との関係で解析を行った。F0 および F1 の剖検標本を用いて、AhR (TCDD の受容体)を免疫染色で発現レベルを解析したところ、TCDD 投与サル肝臓で、非投与群と比較してより強い発現が見られた。さらに、これに関連した実験として、ヒト肝臓癌の固定組織標本の AhR の発現を免疫組織学的に解析した。AhR を発現していると考えられている正常肝臓組織は陽性であるが、肝臓癌 32 例中 27 例で陽性で、かつ、非癌部と比して癌部でより強く染色される傾向を示した。AhR の解析は、癌化のみならず TCDD の障害性を判断する上で、重要と考えられる結果であった。上記の結果からは、TCDD 30ng/kg の影響も無視できないと考えられた。TDI の妥当性は、今後の解析結果も含めて総合的に判断する必要がある。