

A. 研究目的

ダイオキシン類の組織障害性、発癌性を解析する。妊娠アカゲザルに TCDD を皮下投与した時の F0 および雌雄出生児 (F1) への影響を調べる。この研究によりダイオキシンの最も妥当な TDI の設定に有用な基礎データを提供し、厚生労働行政に貢献することができる。

B. 研究方法

1. ダイオキシンの調整および投与

TCDD は、Wellington Lab.あるいは関東化学で 30 及び 300 ng/mL に調製済みの 2, 3, 7, 8-TCDD を使用した。投与量は、0, 30 ng/kg, 300ng/kg で、サルの背部皮下に投与した。対照群は、トルエン/DMSO (1:2 v/v)を TCDD 投与群と同様の方法で背部皮下に投与した。妊娠 20 日から分娩後 90 日まで、初回投与後 30 日毎に初回投与量の 5%量を追加した。

2. 試験動物

アカゲザルは、China National Scientific Instruments & Materials Import/Export Corporation から購入し、株式会社新日本科学で検疫、予備飼育を行った。一般状態の観察、摂餌量測定、体重測定、血液生化学検査を行い、異常のないアカゲザル (年齢: 5~7 歳, 体重: 4~6 kg)

を用いた。妊娠動物の実験は、約 20 匹/群, 計 約 60 匹を用いた。妊娠動物は、自然分娩させて、児 (F1) を哺育させた。F1a および F1b を得た (詳細は、アカゲザルの交配、分娩、生存状況表(F1a および F1b)、血統一覧表を参照)。

3. 病理組織学的解析

ペントバルビタールナトリウムを静脈注射し、放血安楽死させ、器官および組織の肉眼的観察および病理組織学的解析のための標本を採取した。HE 染色標本を作製し、光学顕微鏡的解析を行った。ヒトおよび齧歯類 AhR とクロスする AhR 抗体を用いて、定法に従い、免疫染色を行った。肝臓癌固定標本を用いて同様に AhR の発現を免疫染色した。

(倫理面への配慮)

麻酔下でサルを放血させ、安楽死させた。実験者に TCDD の影響が及ばないように十分な注意した。

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、アカゲザルの交配、分娩、生存状況表(F1a および F1b)、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. F1 死亡例の解析

動物番号 3, 9, 49 (コントロール) および 32, 38, 45, 51, 68 (TCDD 投与群) について、病理組織学的解析を行った。特記すべきは、サル 38 の肝臓に altered cell foci (腫瘍) が見られたことであった。これに関連した実験として、F0 および F1 の剖検標本を用いて、AhR 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、ヒト肝臓癌の固定組織標本の AhR (TCDD の受容体) 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。

3. F1 38b の剖検および解析

黄疸をおこした F1 38b の肝炎ウイルスの検査を行ったところ、陰性であったため、TCDD による肝障害が最も考えられた。そこで、F1 38b の剖検を行なったところ、toxic な変化であり、TCDD による影響が最も考

えられた。

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理由は明瞭ではないが、F1a の実験結果を重視して研究を進める必要がある。

肝臓に altered cell foci が見られたことから考察すると、TCDD による発癌性を F1 および F0 の両方で *in vivo* で観察・解析する必要がある。これは、TDI の設定に有力な情報を提供すると考えられる。

TDI 設定に、AhR (TCDD の受容体) を介する TCDD の分子レベル、タンパクレベルでの影響も考慮すべきとの考え方が認められつつあり、久保田班で重点的に行っている TCDD の受容体である AhR の発現解析、AhR を介する情報伝達系の解明が重要な実験となると考えられる。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。このデータは、上記を支持する結果である。

E. 結論

F1 サルの肝臓に altered cell foci (腫瘍) が見られた。これに密接に関連した実験として、F0 および F1 の剖検標本を用いて、AhR 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。TDI 設定に、TCDD の AhR を介する分子レベル、タンパクレベルでの影響も考慮すべきとの考え方が認められつつあり、久保田班が行っている AhR の発現解析、AhR を介する情報伝達系の解明が今後重要な実験となると考えられる。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。これらの結果から 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。

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 via 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

ヒト肝臓の抗AhR抗体染色結果

肝臓	癌部	非癌部
HCC	強陽性	0
	陽性	5
	弱陽性	11
	軽微	4
	陰性	8
Normal	強陽性	11
	陽性	3
	弱陽性	0
	軽微	0
	陰性	2

抗AhR抗体によるwestern blotting (ヒト肝癌株細胞, HepG2)

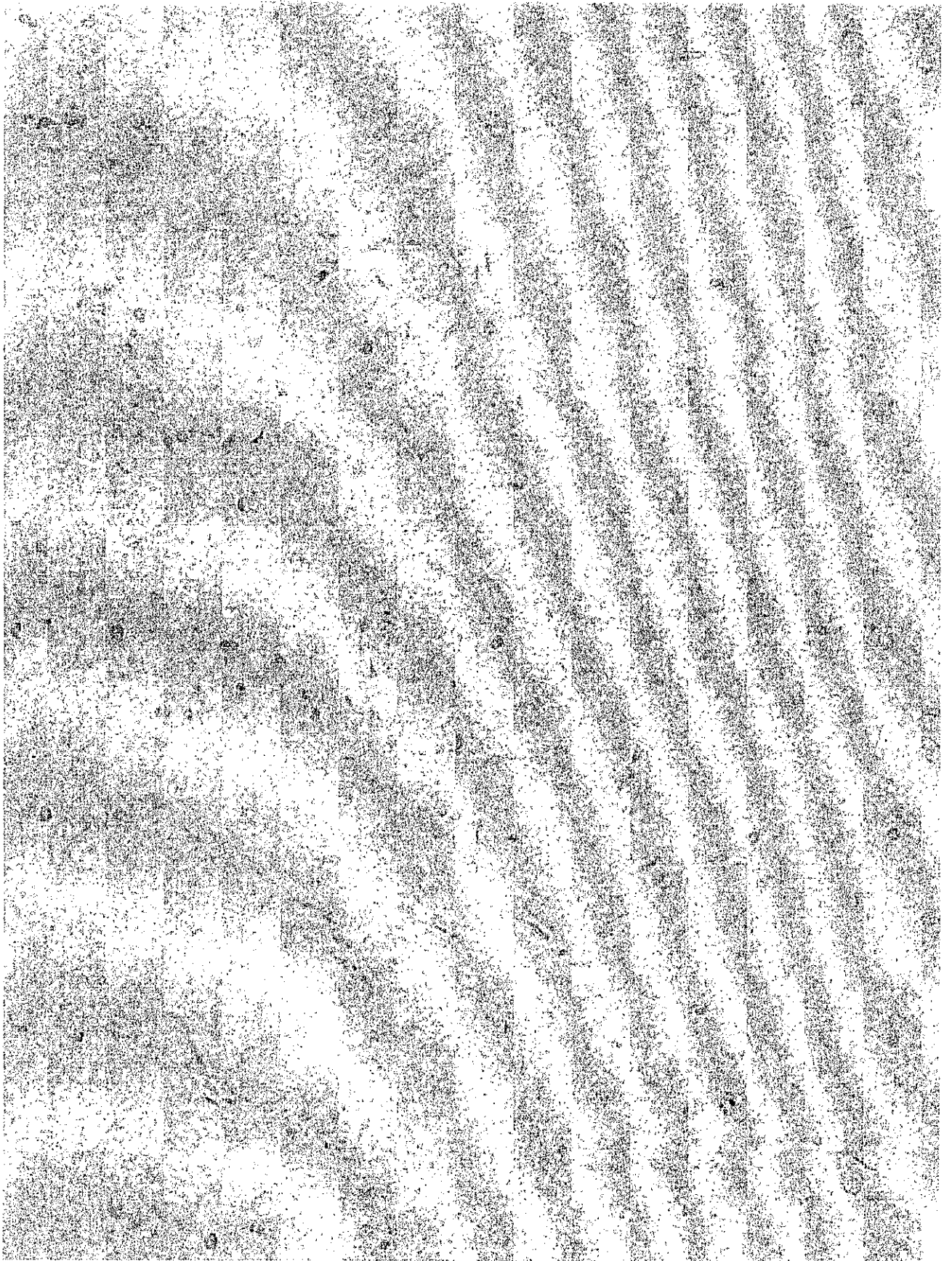
MW(kD)

210 —

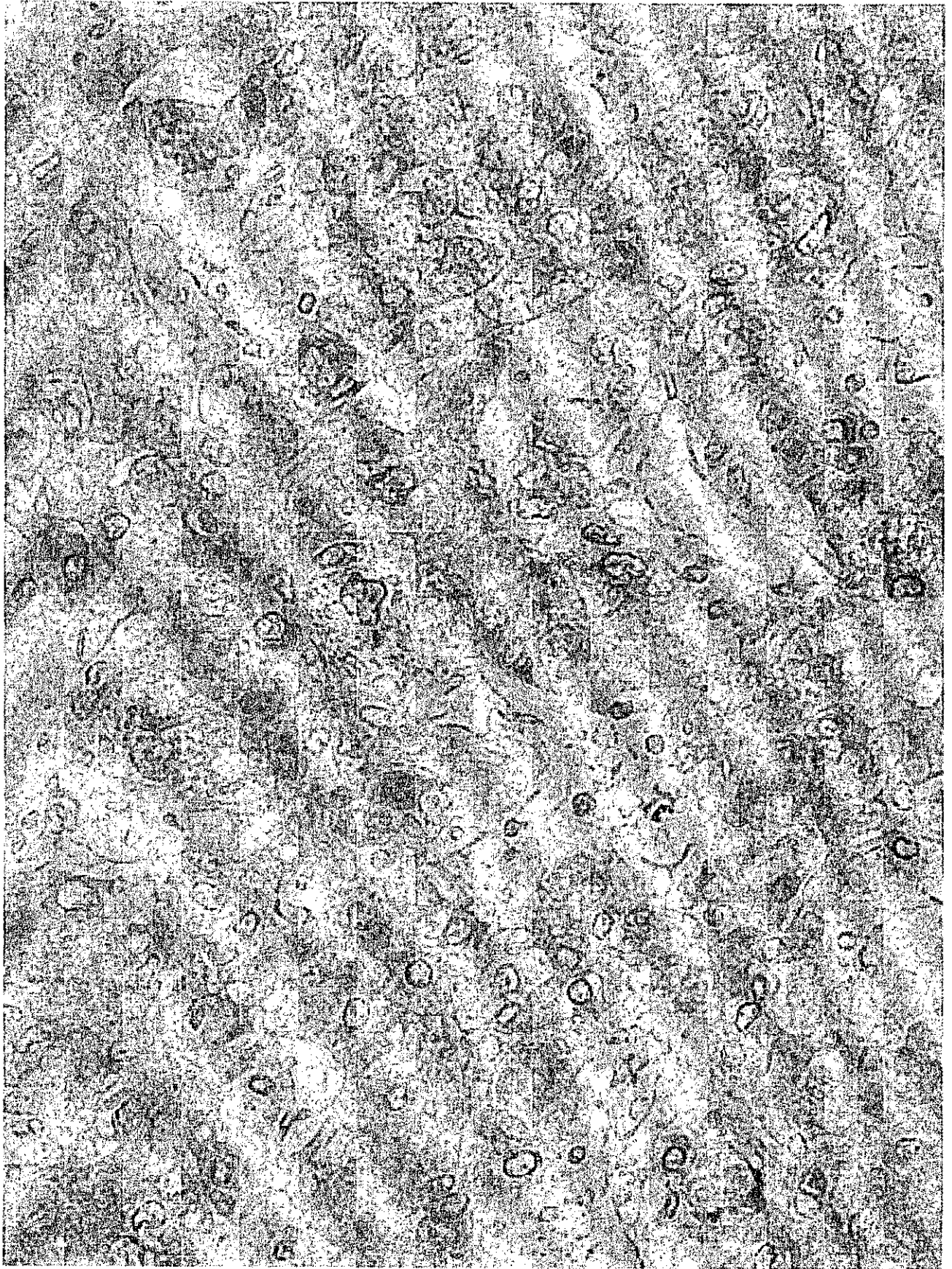
131 —

87.0 —

42.2 —



Normal liver

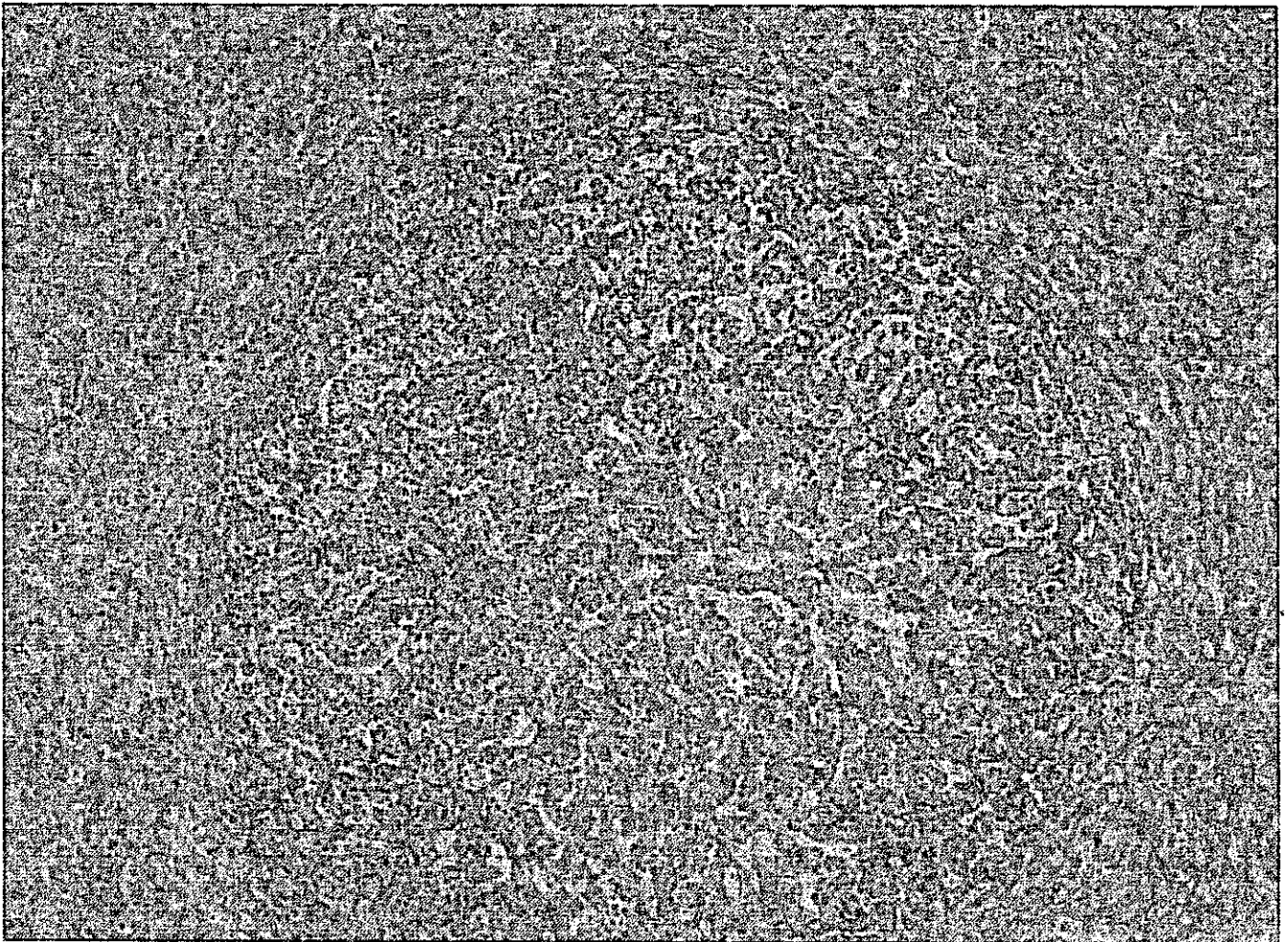


Human HCC, Ah receptor 免疫染色

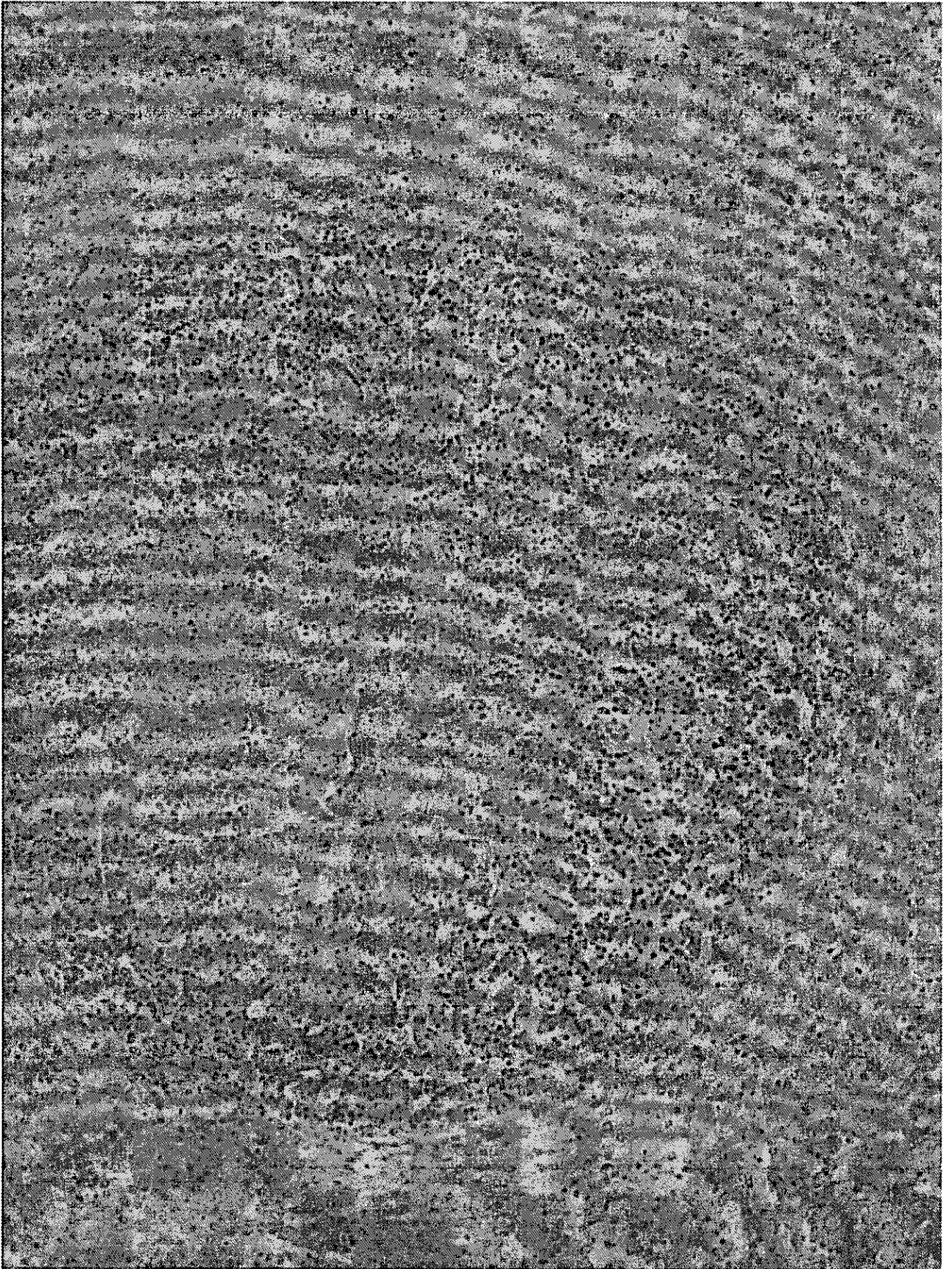
F1 死亡例 病理組織解析

TCDD300ng/kg 投与 (サル番号 38)

所見 肝臓腫瘍



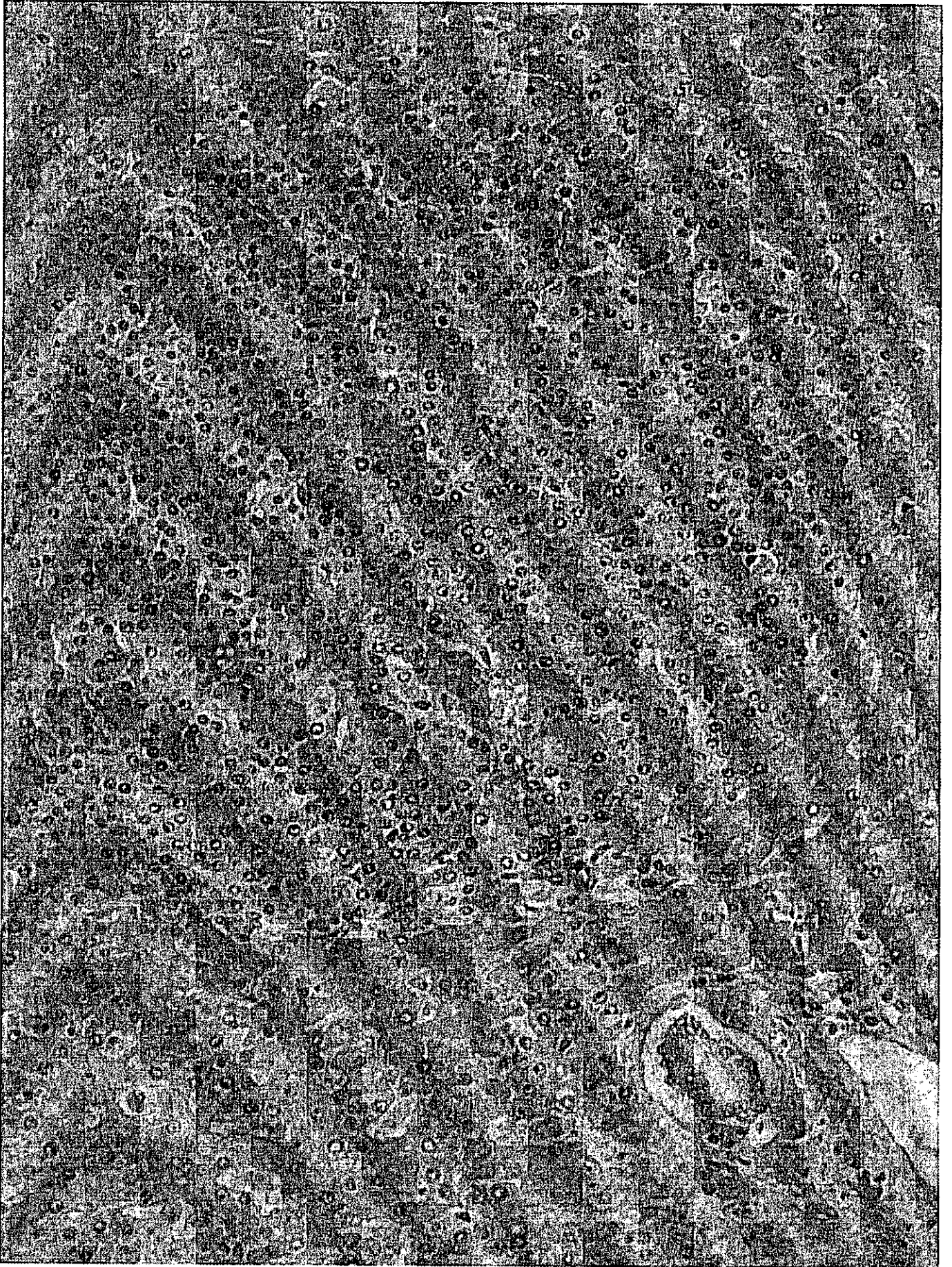
38-liver-tumor-01.jpg



Tumor -01 (No.38)



Tumor -02 (No.38)



Tumor -03 (No.38)

平成15年度厚生労働科学研究費
分担研究報告書

ダイオキシン曝露によりアカゲザルの臓器に発現障害性がみられた遺伝子群の DNA マイクロアレイ製作およびヒトの発癌における共通性の検討

分担研究者 浅岡 一雄 京都大学霊長類研究所助手
久保田俊一郎 東京大学大学院 教授

研究要旨

サルはヒトに類似するとして、なかでも中型で数 kg の体型をもつアカゲサルは実験に多く用いられている。ヒトに対するダイオキシンの健康影響として器官の機能障害、発癌や奇形など体内影響が懸念されている。ヒトに対する健康影響はヒトに最も近い実験動物の研究からの外挿が望まれるためサルを用いて研究を行った。これまでに行われた、ダイオキシンのサル成体および胎児への移行に関する研究を簡略に記述する。ダイオキシン(2,3,7,8-TCDD)を 30ng および 300ng/kg 体重で妊娠サルに単回投与した。投与後7日目において、両群ともに臍帯血および胎児血に母体血と同程度のダイオキシンの移行が検出された。臓器組織へのダイオキシンの移行は血液より高濃度に濃縮していた。臓器への移行量は投与量に並行して増加がみられた。胎児肝臓には血液に比べて低曝露群で 10 倍、高曝露群で 100 倍のダイオキシンの検出があり、経胎盤によりダイオキシンが胎児へ透過することが確認された。母体では胎盤、肝臓、脂肪および乳腺への移行がみられた。現行ダイオキシンの TDI、4pgTEQ/kg/day、は妊娠ラットの胎児生殖器系への LOAEL が 86ng TCDD /kg 体重であることから算出されている。妊娠サルにおいては、より低曝露群、30ng/kg 体重、においても胎児への移行がみられることから、ダイオキシンのより慎重な社会的な取り組みが望まれる。また、ダイオキシンのサルの諸臓器における遺

伝子発現に及ぼす障害性について簡略に記述する。サルに対して 30ng-300ng/kg 体重で単回投与した。投与 49 日目の臓器において分子の発現変動が検出された。CYP1A1 の発現量増加は乳腺、皮膚、腎臓で数倍に増加し、脾臓、肝臓、脳において微増し、心臓、肺、甲状腺、卵巣では検出されなかった。発現変動はダイオキシンの臓器移行量に並行して増加していた。ダイオキシン移行の大きい乳腺においては、ダイオキシンの投与量に応じて 16 個の遺伝子に発現量の増加が検出され、17 個の遺伝子に投与量に応じて発現量の減少が検出された。発現遺伝子においてサルがヒトと極めて類似していることを考慮すると、サルで見られたダイオキシン影響はヒトにおいても同様の発現プロファイルで生じる可能性が高いと外挿される。30ng TCDD/kg サル体重の投与において遺伝子発現に変動が認められた。妊娠ラットの LOAEL の 86ng TCDD/kg 体重から算出された現行のダイオキシンの TDI はサルを用いた研究から更に説明をはかる必要がある。母体に 2,3,7,8-TCDD(30, 300 ng/kg)を皮下投与し母体と F1 での影響を遺伝子解析の観点から実施した。昨年度報告した TCDD(30ng および 300ng/kg) 曝露により変動がみられた遺伝子群について解析用 DNA マイクロアレイを作成し、ヒト正常乳腺と癌部の mRNA を蛍光標識 cDNA として解析したところ一部に共通した陽性ハイブリダイズが認められた。この結果は、ヒトの疾病要因として懸念されているダイオキシンの曝露影響および発癌の間において遺伝子発現の攪乱に共通の基盤がある可能性を示している。遺伝子解析の結果からは、30ng/kg の影響も大きいと考えられる結果であった。TDI の妥当性は、今後の解析結果も含めて総合的な判断が必要と考えられる。

A. 研究目的

ダイオキシン類(TCDD) を妊娠アカゲザルに投与した時の母動物(F0) および出生児(F1a および F1b)における遺伝子変化を調べる。この研究によりダイオキシンの最も妥当な TDI の設定に有用な基礎的結果を提供し、厚生労働行政に貢献することが研究目的である。

B. 研究方法

1. ダイオキシンの調整および投与

TCDD は、Wellington Lab.あるいは関東化学で 30 及び 300 ng/mL に調製済みの 2, 3, 7, 8-TCDD を使用した。投与量は、0, 30ng/kg, 300ng/kg 体重で、サルの背部皮下に投与した。対照群は、トルエン/DMSO (1:2 v/v) を TCDD 投与群と同様の方法で背部皮下に投与した。妊娠 20 日から分娩後 90 日まで、初回投与後 30 日毎に初回投与量の 5% 量を追加した。

2. 試験動物

アカゲザルは、China National Scientific Instruments & Materials Import/Export Corporation から購入し、株式会社新日本科学で検疫、予備飼育を行った。一般状態の観察、摂餌量測定、体重測定、血液生化学検査を行い、異常のないアカゲザル

(年齢：5～7 歳，体重：4～6 kg) を用いた。妊娠動物の実験は、約 20 匹/群，計 約 60 匹を用いた。妊娠動物は、自然分娩させて、児 (F 1) を哺育させた。

3. 遺伝子解析

ペントバルビタールナトリウムを静脈注射し、放血安楽死させ、器官および組織の肉眼的観察および遺伝子解析用に標本を採取した。-80 度に保存した。Total RNA を抽出し、RT-PCR, マイクロアレイ作製、解析を行った。ヒト乳癌 RNA は Klontec 社より購入した。RT-PCR により増幅した遺伝子はベクターに組み込み大腸菌にトランスフォームして遺伝子のクローニングをおこなった。

(倫理面への配慮)

サルは愛護的に扱い、サルを麻酔下で、放血安楽死させた。実験関係者に TCDD の影響が及ばないように十分に注意をはらった。

C. 研究結果

遺伝子解析

TCDD を 30ng および 300ng/kg 体重で単回投与した。投与 49 日目の臓器において分子の発現変動が検出された。CYP1A1 の発現量増加は乳腺、皮膚、腎臓で数倍に増加し、膵臓、肝臓、脳において微増し、心臓、

肺、甲状腺、卵巣では検出されなかった。発現変動はダイオキシンの臓器移行量に並行して増加していた。ダイオキシン移行の大きい乳腺においては、ダイオキシンの投与量に応じて16個の遺伝子に発現量の増加が検出され、17個の遺伝子に投与量に応じて発現量の減少が検出された。発現遺伝子においてサルがヒトと極めて類似していることを考慮すると、サルで見られたダイオキシン影響はヒトにおいても同様の発現プロファイルで生じる可能性が高いと外挿される。30ng TCDD / kg サル体重の投与において遺伝子発現に変動が認められた。妊娠ラットのLOAELの86ng TCDD / kg 体重から算出された現行のダイオキシンのTDIはサルを用いた研究から更に解明をはかる必要がある。

今後更に研究する必要性があろう。

開発したDNAマイクロアレイはこれらの研究に有用となるだろう。

(1) ダイオキシン曝露による組織影響の発現遺伝子分析

サルにおいてダイオキシンを皮下に曝露した場合に多くの組織への移行が検出された。なかでも乳部の取り込みは大きかったため、この組織を用いて発現遺伝子の変動を分析した。ダイオキシンの曝露量(30ng/kg および 300ng/kg) に依存して CYP1A1 の

発現が増加した。その他多くの遺伝子分析はヒトの約1万個遺伝子分析用のDNAマイクロアレイを用いて網羅的に解析したところ、約100種の遺伝子に変動が認められ、8つの変動パターンに分類された(表1、ダイオキシン曝露によりサル乳部組織で変動する遺伝子リスト)。

(2) 発現変動が検出された遺伝子の塩基構造決定

ダイオキシン曝露によりサル組織の発現量の変動が検出された遺伝子についてRT-PCRにより増幅したのちベクターに組み込み大腸菌にトランスフォームして遺伝子のクローニングをおこなった。現在は塩基配列の解析を進めている。

(3) ダイオキシン影響検出用のDNAマイクロアレイの作製

TCDD曝露によりサルに発現の攪乱がみられた遺伝子群について解析用DNAマイクロアレイを製作した。これを用いて、ヒト乳部の正常および癌mRNAを蛍光標識cDNAとして、開発したDNAマイクロアレイで解析したところ一部に共通した陽性ハイブリダイズが認められた。これは、ヒトの疾病要因として懸念されているダイオキシンの曝露影響および発癌の間において遺伝子発現の攪乱に共

通の基盤がある可能性を示している。しかしヒトの検体は1例であり明確な結論を得るに至っていない。

(4) ダイオキシン影響のプロテオーム分析

ヒト DNA アレイは網羅的であるが現在のところ全遺伝子は未整備であり、補完するためにダイオキシン曝露サルの組織タンパク質を2次元電気泳動により展開して約300個のスポットについて発現変動を網羅的に調べている(図を添付、control, 30ng/kg, 300ng/kg TCDD)。ダイオキシン曝露に依存するスポットの有無からダイオキシンの組織影響を結論づける予定である。

D. 考察

サルの未同定の遺伝子をクローニングし明らかにする実験で、ヒトとサルの遺伝子の比較解析を行った結果から、ヒトとサルの遺伝子のホモロジーは、約96%で(ヒトとマウスの遺伝子のホモロジーは約80%) TCDDの影響をマウスではなく、サルで行っている本研究の大きな意義が裏付けられた。昨年度報告したTCDD曝露により変動がみられた遺伝子群について解析用DNAマイクロアレイを作成し、ヒト正常乳腺と癌部のmRNAを蛍光標識cDNAとして解析したところ一部に共通した陽

性ハイブリダイズが認められた。これは、ヒトの疾病要因として懸念されているダイオキシンの曝露影響および発癌の間において遺伝子発現の攪乱に共通の基盤がある可能性を示している。遺伝子解析の結果、TCDD30ng/kgでも遺伝子変化が認められており、この結果からは、TDI設定の際に考慮して、総合的判断をする必要がある。

E. 結論

ダイオキシンの影響を多数回検出するために、簡便なDNAマイクロアレイの作製をすすめた。サルの乳部組織においてダイオキシン曝露により発現が変動した遺伝子からプローブを設計した。現在約60個のプローブを配置したガラスアレイが得られた。TCDD30ng/kg, 300ng/kgの投与による遺伝子発現変化を解析した結果が、より妥当なTDI設定への有力な情報を提供すると考えられる。サル遺伝子のクローニングの結果から、ヒトとサルの遺伝子のホモロジーは約96%で(ヒトとマウスの遺伝子のホモロジーは約80%) TCDDの影響をマウスではなく、サルで行っている本研究の大きな意義が裏付けられた。

F. 研究発表

I. 論文発表

Asaoka, K., Iida, H., Suzuki, J., Watanabe, K., Inoue, M., Fukusato, T., Murata, N., Nomizu, M., Nagata, R., Kubota, S. Gene expression disorder in various tissues in rhesus monkeys treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin via subcutaneous single injection. *Organohalogen Compounds* 64: 423-426, 2003

II. 国際学会発表

K. Asaoka, H. Iida, Y. Kamanaka, T. Nishimura, M. Wakita, J. Suzuki, K. Watanabe, Y. Ishikawa, S. Kawashima, C. Mori, M. Yasuda, S. Kubota
Gene expression resemblance between *Macaca* monkey and human, and its application for environmental toxicogenomics. The 5th Asia Federation for Medical Chemistry (AFMC) International Medical Chemistry Symposium (October 14-17, 2003, Kyoto, Japan) Abstracts p.179

K. Asaoka, K. Watanabe Phylogenetic properties and dioxin related disruption of genes expressed in macaque monkeys. *Eco Toxicology Genomics Symposium* (Oct 6-7,

2003, Okazaki, Japan) Abstracts p.16.

K. Asaoka, H. Iida, J. Suzuki, K. Watanabe, M. Inoue, T. Fukusato, N. Murata, M. Nomizu, R. Nagata and S. Kubota Gene expression disorder in various tissues in rhesus monkeys treated with 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin via subcutaneous single injection. *Dioxin 2003 Conference. The 23rd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants (PoPs)* (August 24-29, 2003, Boston, Massachusetts, USA) Abstracts p.423

K. Asaoka, H. Iida, J. Suzuki, T. Nishimura, M. Wakita, M. Ohba, H. Okamura, S. Kubota
Comprehensive analysis of gene expression in monkey tissues and development of DNA microarray for the detection of environmental chemical affection. The 5th International workshop on advanced genomics (June 26-27, 2003, Yokohama, Japan) Abstracts p.119

III. 国内学会発表

浅岡一雄、飯田景子、釜中慶朗、渡辺邦夫、鈴木樹理、西村剛、脇田真清、大場光芳、岡村浩、久保田俊一郎 (2004) 環境化学物質の乳部に与える影響と乳部疾患の検査用マイクロアレイの開発. 日本薬学会第 124 年会 (平成 16 年 3 月 29-31 日, 大阪市) 講演要旨集 p29[P2]II-376

浅岡一雄、飯田景子、釜中慶朗、鈴木樹理、西村剛、脇田真清、渡辺邦夫、石川雄一郎、森千里、安田峯生、久保田俊一郎 (2003) マカクサルの発現遺伝子マイクロアレイを用いたダイオキシン影響解析. 日本分子生物学会第 26 回年会 (平成 15 年 12 月 10-13 日, 神戸市) 講演要旨集 p.680

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

飯田景子、釜中慶朗、鈴木樹理、脇田真清、西村剛、渡辺邦夫、森千里、浅岡一雄

ヒトとマカクサルに発現する遺伝子の類似性を用いたエコトキシコゲノミックス. 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.428

G 知的所有権の取得状況

なし

表 1-1 解析用 DNA マイクロアレイの製作 66 スポット-

TCDD 曝露によりサルに発現の攪乱がみられた遺伝子群リスト

- 1 cyp3A4
- 2 4-1BB
- 3 SXR
- 4 P53
- 5 DJ-1
- 6 immunotherapy
- 7 BRCA1
- 8 BRCA2
- 9 mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli) (MLH1), mRNA
- 10 cone-rod homeobox (CRX), mRNA
- 11 MDR1 multidrug resistance
- 12 alcohol dehydrogenase 4 (class II), pi polypeptide (ADH4), mRNA
- 13 alcohol dehydrogenase 7 (class IV), mu or sigma polypeptide (ADH7), mRNA
- 14 tachykinin receptor 1 (TACR1), transcript variant long, mRNA
- 15 UDP glycosyltransferase 2 family, polypeptide B10 (UGT2B10), mRNA
- 16 caspase8 *8substrate-IETD
- 17 cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal) (CDH2), mRNA
- 18 Psg7
- 19 SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily
- 20 TFF1
- 21 ubiquitin specific protease 4 (proto-oncogene) (USP4), mRNA
- 22 G protein-coupled receptor 65 (GPR65), mRNA
- 23 harakiri, BCL2 interacting protein (contains only BH3 domain) (HRK), mRNA
- 24 Wisp-2
- 25 Kruppel-like factor 4 (gut) (KLF4), mRNA
- 26 chromosome 8 open reading frame 1 (C8orf1), mRNA
- 27 caspase3
- 28 heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1 (HS6ST1), mRNA
- 29 cytochrome P450, family 7, subfamily B, polypeptide 1 (CYP7B1), mRNA
- 30 GLI-Kruppel family member HKR3 (HKR3), mRNA
- 31 RP (poriADP ribose polymerase)
- 32 ladinin 1 (LAD1), mRNA
- 33 tumor suppressing STF cDNA 6 (TSSC6) mRNA, complete cds.