

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

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 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 安田 峯生

平成 16 (2004) 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 暴露のアカゲザル歯形成への影響に関する研究 -----	7
津賀 一弘、安田 峯生	
2. ダイオキシン暴露によるアカゲザル肝酵素類への影響に関する研究 -----	19
杉原 数美	
3. ダイオキシン暴露によるアカゲザル免疫系への影響に関する研究 -----	23
隅田 寛、浅岡 一雄	
4. 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 暴露による腎線維化に関する研究 -----	27
隅田 寛、山下 敬介	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	35
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	37

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
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

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と児について、歯の形成、肝臓の酵素、免疫系、腎臓への影響を検索した。300 ng/kg 負荷群の児には高頻度に歯の異常が観察された。母体肝臓の酵素活性には各群間に有意な差は観察されなかった。母体血の白血球分画とリンパ球表面抗原の解析、胸腺の組織学的検索では、ダイオキシンの影響を示唆する所見が得られた。300 ng/kg 負荷群生後死亡児の腎臓の組織学的観察で、線維化と血管内膜の肥厚がみられた。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
津賀 一弘 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

A. 研究目的

ダイオキシン類は暴露された世代のみならず、次世代にも悪影響を及ぼすことが懸念されている。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 という比

較的微量の 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。初産児（F1a）の離乳後、期間をおいて母体を再度交配、妊娠させ、初回は妊娠 20 日に TCDD 0、20 または 200 ng/kg、その後は F1a と同様に TCDD を投与して第二産児（F1b）を得た。TCDD 暴露開始から約 4 年後に一部の母体を屠殺・剖検した。これらの児および母体について以下の観察を行った。

（1）児の歯の観察：死産児については高分解能コンピュータ断層装置（CT）で

上・下顎を三次元的に観察した。生存児については単純X線像で乳歯、永久歯の形成状態を観察した。また、妊娠80日に採血した母体血漿中のTCDD濃度を高分解能ガスクロマトグラフィー・高分解能質量分析法で分析し、歯異常との関連を検索した。

- (2) 剖検母体の肝臓の一部を液体窒素で凍結保存し、解凍後薬物代謝酵素 ethoxyresorufin-O-dealkylase (EROD) および methoxyresorufin-O-dealkylase (EROD) を蛍光光度計で測定した。またキサントシン酸化酵素 (XO) 活性を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で測定した。
- (3) TCDD の最終投与後約 600 日に母体から末梢血を採取し、白血球数、白血球分画数を計測した。リンパ球については表面抗原 (CD3、4、8、20) 陽性細胞の割合をフローサイトメーターで解析した。一部の剖検母体の胸腺については組織学的に検索した。
- (4) 300 ng/kg 群で生後 406 日と 422 日に死亡した児の腎臓の組織切片を作製し、コラーゲン線維の特異的染色であるピクシリウス赤染色を施し、線維化の程度を検討した。

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、母体の剖検、母児の生存状況を F1a については表 1-1、F1b については表 1-2 に示す。F1a 児の多くは生後約 1400 日に達している。F1b 児は生後約 600 日である。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。15 年度末に生存している児は F1a と F1b を合わせて対照群オス 6 匹、メス 13 匹、30 ng/kg 群オス 6 匹、メス 8 匹、300 ng/kg 群オス 10 匹、メス 6 匹である。また、飼育経費節減と、中間的な暴露母体の所見をとる目的で、15 年度後半に対照群 3 匹、30 ng/kg 群 4 匹、300 ng/kg 群 4 匹の母体を屠殺、剖検した。

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) 歯形成への影響

死産、生後死亡児の上・下顎を高分解能 CT 装置で観察したところ、平成 15 年度に単純 X 線観察で確認された 300 ng/kg 群での 3 例の歯欠損が確認されたほか、歯切端の偏位など、軽微な変化も観察された。また、三次元画像から石灰化と受精後日齢の関係を解析したところ、歯の石灰化体積が日齢増加に伴い直線的に増加することが認められた。しかし、歯異常をもつ 3 例では日齢の割に歯の石灰化が遅れていることが判明した。

生存 F1 の単純線観察では、300 ng/kg Fla の 50% の児に乳歯・永久歯の異常が見出された。異常は上顎永久側切歯の欠損が大半を占めた。F1b には異常は認められなかった。

妊娠 80 日に採血された血漿中 TCDD 濃度を測定したところ、300 ng/kg 群では 1.1 ~ 8.7 pg/g 湿重量と、かなりのばらつきが認められたが、児の歯の異常頻度は母体の血漿中 TCDD 濃度の上昇に伴って増加し、4.1 pg/g 以上の母体 4 例の児では全例に異常があった。

2) 母体肝酵素類への影響

対照群 3 匹、30 ng/kg 投与群 4 匹、300 ng/kg 投与群 3 匹での肝ミクロソームの EROD、MROD 活性および肝サイトソールの XO 活性を測定したところ、各活性とも、個体間でのばらつきが多少認められたが、各群での有意な差は認められなかった。

3) 母体免疫系への影響

対照群 10 例、30 ng/kg 群 10 例、300 ng/kg 群 12 例について血液を解析した。対照群に比べて TCDD 暴露群では白血球数とくにリンパ球数が少ない傾向が見られたが、差は有意ではなく、用量反応関係も認められなかった。各群のリンパ球サブセット数に関しては、TCDD 暴露群では CD3⁺CD4⁺細胞 (CD4⁺T 細胞) 数や CD20⁺細胞 (B 細胞) 数が、対照群と比較して減少している傾向が見られた。一部の F0 については剖検し、胸腺を組織学的に観察したが皮質と髄質の境界が不明瞭になっているなどの異常所見を示すものがあった。

4) 死亡児腎臓線維化

300 ng/kg 群の 2 例に両側性の腎臓形成異

常が認められた。正常腎臓はピクシリウス赤染色でほとんど染色されないが、これらの異形成腎臓はピクシリウス赤に強く染色された。異形成腎臓では腎小体と尿細管の低形成が認められた。また、血管周囲あるいは血管外膜の結合組織が増殖していた。血管内膜の肥厚、腎線維皮膜の肥厚も認められた。

D. 考察

本研究の300 ng/kg 群F1a 児にTCDDの影響によると思われる歯の異常と腎臓の異常が見出された。

げっ歯類ではTCDDへの胎生期、授乳期暴露による歯形成異常が報告されている。ヒトの疫学調査でもダイオキシン類への暴露と歯の異常の関連を示唆する報告がなされている。本研究での投与期間は乳歯原基形成前から少なくとも永久歯胚形成期に及んでおり、歯の異常が300 ng/kg のみに発現し、対照群と30 ng/kg では見られなかったこと、300ng/kg 群でも妊娠80日の母体血漿中TCDD濃度の高かった例に多かったことなどから、TCDD暴露と児の歯の異常との間に関係があることには疑う余地はない。永久歯未萌出のF1b生存児では歯の異常は認められていないが、今後追跡の必要がある。

TCDDによる腎発生障害としては、マウスでの水腎症誘発がよく知られている。水腎症の腎臓ではIV型コラーゲンの減少が報告されているが、TCDD暴露サル児ではコラーゲンは増加していた。この差はTCDD暴露期間の差による可能性がある。TCDDの腎臓でのコラーゲン増殖促進にはTGF- β 1が関与しているかもしれない。TGF- β 1は種々の器官で線維化を促進することが知られている。TCDD暴露を受けたマーモセットでは心筋の線維化が起こると報告されている。TCDD暴露とTGF- β 1などの成長因子の増加あるいは活性化との関連についての解明が次の課題と思われる。

肝薬物代謝酵素の誘導はTCDDによるAhRを介する作用としてよく知られている。本研究では、約5年前にTCDD投与されたサル肝の薬物代謝酵素活性を調べたが、対照群とTCDD投与群の間に有意な差が認められず、現時点でのTCDDによる誘導作用は検出限界以下であった。これは、TCDDが僅かずつだが代謝排泄され、体内濃度が低下していることを示していると考えられる。

母体の免疫系に関しては、予備的な少数例の観察ではあるが、TCDD暴露を受けた一部の母体の胸腺組織像に異常が認められたことは、TCDDが成体胸腺組織に不可逆的な影響を及ぼした可能性を示唆している。TCDD暴露群でT細胞サブセットの一部について細胞数が対照群より少ない傾向にあったが、これも胸腺への影響の結果によるものかも知れない。このサブセットの減少が母ザルの妊娠の維持に影響を与えるという考え方もある。妊娠サルのTCDDを投与すると流産が多発したとの報告があるが、このようなメカニズムがはたらいたのかもしれない。今回の予備的な実験で、F1児についても血液を材料に免疫系の検索を行う目処がついたので、平成16年度にはさらに研究を展開する予定である。

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1400日まで観察した結果、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の負荷では児の歯や腎臓の形成、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) Yasuda I, Yasuda M, Sumida H, Tsusaki H, Inouye M, Tsuga K, Akagawa Y: Effect of *in utero* and lactational exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on tooth development in rhesus monkeys. *Organohalogen Compounds*, 64, 431-434, 2003.
- 2) Sumida H, Tsusaki H, Inouye M, Yasuda M: Renal fibrosis induced by *in utero*

and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in rhesus monkeys. *Organohalogen Compounds*, 64, 453-456, 2003.

- 3) Sugihara K, Kitamura S, Ohta S, Okamura S, Yamashita K, Yasuda M, Matsui S, Matsuda T: Metabolism of indirubin and indigo, endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand candidates, and competitive effect with respect to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Organohalogen Compounds*, 65, 134-137, 2003.

2. 学会発表

- 1) Yasuda I, Yasuda M, Sumida H, Tsusaki H, Inouye M, Tsuga K, Akagawa Y: Effect of *in utero* and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on tooth development in rhesus monkeys. (23rd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, August 24-29, 2003, Boston, USA)
- 2) Sumida H, Tsusaki H, Inouye M, Yasuda M: Renal fibrosis induced by *in utero* and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in rhesus monkeys. (23rd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, August 24-29, 2003, Boston, USA)
- 3) Sugihara K, Kitamura S, Ohta S, Okamura S, Yamashita K, Yasuda M, Matsui S, Matsuda T: Metabolism of indirubin and indigo, endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand candidates, and competitive effect with respect to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). (23rd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, August 24-29, 2003, Boston, USA)
- 4) 安田以久, 安田峯生, 隅田寛, 角崎英志, 井上稔, 津賀一弘, 赤川安正: ダイオキシン胎生期暴露のアカゲザル歯形成への影響. 第43回日本先天異常学会学術集会

要旨集, 118 (抄録), 2003. (第43回日本先天異常学会学術集会, 2003年7月2-4日, 大阪)

- 5) 安田峯生, 安田以久, 隅田寛, 角崎英志, 井上稔, 津賀一弘, 赤川安正: ダイオキシン胎生期暴露のアカゲザル口蓋ヒダ形成への影響. 第43回日本先天異常学会学術集会要旨集, 119 (抄録), 2003. (第43回日本先天異常学会学術集会, 2003年7月2-4日, 大阪)
- 6) 隅田寛, 上塚翼, 安田峯生, 山下敬介, 角崎英志, 井上稔: 2,3,7,8-四塩化ジベンゾパラジオキシン (TCDD) の胎児・授乳期暴露を受けたアカゲザル肝細胞の形態解析. 環境ホルモン学会第6回研究発表会要旨集, 325 (抄録), 2003. (環境ホルモン学会第6回研究発表会, 2003年12月2-3日, 仙台)

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	2004/3/31日齢	備考
対照	1	1999/11/30	2000/5/9	161	♀				1422	
	2	1999/12/3	2000/5/18	167	♀				1413	
	3	1999/12/11	2000/5/30	171	♀		2001/8/26	453		F1死亡
	4	1999/12/11	2000/5/23	164	♂				1408	
	5	1999/12/14	2000/2/12	60		胎児死亡				
	6	1999/12/15	2000/6/3	171	♀				1397	
	7	1999/12/15	2000/5/7	144	♀				1424	
	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	♀				1410	
	12	1999/12/19	2000/5/31	164	♀				1400	
	13	1999/12/23	2000/5/27	156	♀	死産				
	15	1999/12/28	2000/6/10	165	♀		2002/6/3	723		F1死亡
	46	1999/12/31	2000/6/10	162	♀				1390	
	49	2000/1/1	2000/5/27	147	♂	死産				
	58	2000/1/11	2000/6/26	167	♀		2000/9/28	94		F1死亡
	61	2000/1/16	2000/6/17	153	♂		2004/1/5	1297		F1死亡
	62	2000/1/17	2000/7/6	171	♂				1364	
	63	2000/1/24	2000/7/6	164	♀				1364	
	64	2000/1/29	2000/7/2	155	♂				1368	
対照'	13'	1999/12/23	2000/5/21	150	♂				1410	
	49'	2000/1/29	2000/7/8	161	♀		2001/8/7	395		F1死亡
30 ng/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	♀				1405	
	19	1999/12/9	2000/5/13	156	♂				1418	
	20	1999/12/11	2000/5/22	163	♀	死産				
	21	1999/12/15	2000/5/22	159	♀				1409	
	22	1999/12/18	2000/5/30	164	♂				1401	
	23	1999/12/19	2000/6/3	167	♀				1397	
	24	1999/12/20	2000/5/26	158	♂		2000/11/1	159		F1死亡
	25	1999/12/22	2000/5/25	155	♂				1406	
	26	1999/12/22	2000/6/10	171	♀		2002/8/25	806		F1死亡
	27	1999/12/25	2000/6/17	175	♂				1383	
	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	♀				1393	
	47	1999/12/31	2000/6/10	162	♂				1390	
	50	2000/1/2	2000/6/22	172	♀	死産				
	53	2000/1/4	2000/6/18	166	♂				1382	
	59	2000/1/11	2000/6/18	159	♀				1382	
	65	2000/3/3	2000/8/14	164	♀				1325	
300 ng/kg	31	1999/11/28	2000/5/17	171	♀				1414	
	32	1999/11/30	2000/5/16	168	♂		2001/8/26	467		F1死亡
	33	1999/12/1	2000/4/29	150	♂				1432	
	34	1999/12/6	2000/4/12	128	♂	流産				
	35	1999/12/12	2000/5/22	162	♀				1409	
	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	♂				1394	
	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	♀				1399	
	43	1999/12/23	2000/6/16	176	♂	死産				
	44	1999/12/25	2000/6/1	159	♂				1399	
	45	1999/12/27	2000/6/11	167	♀		2001/8/7	422		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	♂				1374	
	66	2000/2/25	2000/8/15	172	♂				1324	
	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				母体切迫
	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	♀				672	
	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	♂				663	

2004/1/23

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	2004/3/31日齢	備考
対照	1b	2002/3/4	2002/8/17	166	♂		2003/8/17	365		F1死亡 母体死亡
	2b	2002/2/5	2002/7/22	167	♀				618	
	3b	2001/11/29	2002/5/10	162	♀		2004/1/15	615		F1死亡
	4b	2002/3/3	2002/8/18	168	♂				591	
	5b	2002/1/13	2002/2/13	31		流産				
	6b	不妊								母体剖検
	7b	2001/12/8	2002/5/6	149	♂	死産				
	8b	不妊								
	9b	2002/1/31	2002/7/17	167	♀				623	
	10b	不妊								
	11b	2001/12/27	2002/6/13	168	♂				657	母体死亡
	12b	不妊								母体剖検
	15b	不妊								母体剖検
	46b	2001/12/11	2002/5/24	164	♀				677	
	58b	不妊								
	61b	2002/1/25	2002/7/5	161	♀				635	
	62b	不妊								
	63b	2002/2/2	2002/7/16	164	♀				624	
	64b	2002/2/4	2002/7/15	161	♀				625	
	対照'	13b	2001/12/5	2002/1/1	27		流産			
30 ng/kg	49b	2001/12/14	2002/6/2	170	♀		2003/9/16	471		F1死亡
	16b	2001/12/23	2002/5/20	148	♀	死産				
	17b	不妊								
	18b	2001/12/11	2002/1/5	25						母体死亡
	19b	不妊								母体剖検
	20b	2001/12/12	2002/5/29	168	♀				672	
	21b	2002/1/21	2002/7/7	167	♂		2004/2/22	595		F1死亡
	22b	2001/12/10	2002/1/4	25		流産				
	23b	2001/12/7	2002/5/18	162	♀		2004/1/24	616		F1切迫
	24b	2001/12/31	2002/6/3	154	♂		2004/1/7	583		F1死亡
	25b	2002/1/23	2002/7/7	165	♂				633	
	26b	2001/12/6	2002/5/23	168	♀				678	
	27b	2002/1/22	2002/7/12	171	♂		2004/3/17	614		F1死亡
	28b	不妊								母体剖検
	29b	不妊								母体剖検
	30b	不妊								母体剖検
	47b	2002/2/9	2002/7/13	154	♂				627	
	50b	2002/1/6	2002/6/23	168	♀				647	
	53b	2001/12/18	2002/5/27	160	♂	死産				
	59b	2002/1/4	2002/6/12	159	♀	死産				母体死亡
300 ng/kg	65b	2001/12/17	2002/6/3	168	♂		2004/1/17	593		F1死亡
	31b	2002/2/4	2002/7/15	161	♂		2004/1/2	536		F1死亡
	32b	2001/12/13	2002/5/24	162	♂	死産				母体切迫
	33b	2002/1/3	2002/6/6	154	♀				664	
	34b	不妊								母体剖検
	35b	2002/1/25	2002/6/21	147	♀				649	
	37b	2001/12/3	2002/1/18	46		流産				
	38b	2002/1/19	2002/6/11	143	♂		2004/3/3	631		黄疸Bill↑, F1切迫
	39b	2001/12/22	2002/6/9	169	♀				661	
	40b	不妊								母体剖検
	41b	2002/2/21	2002/4/22	60		胎児死亡				
	42b	2001/12/10	2002/5/22	163	♂				679	
	43b	不妊								
	44b	2002/1/11	2002/6/24	164	♂				646	
	45b	2001/12/15	2002/6/2	169	♂				668	
	51b	2001/12/25	2002/6/16	173	♂				654	
	57b	不妊								母体剖検
	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				
	67b	不妊								
68b	2002/1/27	2002/7/15	169	♂				625		

厚生労働科学研究補助金(化学物質リスク研究事業)

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
アカゲザル歯形成への影響に関する研究

分担研究者 津賀 一弘 広島大学大学院医歯薬学総合研究科助教授
安田 峯生 広島国際大学保健医療学部教授
(研究協力者 安田 以久 広島大学大学院医歯薬学総合研究科学生)

研究要旨 ダイオキシン類への暴露は次世代の歯の形成に悪影響を及ぼすことがげっ歯類での実験やヒトでの疫学調査により明らかにされつつある。昨年度の研究で、胎生期に母体負荷量 300 ng/kg の TCDD に暴露された死産児あるいは生後死亡児の乳歯に異常がみられることが示されたが、本年度は死亡児の頭部を高分解能 X 線断層装置で観察し、異常を確認するとともに、異常児では歯の石灰化が遅延していることを見出した。また生存児の歯を X 線観察したところ、300 ng/kg では 50% の高頻度に永久歯の一部欠損が認められた。妊娠 80 日に採血して保存してあった母体血漿中の TCDD 濃度を測定したところ、濃度の高いものに児の歯異常が誘発されていたことが明らかになった。

A. 研究目的

歯はダイオキシン類の障害作用に感受性の高い器官とされている。形成中の歯に生じた異常は不可逆的な変化であり、暴露から長期間を経ても検出される。本研究の目的は胎生期・授乳期に TCDD 暴露を受けたアカゲザル児の歯を観察することにより、現行の TDI の妥当性を検討することである。

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 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 80 日に母体血約 20 ml を採取し、血漿を凍結保存した。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、期間を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。この間に死産した児、あるいは生後死亡した乳児、対照群 4 例、30ng/kg 群

8 例、300 ng/kg 群 8 例について上下顎を切り出し、高分解能歯顎顔面用コーンビーム X 線コンピュータ断層装置 (CB MercuRay, 日立メディコテクノロジー) にて撮影、得られたデータを三次元像構築用コンピュータ・ソフトウェア (ExaVision LITE, ザイオソフト) で処理し、得られた画像により歯の形態を立体的に観察した。さらに、歯の石灰化を定量するため、データを三次元画像解析ソフトウェア (CBworks1.0, 日立メディコテクノロジー) で解析した。F1a 生存児については、生後約 1000 日、F1b 生存児については生後約 350 日に塩酸ケタミン 10 mg/kg を大腿部筋肉内に投与して軽く麻酔した後、口腔内を観察し、口腔内デジタルカメラ (クリスタル・カム II, GC) で撮影した。その後、携帯用 X 線発生装置 (KX-60, 朝日レントゲン) と電荷結合素子 (CCD) およびパーソナルコンピュータ・ソフトウェア (Gendex Visualix, Dentsply International, USA) を組み合わせて単純 X 線像を得た。母体血漿中の TCDD

は、クリーンアップ処理後、高分解能ガスクロマトグラフィー／高分解能質量分析法で分析した。

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

対照群死産児上顎の代表的な 1 例のコンピュータ断層再構築立体画像を図 1 に示す。再構築立体画像で軟組織をほとんど描出せず、硬組織でも歯を明瞭に示すような閾値を設定すると、図 1A 右下の像が得られる。標本の全体的な観察には MIP (Maximum Intensity Projection, 最強度投影像、図 1B) も有用である。これを自由に回転し、任意の方向から観察した。昨年度の単純 X 線観察で上顎乳中切歯欠損と診断された死産児 300 ng/kg 群 3G37a の所見を図 2 に示す。上顎では乳中切歯の欠損が確認され (図 2A~C)、下顎では左側乳中切歯切端が右側より舌側に偏位しているのが観察された (図 2D)。このような歯軸のわずかな傾斜は単純 X 線像では観察困難である。

三次元画像解析から求められた石灰化体積を各個体について算出し、受精後日齢と石灰化体積の関係を上下顎別に散布図としてまとめた結果を図 3 に示す。受精後日齢の増加とともに石灰化体積は直線的に増加する傾向を示し、回帰直線は 3 群ともほぼ同じであった (図 3A, C)。対照群と 30 ng/kg 群の点は回帰直線に近く分布し (図 3A, C)、確率楕円も細長い形である (図 3B, D)。しかし、300 ng/kg 群では回帰直線から離れた点が多く、特に形態的異常を示す 3 症例の点は上顎ではすべて回帰直線の下方に分

布し、受精後日齢の割に石灰化が進行していないことを示していた (図 3A)。これに伴い、確率楕円も円に近い形である。下顎では症例 37a の点が回帰直線近くに位置し、正常に近い石灰化を示しており、石灰化の遅延していた上顎とは異なっていた。

生存 F1 の単純 X 線観察により診断された歯の異常所見を表 1 に示す。上顎永久側切歯の欠損がほとんどで、その他に下顎永久中切歯の欠損、下顎永久第 2 臼歯の欠損または形成遅延が認められた。また、生後 380 日に観察されたものには上顎乳中切歯の欠損があった。代表的な生存児前歯部の対照および異常 X 線像を図 4 に示す。生後 1000 日余ではまだ乳歯がかなり残っているが、未萌出の永久歯の異常も診断可能である。

死亡児と生存児の歯異常の頻度を表 2 にまとめて示す。異常は F1a の 300 ng/kg 群に限って認められ、生存児では半数が異常であった。

対照群 5 例、30 ng/kg 群 4 例、300 ng/kg 群 14 例の妊娠 80 日における母体血漿中の TCDD 濃度を測定したところ、対照群では TCDD 濃度はいずれも検出限界以下であった。30 ng/kg 群では 0.19~0.21 pg/g とほぼ同じ濃度であったが、300 ng/g 群では 1.1~8.7 pg/g と濃度にかかなりのばらつきが認められた。TCDD 濃度 2.0 pg/g 以下の母体の児 3 例中に歯の異常を持つ児はなかった。一方、2.1~4.0 pg/g の母体 4 例中歯の異常を持つ児は 1 例であったが、4.1 pg/g 以上の母体 4 例からの児では全例に異常があるなど、母体血漿中の TCDD 濃度依存的に児の歯の異常頻度は上昇していた (図 5)。

D. 考察

本研究の F1 児は乳歯原基形成前か

ら少なくとも永久歯胚形成期まで TCDD に暴露され続けたことになる。従って、本研究で認められた歯の異常が TCDD によるものであるとの推定は、児の発生段階の点からは無理はない。また、歯の異常が 300 ng/kg のみに発現し、対照群と 30 ng/kg では見られなかったこと、300ng/kg 群でも妊娠 80 日の母体血漿中 TCDD 濃度の高かった例に多かったことなどから、TCDD 暴露と児の歯の異常との間に関係があることには疑う余地はない。

げっ歯類では TCDD への胎生期、授乳期暴露による歯形成異常が報告されている。ヒトの疫学調査でもダイオキシン類への暴露と歯の異常の関連を示唆する報告がなされている。サルでも同様の所見が得られたことは、歯がダイオキシンの発生毒性に対して感受性の高い標的であることを示している。永久歯未萌出の F1b 生存児では歯の異常は認められていないが、今後追跡の必要がある。

E. 結論

TCDD の 300 ng/kg 胎生期・授乳期暴露は高率にアカゲザル児の歯形成異常を誘発した。しかし、30 ng/kg 負荷ではこのような影響は認められなかった。現在のわが国での TDI 設定の基礎となったげっ歯類での TCDD の LOAEL 体内負荷量 86 ng/kg はこの中間にあり、本研究結果からは現行 TDI 4 pg/kg は妥当なものと考えられる。

F. 健康危惧情報 なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yasuda I, Yasuda M, Sumida H, Tsusaki H, Inouye M, Tsuga K, Akagawa Y: Effect of *in utero* and

lactational exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin on tooth development in rhesus monkeys. *Organohalogen Compounds*, 64, 431-434, 2003.

2. 学会発表

- 1) Yasuda I, Yasuda M, Sumida H, Tsusaki H, Inouye M, Tsuga K, Akagawa Y: Effect of *in utero* and lactational exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin on tooth development in rhesus monkeys. *Organohalogen Compounds*, 64, 431-434 (Short paper), 2003. (23rd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, August 24-29, 2003, Boston, USA)
- 2) 安田以久, 安田峯生, 隅田寛, 角崎英志, 井上稔, 津賀一弘, 赤川安正: ダイオキシン胎生期暴露のアカゲザル歯形成への影響. 第 43 回日本先天異常学会学術集要旨集, 118 (抄録), 2003. (第 43 回日本先天異常学会学術集会, 2003 年 7 月 2-4 日, 大阪)
- 3) 安田峯生, 安田以久, 隅田寛, 角崎英志, 井上稔, 津賀一弘, 赤川安正: ダイオキシン胎生期暴露のアカゲザル口蓋ヒダ形成への影響. 第 43 回日本先天異常学会学術集要旨集, 119 (抄録), 2003. (第 43 回日本先天異常学会学術集会, 2003 年 7 月 2-4 日, 大阪)

H. 知的財産所有権の出願状況 なし。

表1 生存サル観察個体とその所見

300 ng/kg 群

番号	性別	生後日齢	異常所見	発生率
31a	♀	1122	<u>2 2</u> 欠損	5/10
33a	♂	1141		
35a	♀	1117		
39a	♂	1112	<u>2 2</u> 欠損	
42a	♀	1107		
44a	♂	1107		
60a	♂	1080	<u>2 2</u> 欠損 <u>5 5</u> 欠損または形成遅延	
66a	♂	1030	<u>2 2</u> <u>1 1</u> 欠損	
106a*	♀	380	<u>A A</u> 欠損	
109a*	♂	371		
31b	♂	332		0
33b	♀	372		
35b	♀	357		
38b	♂	367		
39b	♀	369		
42b	♂	387		
44b	♂	354		
45b	♂	376		
51b	♂	362		
68b	♂	332		

* 新規追加

表2 歯形成異常頻度

群	死産と生後死亡児数			生存児数		
	観察児数	歯異常児数	%	観察児数	歯異常児数	%
F1a						
対照群	4	0	0	13	0	0
30 ng/kg	5	0	0	12	0	0
300 ng/kg	8	3	38	8	4	50
300 ng/kg*	2	0	0	2	1	50
F1b						
対照群	2	0	0	11	0	0
30 ng/kg	3	0	0	10	0	0
300 ng/kg	2	0	0	10	0	0

* 新規追加

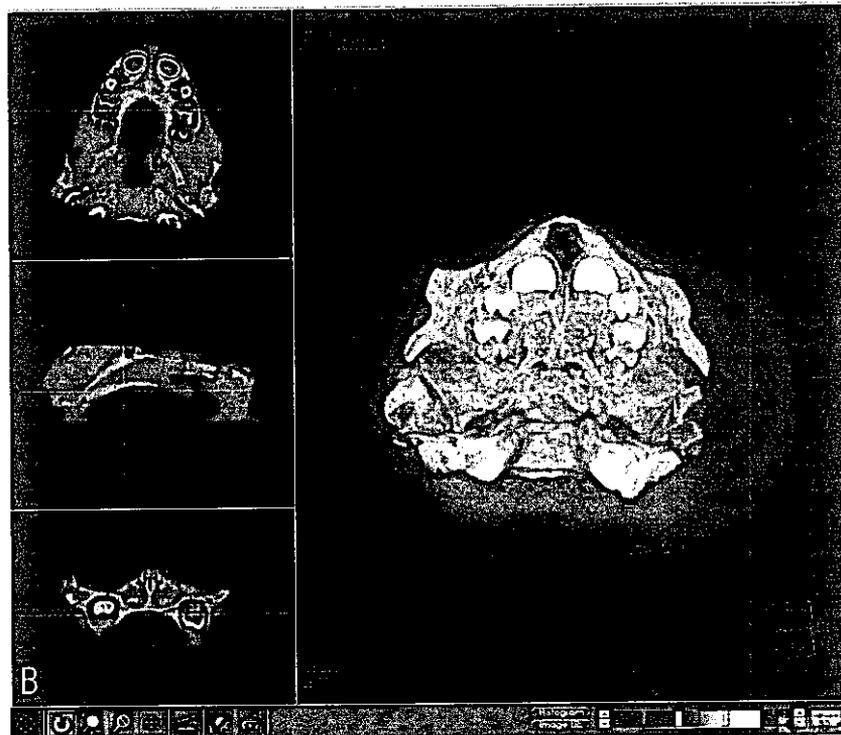
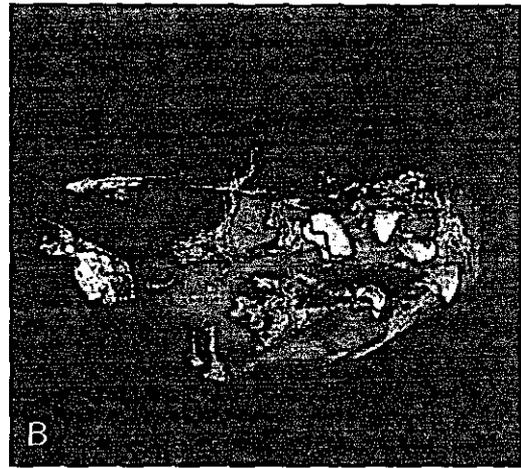


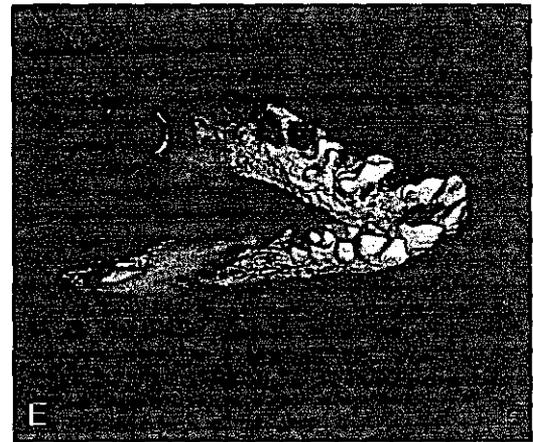
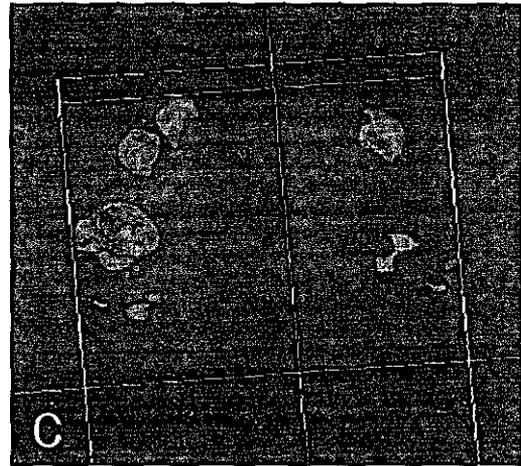
図1 コンピュータ断層造影装置による観察手順

A : 歯の部分のサーフェイス表示

B : 標本全体の MIP



3G37a 300 ng/kg 群, 上顎
 A: 下面
 B: 右斜下側面
 C: 石灰化表面 (surface), 下面



3G37a 300 ng/kg 群, 下顎
 D: 上面
 E: 右斜上側面
 F: 石灰化表面 (surface), 前面



図2 コンピュータ断層再構築画像

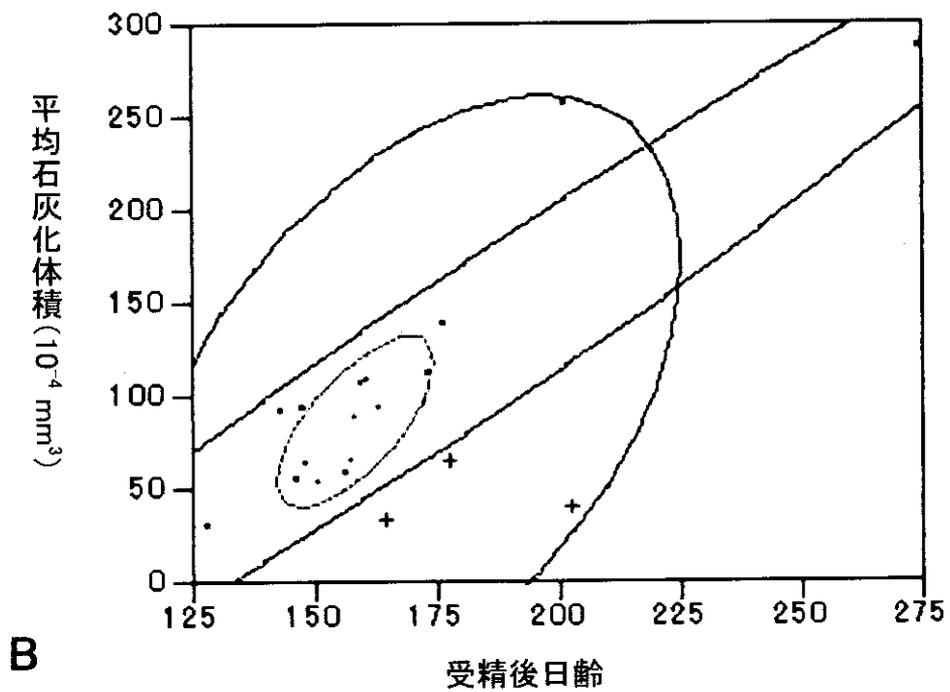
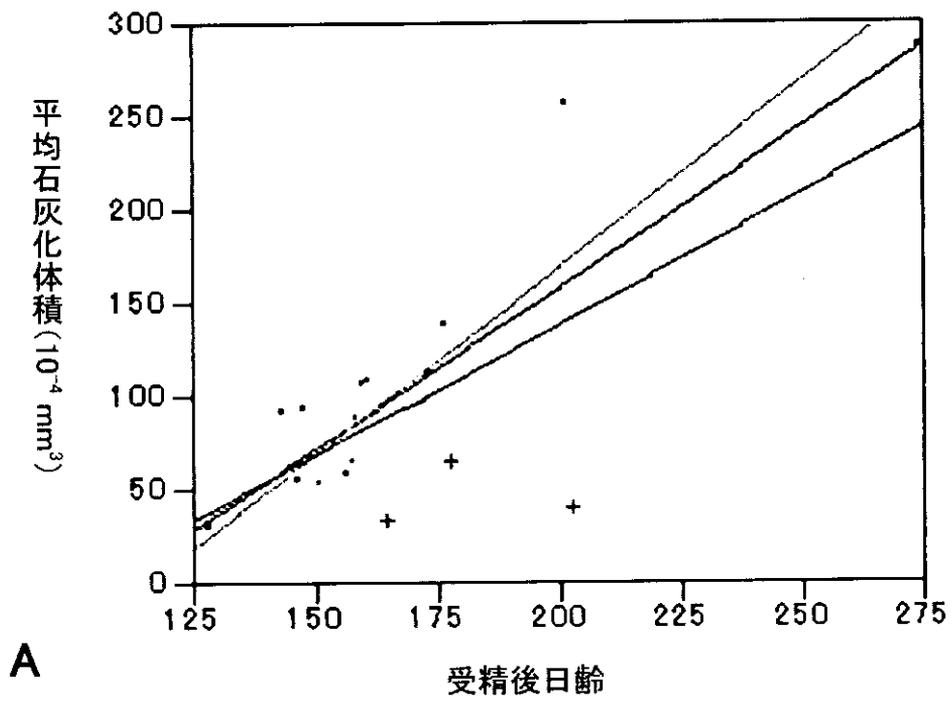


図3 受精後日齢と上顎歯の石灰化体積 (Volume)

A: 回帰直線 B: 90%確率楕円

青: 対照群 緑: 30 ng/kg 群 赤: 300 ng/kg 群 +: 異常例

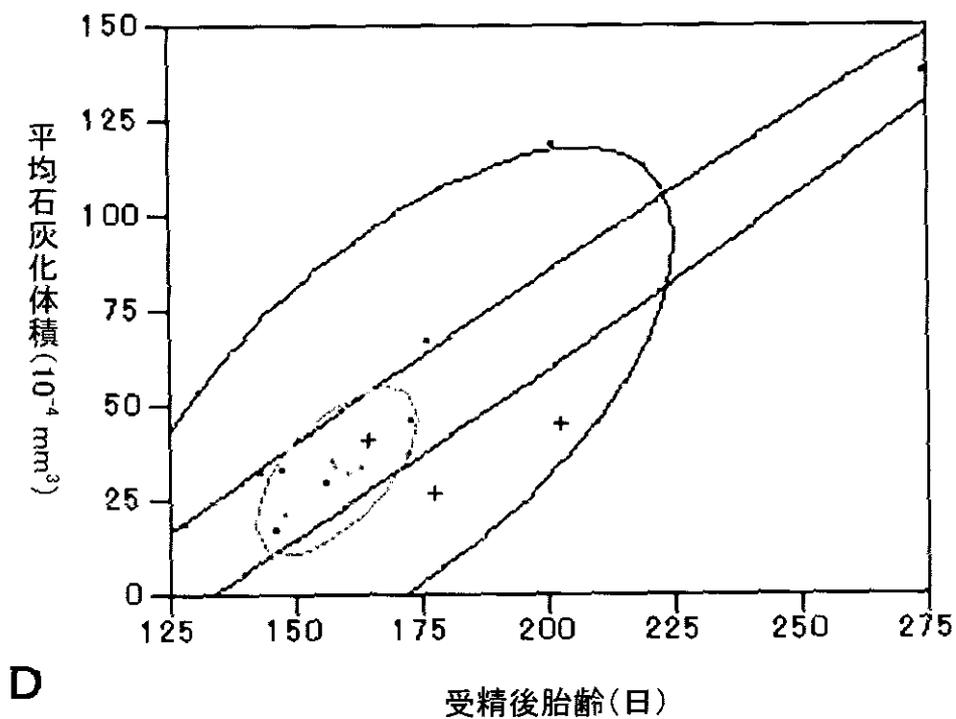
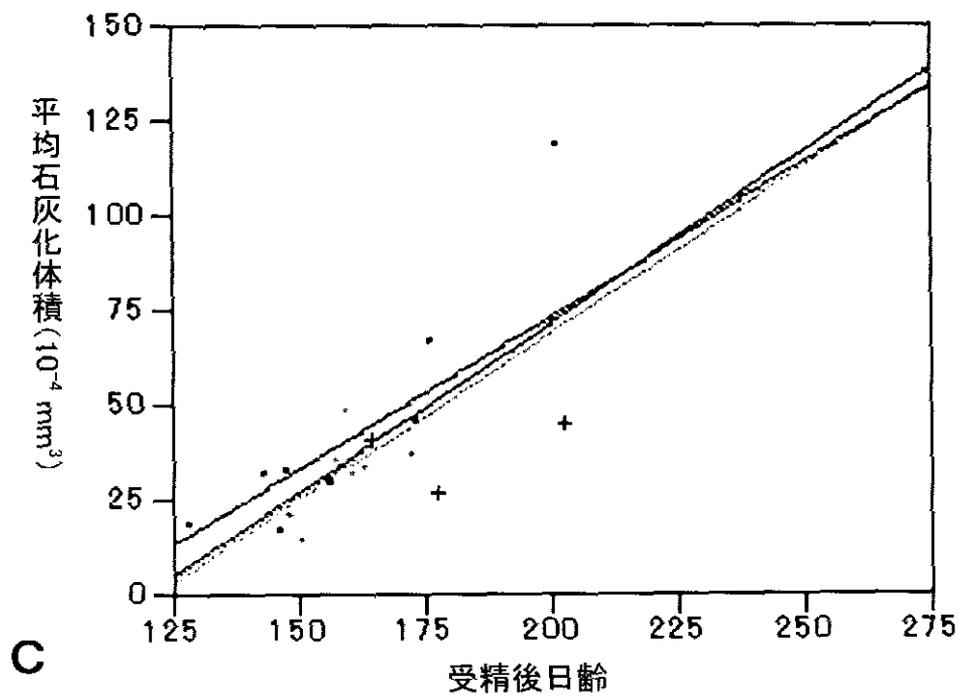


図3 (続き) 受精後日齢と上顎歯の石灰化体積 (Volume)

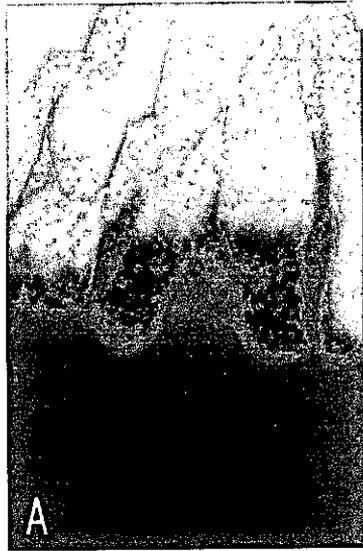
A: 回帰直線 B: 90%確率楕円

青: 対照群

緑: 30 ng/kg 群

赤: 300 ng/kg 群

+ : 異常例



対照群 01a 上顎右側
(1049)



対照群 01a 上顎左側
(1049)

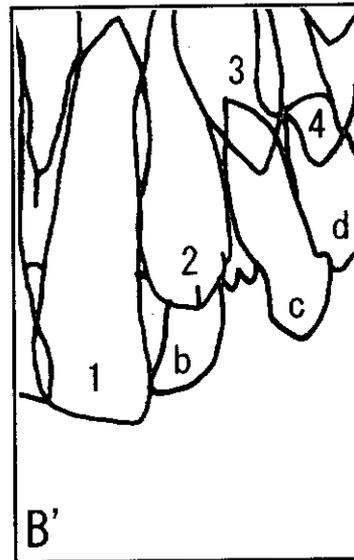
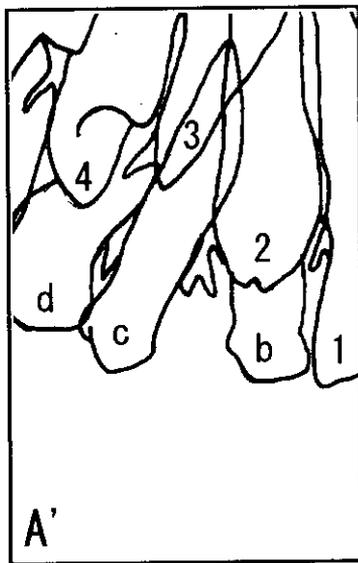


図4 生存児の対照および異常X線所見とその線描

上段：X線像 下段：その線描

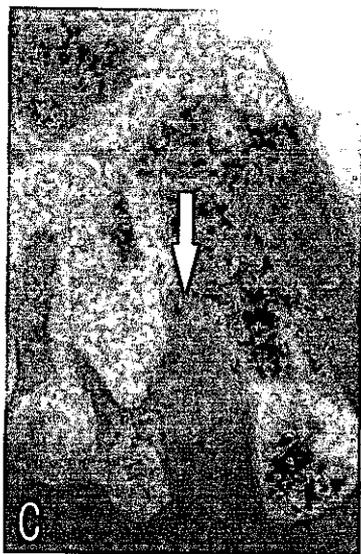
X線像の下に群， 個体番号， () 内に日齢を記す。矢印は欠損を示す。

線描のアルファベット小文字は乳歯 a：第1乳切歯， b：第2乳切歯， c：乳犬歯，

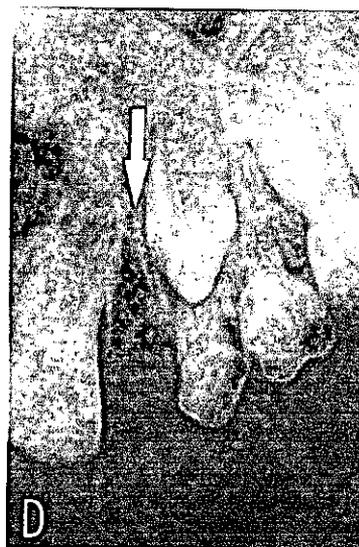
d：第1乳臼歯， e：第2乳臼歯

アラビア数字は永久歯 1：第1切歯， 2：第2切歯， 3：犬歯， 4：第1小臼歯，

5：第2小臼歯， 6：第1大臼歯



300 ng/kg 群 31a 上顎右側
(1041)



300 ng/kg 群 31a 上顎左側
(1041)

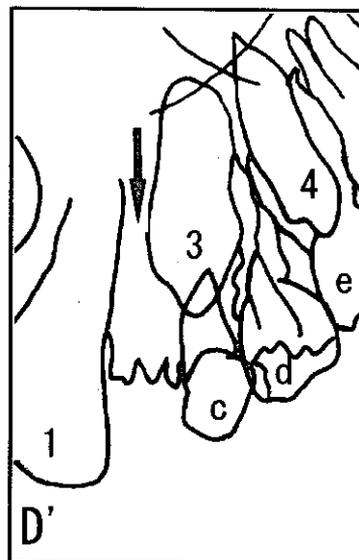
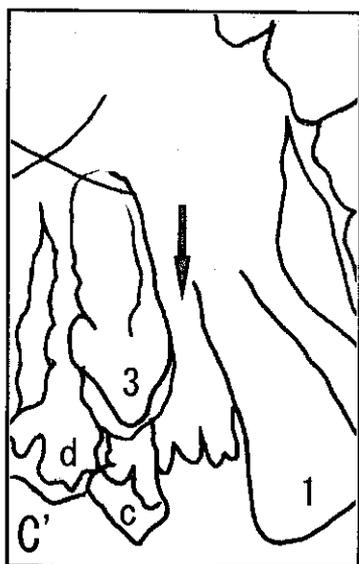


図4 生存児の対照および異常X線所見とその線描 (続き)
矢印：上顎第2切歯欠損部

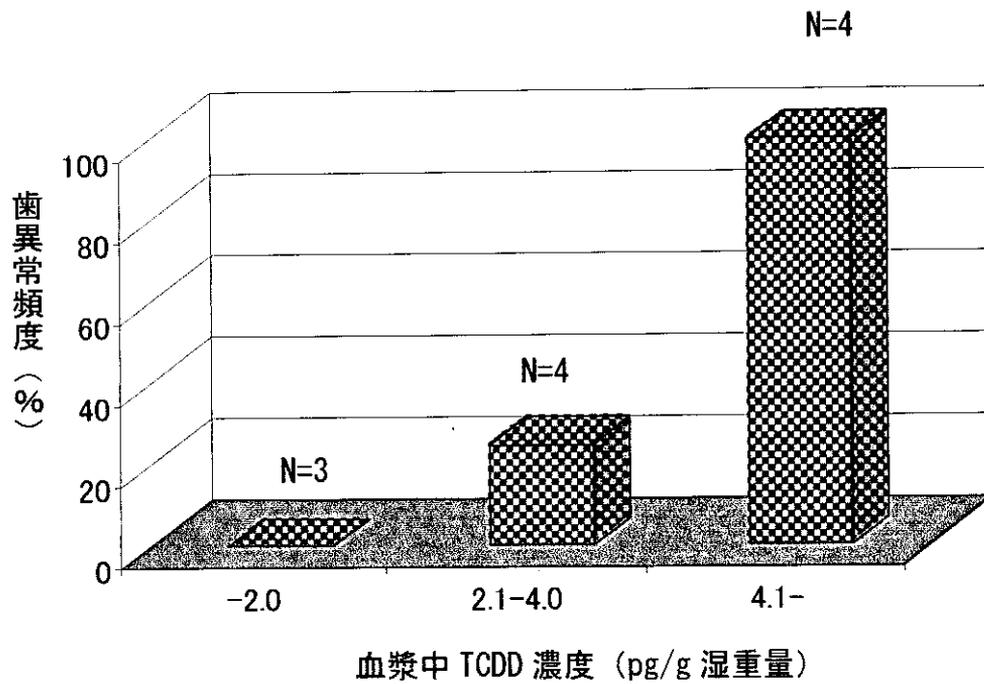


図5 母体血漿中 TCDD 濃度と歯異常の関係

TCDD 濃度 2.0 pg/g 以下の 3 例では歯異常なし，2.1-4.0 pg/g の 4 例では 1 例，4.1 pg/g 以上の 4 例では全例に歯異常と，濃度と反応に関連が認められる。