

響が期待できないと考えられたので、実験を中止した。

溶媒

- (1) 名称：コソイル(カラテスカ)
- (2) ロット番号：V5T6868
- (3) 保存条件：室温・暗所

1,2,3,4,7,8-HxCDD 試験の化合物

被験物質-1

① 名称：1,2,3,4,7,8-HxCDD(和光純薬) ② ロット番号：A7090087

③ 保存条件：密封して冷暗所。

被験物質-2 および溶媒に関しては TCDD の場合と同じ。

投与量および群構成

TP の用量については、通常の HB 試験に用いられている用量として 0.5 および 1.0mg/kg を採用した。

2,3,7,8-TCDD については、顕著な毒性徴候が認められず、かつ生殖機能に影響が認められている用量として 5 μ g/kg/day の用量を設定した。

1,2,3,4,7,8-HxCDD については、TEF に鑑みて 50 μ g/kg/day を TCDD と同じ影響が見られる用量と考えてその用量を選択した。

動物及び処置

近交系ウィスターイマミチラットを用い、6週齢で精巣摘出を実施する。動物は内部を陰圧に保ったヘパフィルター装着のアイソラック内(動物室内は陽圧)維持する。

TCDD(po)または HxCDD(po)1 回投与するとともに TP(sc) を 14 日間投与する。投与液量は 0.1ml/100gBW とする。

その他の飼育環境等については以下の通りである。飼育ケージ・飼育密度およびケージの識別

馴化・検疫期間および投与期間中を通してポリカーボネート製ケージ(260W×360D×180Hmm)に最大2匹ずつ収容する。投与開始前までは、ケージに床敷き(クリーンチップ：千葉アニマル資材(株))を入れ、投与期間中はステンレス製の網床をケージ底に敷く。

各ケージにはコード番号、試験名、投与量および動物番号を示すラベルおよび群を示すカラーテープを貼付する。

飼料および飲料水

①飼料の種類：マウス・ラット・ハムスター飼育用放射性滅菌固型飼料 CRF-1(リド 30、生産者：オリエンタル酵母バイオ(株))を自由摂取させる。

② 飲料：試験期間中、ポリカーボネート製給水ビンにより自由摂取させる。

動物室への入退室および器材搬入・搬出方法

① 実験者：手指をアルコールで消毒し、オートクレーブ滅菌した衣類、帽子、マスク、手袋を着用し、エアシャワーを浴びた後、長靴にはきかえ入室する。退出時は、エアシャワーを浴びた後、衣類を着替える。

② 器材：オートクレーブ滅菌、またはアルコール消毒後搬入する。

観察および検査項目

(1) 一般状態

試験期間中、生死および一般状態を1日1回観察する。異常が認められ場合、観察日、観察時間、症状の種類および程度を記録する。動物が死亡した場合は肉眼的病理検査を行う。動物が瀕死の場合切迫屠殺し、エーテル麻酔後採血および解剖を実施する。

(2) 体重測定

投与開始日(投与0日)、投与7日および14日目(解剖日：最終投与日の翌日)に行う。

(3) 解剖検査

①採血

解剖日にエーテル麻酔下で腹大動脈より全採血する。血液は試験管にとり、遠心分離(3000rpm、10min)し、血清を得る。得られた血清は-80℃で保管する。

②剖検

採血後、肉眼病理解剖を行う。

③臓器重量

肝臓、精巣上体、前立腺腹葉、精嚢腺(凝固腺・貯留液を含む)、球海綿体筋および胸腺の重量を測定する。

④病理組織学的検査

秤量後、秤量臓器は前立腺腹葉を10%中性ホルマリン液で固定し保存する。

C. 結果

表1に TCDD の HB 試験における体重変化、臨床症状および最終剖検時の臓器重量を示す。図1から5にそれぞれ、精巣上体、前立腺腹葉、精嚢、

肛門挙筋および胸腺の重量変化を図示する。

TCDD の雄性副生殖器の重量増加抑制作用についてはいずれの TP の用量でもほとんど抑制しなかったが、各副生殖器について 1mg/kgTP での反応を TCDD がやや強く抑制するという類似したパターンが認められた。一方で、TP に対する反応率（重量増加作用）および TCDD によるその抑制作用においては各副生殖腺で大きく異なっていた。これとは対照的に、胸腺については TP による用量相関的な重量減少を TCDD はさらに低下させた。その低下の割合は平行的で、TP と TCDD の反応が相加的であることを示唆していた。

D. 考察

胸腺の重量変化から考えて、今回選択した TCDD の用量で、動物に対して十分に影響があったと考えられた。副生殖腺について AR-AhR の相互作用を見るには TCDD のこの用量では不十分であった可能性がある。しかし、発生期における母体投与では明らかに雄性副生殖器は影響を受けるので、成熟動物での AR-AhR 相互作用は胎生期とは異なっている可能性がある。成熟動物での雄性副生殖器の反応を指標として TEF を求める試みをするのは少し無理がある可能性がある。

HxCDD については、今回の TCDD の用量によって TP による去勢動物の雄性副生殖器重量増加をほとんど抑制しなかったので、予定されていた 50 μ g/kg の投与ではほとんど影響が期待できないと予想され、大量の剤を必要とするため、今回は断念した。

E. 結論

5 μ g/kg TCDD の 0.5, 1 μ g/kg/dayTP による精巣摘出ラットでの雄性副生殖器重量増加に対する抑制効果は、精巣上体、前立腺腹葉、精嚢、肛門挙筋でほとんど認められなかった。胸腺での TP による用量相関的な重量減少は TCDD により平行移動型でさらに減少した。後者は相加的な反応と考えられた。AR-AhR 相互作用での抑制作用については胸腺の反応からみて飽和している可能性が考えられたので HxCDD との相対力価を求めることを断念した。胸腺の重量減少については相対力価をもとめることができる可能性が残っているが、作用機序

等不明な点が多く、今後より基礎的なアプローチが必要になると考えられた。

昨年の E2 の UT の実験からの類推として、致死作用に基づく TEF が必ずしも、その他の生理作用（毒性を含む）に当てはまらないと考えられた。

F. 研究発表

発表論文

1. Aoyama, H. and K. Suzuki (2003)
Enhanced one-generation reproductive toxicity study in rats for detecting endocrinedisrupting effects of chemicals. *Pure Appl. Chem.* 75. Nov. 11-12. 2497-2501. [Proc. Int. Symposium SCOPE/IUPAC (Yokohama 2002)]

2. Suzuki, H., M. Yagi, M. Okada, K. Saito and K. Suzuki (2004)

Dysplastic development of seminiferous tubules and interstitial tissue in rat hypogonadic hgn/hgn testes. *Biol. Reprod.* (04/02/25 accepted)

鈴木勝士(2003) 獣医学領域の遺伝性疾患(II)、*Small Animal Clinic* 130: 13-18

4. 鈴木勝士、他 97 名 (2003) *メルク獣医マニュアル*、第 8 版、長谷川篤彦、山根義久監修、(分担分：繁殖管理、豚、羊、小動物、雄の繁殖の健康検査、家畜での胚移植、発情のホルモンによる制御 p1460-1494) (Susan E. Aiello Ed., *The Merck Veterinary Manual*, eighth ed., Merck & Co Ltd., Whitehouse Station, NJ, U.S.A., 1998) 学窓社、東京、pp2287

5. 鈴木勝士、他23名 (2003) 一色賢司、豊田正武、西島基弘編集、*食品の安全性評価と確認*、(分担、第 4 章 残留農薬の安全性確認と実用的評価法87-98) ソフトサイエンス、東京

口頭発表

6. 齊藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士 (2003) 高周波

照射が鶏の主要臓器におよぼす影響、第 22 回宇宙エネルギーシンポジウム (抄録 p52-56)

7. 鈴木勝士 (2003) 化学物質の繁殖に対する影響解析、化学物質の内分泌かく乱作用に対する研究の現状と課題、日本農薬学会シンポジウム

8. 鈴木浩悦、小山絵里子、八木未央、斉藤賢一、鈴木勝士 (2003) 性腺形成不全症ラットの解析：器官培養系による異常の再現系と物理地図上の原因遺伝子存在領域の決定、第 135 回日本獣医学会

9. 小山絵里子、鈴木浩悦、斉藤賢一、鈴木勝士 (2003) ラット生殖腺の器官培養系におけるトリブチルスズの影響の評価、第 135 回日本獣医学会

10. 佐々木哲、小笠原慶、斉藤賢一、鈴木勝士 (2003) 骨軟骨形成不全症ラットの解析：Blast search を用いた contig の作成による物理地図上での原因遺伝子 (ocd) 存在領域の特定、第 135 回日本獣医学会

11. 八木未央、小山絵里子、栗原孝宏、鈴木浩悦、斉藤賢一、鈴木勝士 (2003) 精巣形成不全症 (hgn/hgn) ラットの胎生期病態発生に関する調査、第 135 回日本獣医学会

12. 竹中基郎、鈴木浩悦、斉藤賢一、鈴木勝士 (2003) LDE (lethal dwarfism with epilepsy) ラットの精巣における病変の内分泌学的評価、第 135 回日本獣医学会

13. 鈴木勝士、斉藤賢一、小山絵里子、竹中基郎、八木未央、鈴木浩悦 (2003) ビスフェノール A 投与による初期鶏胚での発生攪乱 (第 3 報)、第 43 回日本先天異常学会

14. 鈴木浩悦、小山絵里子、斉藤賢一、鈴木勝士 (2003) ラット中腎-生殖腺器官培養系におけるトリブチルスズ (TBT) の影響、第 43 回日本先天異常学会

15. 鈴木勝士、斉藤賢一、小山絵里子、竹中基郎、八木未央、鈴木浩悦 (2003) ビスフェノール A 投与による初期鶏胚の発生に及ぼす影響、第 30 回日本トキシコロジー学会

16. 竹中基郎、鈴木浩悦、斉藤賢一、鈴木勝士 (2003) LDE (lethal dwarfism with epilepsy) ラットの原因遺伝子は第 19 番染色体上に存在している、第 136 回日本獣医学会

17. 安齋有希子、鈴木浩悦、斉藤賢一、鈴木勝士 (2003) ラット突然変異系統の体重増加と繁殖成績に及ぼす飼料の影響、第 136 回日本獣医学会

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

Table 1 Fate, Clinical Findings, Body Weights and Organ Weights of Males

Dose(TCDD) $0 \mu\text{g}/\text{kg}$	$0 \mu\text{g}/\text{kg}$	$0 \mu\text{g}/\text{kg}$	$5 \mu\text{g}/\text{kg}$	$5 \mu\text{g}/\text{kg}$	$5 \mu\text{g}/\text{kg}$	
Dose(TP) $0 \text{mg}/\text{kg}$	$0.5 \text{mg}/\text{kg}$	$1 \text{mg}/\text{kg}$	$0 \text{mg}/\text{kg}$	$0.5 \text{mg}/\text{kg}$	$1 \text{mg}/\text{kg}$	
No. of animal	6	6	6	6	6	
Fate tk	6	6	6	6	6	
Clinical finding	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	
Body weight [g]						
Day 0	20 \pm 9.18	20 \pm 6.31	20 \pm 5.82	20 \pm 5.68	20 \pm 5.73	20 \pm 5.62
Day 7	23 \pm 10.3	26 \pm 10.6 **	26 \pm 8.57 **	23 \pm 8.52	25 \pm 10.2 *	26 \pm 10.2 **
Day 14	27 \pm 10.2	31 \pm 13.6 **	30 \pm 13.7 **	26 \pm 9.70	29 \pm 12.3 **	29 \pm 13.7 **
Organ weight						
Liver[mg]	12.3 \pm 0.26 (4.5 \pm 0.23)	16.1 \pm 1.13 ** (5.0 \pm 0.16)	15.4 \pm 1.66 ** (4.9 \pm 0.41)	15.3 \pm 0.93 ** (5.8 \pm 0.34)**	18.9 \pm 1.36 ** (6.3 \pm 0.47)**	17.9 \pm 1.08 ** (5.9 \pm 0.30)**
Pituitary[mg]	8.1 \pm 1.15 (3.0 \pm 0.35)	8.7 \pm 0.98 (2.7 \pm 0.29)	8.3 \pm 1.31 (2.6 \pm 0.37)	8.0 \pm 1.20 (3.0 \pm 0.36)	8.6 \pm 1.44 (2.9 \pm 0.44)	7.8 \pm 1.15 (2.6 \pm 0.33)
Epididymus[mg]	90.2 \pm 14.0 (33.4 \pm 5.27)	256 \pm 11.4 ** (80.7 \pm 4.86)**	280 \pm 28.8 ** (90.8 \pm 9.54)**	92.8 \pm 13.0 (35.3 \pm 4.90)	251 \pm 33.0 ** (84.6 \pm 14.1)**	274 \pm 30.7 ** (92.0 \pm 9.86)**
Prostate [mg]	15.6 \pm 2.23 (5.7 \pm 0.94)	201 \pm 27.7 ** (63.7 \pm 10.5)**	236 \pm 55.3 ** (75.9 \pm 16.2)**	13.0 \pm 4.38 (4.9 \pm 1.70)	209 \pm 31.1 ** (70.3 \pm 11.3)**	220 \pm 42.9 ** (73.9 \pm 16.1)**
Seminal vesicle [mg]	32.2 \pm 5.51 (12.0 \pm 2.31)	72 \pm 96.6 ** (22.7 \pm 27.1)**	99 \pm 100 ** (32.2 \pm 43.1)**	30.7 \pm 5.65 (11.7 \pm 2.28)	70 \pm 147 ** (23.7 \pm 48.2)**	91.5 \pm 54.1 ** (30.7 \pm 26.5)**
M. bulbos [mg]	79.4 \pm 12.0 (29.3 \pm 3.53)	42 \pm 45.9 ** (13.3 \pm 19.0)**	48 \pm 115 ** (15.5 \pm 33.4)**	76.7 \pm 25.3 (29.2 \pm 9.92)	41.9 \pm 56.8 ** (14.1 \pm 22.9)**	40 \pm 115 ** (13.5 \pm 41.1)**
Thymus [mg]	103 \pm 116 (38.1 \pm 37.0)	784 \pm 121 ** (246 \pm 28.2)**	702 \pm 99.2 ** (227 \pm 26.5)**	742 \pm 102 ** (282 \pm 33.4)**	603 \pm 84.1 ** (202 \pm 30.9)**	507 \pm 51.1 ** (170 \pm 16.2)**

tk : Ter NAD : Not abnormality detected

(): Liver (organ weight / body weight at day 14) \times 100

Other organ weight (organ weight / body weight at day 14) \times 100000

*: Significantly different from control value at $P < 0.05$.

**: Significantly different from control value at $P < 0.01$.

图1 精巢上体重量

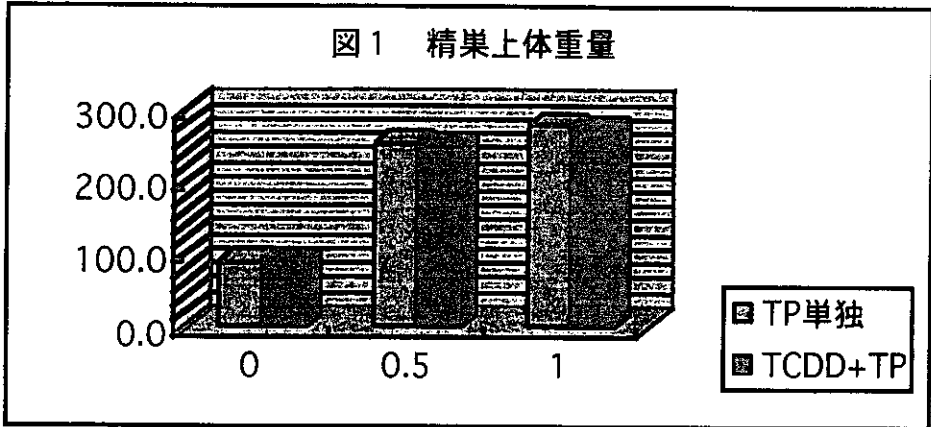


图2 前立腺腹葉重量

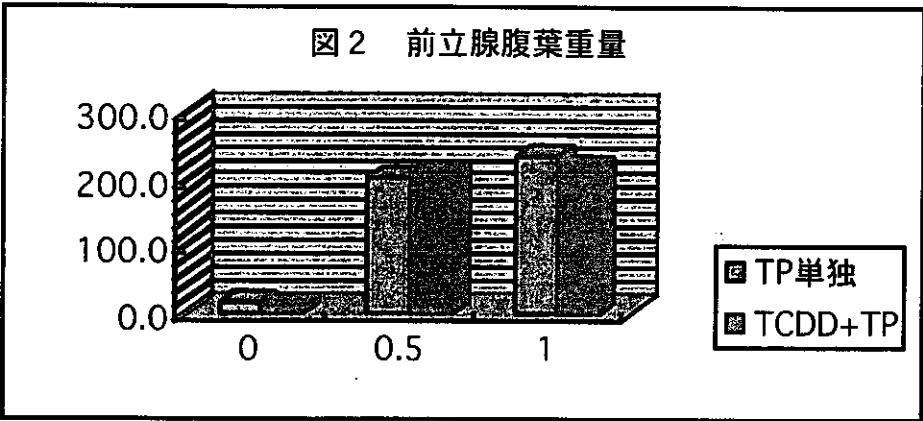


图3 精囊重量

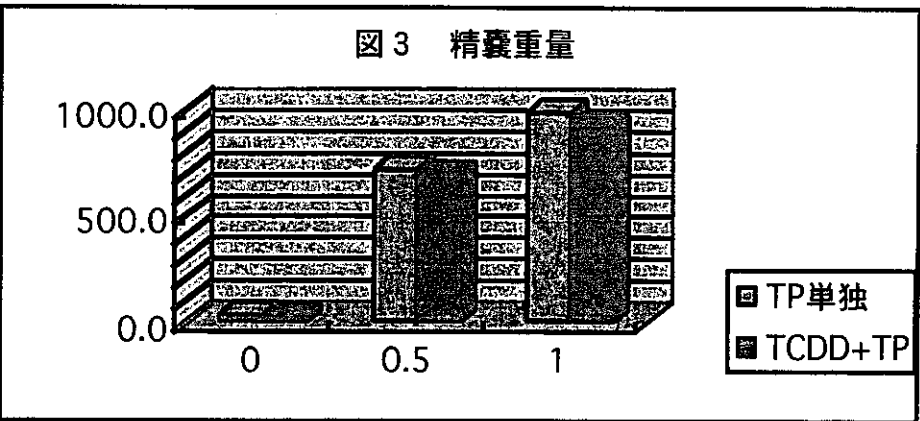


图4 肛門挙筋重量

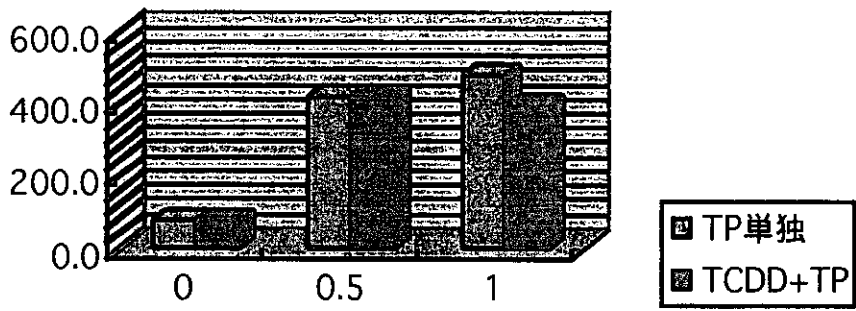
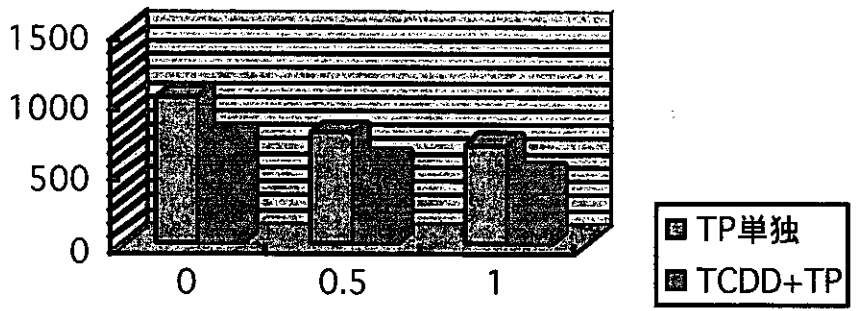


图5 胸腺重量



平成15年度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

ダイオキシン類の幼若ラットに対する誘起排卵抑制モデルにおける Toxic Equivalency
Factors (TEF) の検証

松木 容彦、代田 真理子（財）食品薬品安全センター秦野研究所

高木篤也 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

ダイオキシン類の幼若ラットに対する誘起排卵抑制モデルを、2,3,7,8-tetrachloro dibenzo-*p*-dioxin (TCDD) を用いて追試したが、卵巣には既報に示された変化が全く認められなかった。今年度は、まず、追試で採取した卵巣試料について TCDD 濃度および cytochrome P450 (CYP) 1A1 mRNA 発現量を測定し、TCDD が卵巣に到達し、誘起排卵後まで残存してその間 aryl hydrocarbon receptor (AhR) を活性化していることを確認した。次に、既報より高い用量の TCDD を用いて、既報が再現されないことを確認するとともに、卵胞発育に関連する数種の遺伝子を定量したが、投与の影響は認められなかった。さらに、TCDF (TCDF) を投与して組織中濃度および影響を TCDD 投与によるものと比較したところ、1) TCDF の肝臓における残留性は TCDD と比較して乏しく、重量にも影響を及ぼさないこと、2) 胸腺および卵巣中濃度は TCDD と同様であったが、卵巣には用量に依存した CYP1A1 の誘導は行わないこと、3) TCDF の TEF はエンドポイントによって異なっていた。

A. 研究目的

ダイオキシン類の生体影響評価において用いられている Toxic Equivalency Factors (TEF) が、雌性生殖に対する影響評価にも適用するという科学的実証は充分に行われていない。本研究は、ダイオキシン類の雌性生殖に及ぼす影響評価においても TEF が適用され得るかどうかを、Gao ら（1999、2000）が、ダイオキシン類の前投与によって抑制すると報告している、幼若ラットに対する誘起排卵モデルを用いて検証しようとするものである。

昨年度までに、2,3,7,8-tetrachloro dibenzo-*p*-dioxin (TCDD) を用いて既報を追試したが、肝臓および胸腺重量はそれらの組織中 TCDD 濃度の増加に伴って変化し、投与後 96 時間には有意な相関が認められたのに対し、排卵数および卵巣重量は排卵検査時まで血漿中に TCDD が検出された用量でも既報のような変化は認められなかった。今年度は、本モデルが TEF の検証に有用であるのかどうかを確認するために、まず、これまでに採取した卵巣

試料について TCDD の濃度測定ならびに遺伝子発現の定量解析を行い、既報が追試されない原因ならびに遺伝子レベルでの影響の有無について検討した（卵巣試料における TCDD の動態ならびに遺伝子発現の定量解析）。さらに、既報より高い用量の TCDD を投与して既報の再現性の有無を確認した。また、同時に、TEF が 0.1 とされている TCDF (TCDF) を TCDD と同じ用量投与して、肝臓、胸腺および卵巣における濃度と影響について TCDD と比較した（TCDD 投与による既報再現性の確認と TCDF 投与との組織中濃度ならびに影響の相関性に関する比較）。

B. 研究方法

1) 卵巣試料における TCDD の動態ならびに遺伝子発現の定量解析

卵巣試料は、平成 14 年度の研究において採取し、凍結（左側）あるいは保存液 (RNAlater) に侵漬（右側）したものを、それぞれ、TCDD 濃度測定および遺伝子発現の定量解析に用いた。同研究

では、24 日齢の午前9時に、TCDD の媒体であるコーン油、あるいはTCDD の1、4あるいは16 µg/kg (既報において、排卵数が50%以下に抑制された量を上回る量)を経口投与し、その24 時間後にウマ絨毛性性腺刺激ホルモン (eCG) 5IU を皮下投与して96 時間以上経過した後に排卵検査を行った。この間、動物を経日的に剖検して、TCDD 投与後6時間 (媒体および16 µg/kg 投与群のみ)、TCDD 投与後72時間 (eCG 投与後48時間、媒体および16 µg/kg 投与群のみ) ならびにTCDD 投与後96 時間 (排卵検査時、全投与群) に各群各ポイント6匹から卵巣を採取した。

卵巣組織中のTCDD 濃度は、ELISA によって測定した。測定方法は、平成14 年度報告に示したとおりであるが、投与後6時間は個別に測定し、それ以外は、ポイント毎に各個体の試料を合わせて一試料として測定した。

卵巣組織に発現する mRNA 類は、麻布大学生物科学総合研究所 (代田 欣二教授) の協力を得て、Real-Time PCR 装置 (PRISM7700, Applied Biosystems 社) を用いて測定した。測定に先立って、保存液を除去した卵巣を破砕用ビーズとともに ISOGEN (日本ジーン) を入れたチューブに入れ、機械的に破砕した。さらに、ISOGEN の処方に従って総 RNA を抽出し、これを DNA 分解酵素で処理して、クロモソーム由来の DNA を除去した。次に、これを鋳型として SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen 社) を用いて、Real-Time PCR に用いる cDNA を合成し、平成14 年度本研究において確立したシステムを用いて CYP1A1、inhibin α inhibin/activin β A および β B、cytochrome P450 aromatase をコードする mRNA 発現量を測定した。得られた測定値は、同じ試料について測定したハウスキーピング遺伝子の glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA 量に対する相対量として算出し、さらに、CYP1A1 以外の遺伝子発現量は TCDD 投与後6時間における対照群の相対発現量を1としたときの値で表した。

2) TCDD 投与による既報再現性の確認と TCDF 投与との組織中濃度ならびに影響の相関性に関する比較

動物実験

国立医薬品食品衛生研究所において、実施した。実験には、昨年度までの実験と同様に、Sprague-Dawley (SD) 系 [Crj:CD (SD) IGS, SPF] (日本チャールスリバー、厚木飼育センター生産) の幼若雌ラット30 匹を購入して用いた。動物は午前8時点灯、午後8時消灯の12 時間照明環境下で養母に哺育させ、21 日齢に離乳して6匹ずつ5群に分けて群毎に飼育した。その後、24 日齢の午前10 時に体重を測定してTCDD あるいはTCDF を経口投与した。既報において、32 µg/kg のTCDD によって全例の排卵が抑制されたとの報告があることから、TCDD の用量は、これまでの研究において高用量に設定した16 µg/kg とその4倍量の64 µg/kg を選定した。また、TCDF はTCDD と同一の用量とし、対照群には媒体であるコーン油を同様に投与した。なお、本研究で使用した飼育施設の照明点灯時刻は1) の実験で使用した施設と比較して1時間遅いので、eCG の投与時刻を1時間遅らせる必要があったために本実験ではTCDD/TCDF の投与時刻も1) の実験より1時間送らせた。また、コーン油、TCDD およびTCDF の投与容量は、1) の実験では5 mL/kg であったが、本実験では6.4 mL/kg とした。これらの動物はTCDD 投与後24 時間の25 日齢に体重を測定してeCG5IU を1回皮下投与し、その後72 時間に体重を測定して剖検した。なお、本実験に先立ち、本実験の使用施設において、本実験に使用したのと同系統のラットを、同一条件で購入飼育し、25 日齢の午前10時にeCG5IU を1回皮下投与して、72 時間後に全例に排卵が誘起されることを確認した。

観察および標本の採取

剖検に先立ち、動物をエーテル麻酔し、放血して致死させ、肝臓、胸腺、卵巣および子宮を採取し、それらの重量を測定した。また、卵管を採取し、実体顕微鏡下で、黄体数、および排卵数を数えた。右側卵巣は、氷冷保存液 (RNAlater) に浸漬し、4°C で保管した後、-20°C で保存した。各群の3匹から得られた左側卵巣、全例の胸腺および肝臓はTCDD/TCDF 濃度測定まで、-20°C で保存した。各群の残りの3匹から得られた左側卵巣は、ブアン液に約24 時間固定した後、70%エタノールに浸漬して保管した。

生体試料中のTCDD 濃度測定

生体試料の前処理は、平成14 年度報告に示した

とおりで、Dioxin ELISA Kit (和光純薬)を用い、標準品の TCDD あるいは TCDF は Cambridge Isotope Laboratories から購入して用いた。

卵巣に発現する遺伝子の定量

1) に述べた方法で、CYP1A1、inhibin α 、inhibin/activin βA および βB をコードする mRNA 量を測定し、GAPDH mRNA 量に対する相対量を算出した。さらに、CYP1A1 以外の遺伝子発現量は対照群における発現量を 1 としたときの相対値で表した。

統計解析

得られた成績は、5%を有意水準として分散分析を用いて解析した。分散分析で有意差が認められた項目については、Dunnett の多重比較検定あるいは Student's t-test を用いてコーン油投与群との有意差を検定した。また、回帰分析を行って用量反応性の有無について解析した。

倫理面への配慮

使用した飼育施設の規定に従って動物実験を行った。また、ダイオキシン類の取り扱いに関しては EPA Method 8280 に準拠して実施した。

C. 研究結果

1) 卵巣試料における TCDD の動態ならびに遺伝子発現の定量解析

卵巣における TCDD 濃度の推移を図 1A に、CYP1A1 発現量を図 1B に示した。また、卵胞発育に関連したタンパク質をコードする各遺伝子の発現量を図 2 に示した。

TCDD を 16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 経口投与すると、各測定時点の中で、投与後 6 時間の値が最も高く、その後、漸減して投与後 72 時間には約 4 分の 1 のレベルになったが、排卵検査を行った、投与後 96 時間においても前日と同様のレベルを保っていた。投与後 96 時間には、4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下の投与群についても卵巣中の濃度を測定したが、いずれの群においても TCDD が検出され、その濃度は TCDD の用量に依存していた。卵巣における CYP1A1 mRNA 相対値は、卵巣中 TCDD 濃度と類似したパターンで推移し、投与後 96 時間では、4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群において検出され、16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ では対照群との間に有意差が認められた。

卵巣における卵胞発育関連タンパク質の mRNA 測定結果を図 2 に示した。定量した mRNA のうち、inhibin α (図 2A) および aromatase の発現量 (図

に示さず) にはいずれの時期も対照群と TCDD 投与群との間で有意差は認められなかった。Inhibin/activin β 鎖については、TCDD 投与後 72 時間の排卵前までの時刻には対照群と TCDD 投与群との間で有意差は認められなかったが、排卵検査を行った TCDD 投与後 96 時間では、 βA 鎖が 16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群において、また、 βB 鎖が 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群において対照群と比べて、発現量が有意に低下していた (図 2B、C)。

2) TCDD 投与による既報再現性の確認と TCDF 投与との組織中濃度ならびに影響の相関性に関する比較

体重増加、器官重量、排卵数、組織中 TCDD/TCDF 濃度ならびに遺伝子発現量を図 3~7 に示した。また、TEQ で表示した投与用量あるいは組織中ダイオキシン類濃度とダイオキシン類投与により影響の認められたエンドポイント類との回帰グラフを図 8 および 9 に示した。

体重増加 (図 3) は、TCDD 64 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で抑制が認められ、排卵検査を行った TCDD 投与後 96 時間には、対照群との間に有意差も認められたが、その他の投与群は対照群と同様に推移した。

排卵検査では、TCDD 16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の 1 例を除き、全例に排卵が誘発された (図 4A)。排卵した動物について排卵数を対照群と TCDD/TCDF 投与群と比較したが、有意差は認められなかった (図 4A)。これらの動物の卵巣重量および子宮重量にも対照群と TCDD 投与群あるいは TCDF 投与群との間で有意差は認められなかった (図 4B、C)。卵巣中の TCDD 濃度は TCDD の用量に伴って増加し、CYP1A1 mRNA の発現量も増加した (図 5)。一方、TCDF は 64 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群においてのみ、卵巣中に検出されたが、CYP1A1 mRNA の有意な増加は認められなかった。卵胞発育関連タンパクとしてインヒビンを構成する各サブユニットの mRNA 量を測定したが、対照群との間に有意差は認められなかった (図 6)。

肝臓重量 (図 7A) は、TCDD 投与群において対照群と比較して有意な増加が認められた。しかし、64 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群における重量は、TCDD 濃度 (図 7B) が 16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の約 5 倍以上の値を示していたにもかかわらず、重量については 16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群と差は認められなかった。TCDF 64 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与により肝臓中に TCDF が検出されたが、肝臓重量は対

照群との間で有意差を認めなかった。TCDF 16 µg/kg 投与群では肝臓中 TCDF は検出限界 (50 pg/g) 以下であった。

胸腺重量 (図7C) は、TCDD 投与群およびTCDF 64 µg/kg 投与群において対照群と比較して有意な低下が認められた。対照群と TCDD 16 µg/kg 投与群との胸腺重量の差は、対照群と TCDF 64 µg/kg 投与群との胸腺重量の差の約 2.5 倍であった。胸腺組織中の TCDD 濃度は TCDD の用量に依存して増加していた (図7D)。TCDF 濃度は、64 µg/kg 投与群においてのみ測定可能であった。

TCDF の TEF を 0.1 として本実験において認められたダイオキシン類による影響 (対照群における平均値に対する相対値) と TEQ で表した投与用量あるいは組織中ダイオキシン類濃度との相関を求めると、体重増加と投与量の間には負の相関 ($r=-0.8$, $p<0.0001$) が認められた。肝臓重量については、反応がプラトーとなった 64 µg/kg 投与群を除外すると正の相関が (投与量, $r=0.8$, $p<0.0001$; 組織中ダイオキシン類濃度, $r=0.6$, $p=0.0015$) が認められた。胸腺重量については負の相関が認められた (投与量, $r=0.7$, $p<0.0001$; 組織中ダイオキシン類濃度, $r=0.8$, $p<0.0001$)。卵巣における CYP1A1 mRNA 発現量に関しては、TCDF 投与群では対照群との間に有意差が認められず、また、用量反応性も認められなかったが、投与量との間には正の相関が認められた ($r=0.8$, $p<0.0001$)。

D. 考察

1) 卵巣試料における TCDD の動態ならびに遺伝子発現の定量解析

既報が追試されない原因が、本研究において投与した TCDD が卵巣に到達していない、あるいは到達しても作用を及ぼすことができないことにあるのではないかと考え、卵巣試料中の TCDD 濃度を測定した。しかし、卵巣には、昨年度の研究において重量低下が認められていた胸腺より高い濃度の TCDD が検出されたこと、ならびに AhR の代表的な標的遺伝子のひとつである CYP1A1 mRNA が卵巣においても誘導されていたことから、16 µg/kg の TCDD は卵巣に到達して AhR を活性化できるにもかかわらず、性腺刺激ホルモンによる卵巣重量増加抑制や排卵数の減少といった既報にあるような影響を卵巣には及ぼさないことが示された。

2) TCDD 投与による既報再現性の確認と TCDF 投与との組織中濃度ならびに影響の相関性に関する比較

既報の再現性を確認するために、既報において全例の排卵を抑制すると報告された用量の2倍の用量の TCDD を投与したが、eCG による誘起排卵が抑制されることは全くなかった。また、卵巣重量にも影響は認められなかった。既報では、体重増加抑制の認められた 8 µg/kg の TCDD によって、排卵数は対照群の約2分の1に減少すると報告しているが、本研究において有意な体重増加抑制の認められた 64 µg/kg の TCDD によっても排卵数および卵巣重量に影響が認められなかったことから、本実験条件下では既報に再現性は認められないと判断された。

既報に示された卵巣に対する影響に関連した変化が認められるのかどうかを、遺伝子発現量を測定することにより検討した。TCDD が幼若ラットに対する誘起排卵を抑制するとする報告では、TCDD がグラーフ卵胞における卵胞破裂を抑制する、視床下部/下垂体/性腺軸に及ぼす影響により、排卵を導く性腺刺激ホルモンサーージが起こらない、あるいは、TCDD の前処置によって卵巣の性腺刺激ホルモンに対する反応性が低下するために、eCG によって発育してくる大型の胞状卵胞の数が少なくなると述べられている。本研究では、1) の実験において、この時期と同時期に、大型の胞状卵胞の顆粒膜細胞で合成されるインヒビンを構成する各サブユニットの mRNA を定量した。また、胞状卵胞に強く発現する aromatase mRNA も定量したが、その時期の発現量に、対照群と TCDD 投与群との間で差は認められなかった。従って、排卵数や卵巣重量といったエンドポイントのみならず、卵巣内の細胞生物学的変化についても既報と類似した結果は得られなかった。

これらのことから、TCDD を 64 µg/kg 投与しても影響の認められない本モデルを、雌性生殖に対する影響評価における TEF の検証に用いることはできないと結論された。

本実験では、TEF が 0.1 とされている TCDF の投与も行った。16 µg/kg 投与群では、いずれの項目も対照群との間に有意差は認められなかった。64 µg/kg 投与群で認められた影響の程度は、TCDD 投

与群と比較すると、いずれもの 16 µg/kg 投与群より軽度であった。TCDF の TEF を 0.1 として TEQ を算出し、それと本実験において認められた影響との間の相関係数はいずれも 0.7 から 0.8 の範囲であった。しかし、TCDD の二用量間で用量反応性が認められた、体重増加抑制、胸腺重量低下および CYP1A1 誘導に関して回帰式を求め、そこに TCDF 64 µg/kg 投与群における値を代入して、活性等量を算出すると、64 µg/kg の TCDF は体重増加に関しては、2.5 µg/kg の TCDD に相当し、胸腺重量低下に関しては、15 µg/kg の TCDD に相当すると試算され、エンドポイントによって異なっていた。

E. 結論

TCDD は卵巣に到達して AhR を活性化できるが、性腺刺激ホルモンによる卵巣重量増加抑制や排卵数の減少といった既報にあるような影響を卵巣には及ぼさない。従って、本モデルは雌性生殖の影響評価における TEF の検証には用いることはできないと結論された。胸腺重量および体重増加抑制から試算された TCDF の TEF は従来の値を下回っていると結論された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

- 1) 代田真理子. 内分泌攪乱物質の雌性生殖機能への影響. 堤 治 編「内分泌攪乱物質」、Bio Clinica 15 巻、廣川書店 (2000) pp.139-144.
- 2) Okuyama M, Matsuki Y, Nakazawa H. The role of enzyme-immunoassay in analysis of dioxins. Journal of Food Hygienic Society of Japan. 42: J233-J238 (2001).
- 3) 代田真理子. 内分泌攪乱化学物質. 田谷一善、三宅陽一 編、「新しい家畜繁殖学」、臨床獣医 20 巻、チクサン出版 (2002) pp.174-180.
- 4) 代田真理子. Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) による組

織中 mRNA の定量、秦野研究所年報 25 巻(2002) pp.115-123.

2) 雑誌

- 1) Akutsu K, Obana H, Okihashi M, Kitagawa M, Nakazawa H, Matsuki Y, Makino T, Oda H, Hori S. GC/MS analysis of polybrominated diphenyl ethers in fish collected from the Inland Sea of Seto, Japan. Chemosphere. 44:1325-1333 (2001).
 - 2) Shirota M, Soda S, Katoh C, Asai S, Sato M, Ohta R, Watanabe G, Taya K, Shirota K. Effects of reduction of the primordial follicle-stockpile size on follicular development to achieve puberty in female rats. *Reproduction* 125: 85-94 (2003).
 - 3) Inoue K, Sakurada Y, Mukai M, Shirota M, Shirota K. 2003. Detection of gene expression of VEGF and flk-1 in the renal glomeruli of the normal rat kidney using the laser microdissection system. *Virchows Archiv* 442: 159-162.
 - 4) Shirota M, Sato M, Kojima K, Ohta R. 2004. Minor involvement of somatic growth in the onset of puberty of Hatano high- and low-avoidance rats (HAAs and LAAs). *Reproduction* (in press).
- ##### 2. 学会発表
- 1) Saito K, Ogawa M, Takekuma M, Kobayashi S, Sugawara Y, Nakazawa H, Matsuki Y. Development of dioxin toxicity evaluation method in human milk by enzyme-linked immunosorbent assay (Part II: Examination of preprocessing technique to make ELISA compatible with GC/MS method): ORGANOHALOGEN COMPOUNDS. 45: 168-171 (2000).
 - 2) Sugawara Y, Saito K, Ogawa M, Kobayashi S, Shan G, Hammock BD, Nakazawa H, Matsuki Y. Development of dioxin toxicity evaluation

- method in human milk by enzyme-linked immunosorbent assay (Part III: Assay validation for human milk). ORGANOHALOGEN COMPOUNDS. 45: 172-175 (2000).
- 3) Nakazawa H, Sugawara Y, Saito K, Ogawa M, Kobayashi S, Matsuki Y. Development of dioxin toxicity evaluation method in human milk by enzyme-linked immunosorbent assay (Part I: Basic strategy for methodology construction) ORGANOHALOGEN COMPOUNDS. 45: 176-179 (2000).
 - 4) Hori S, Akutsu K, Kitagawa M, Oda H, Nakazawa H, Matsuki Y. Development of analysis for polybrominated diphenyl ether in seafood and actual contamination of seafood. ORGANOHALOGEN COMPOUNDS. 47: 214-217 (2000).
 - 5) Anjo T, Okuyama M, Satoh M, Kambegawa A, Matsuki Y. Synthesis of new dioxin haptens and development of enzyme immunoassay for dioxins using polyclonal antibodies. ORGANOHALOGEN COMPOUNDS. 45: 224-227 (2000).
 - 6) Shirota M, Kitazawa I, Inoue K, Doyama A, Mukai M, Haishima A, Yamamoto K, Katoh C, Soda S, Kawabata A, Akahori F, Shirota K. Adverse effects of *in utero* and lactational exposure to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 126) on the first ovulation in rats. ORGANOHALOGEN COMPOUNDS. 49: 356-358 (2000).
 - 7) 代田真理子, 北澤郁恵, 井上薫, 堂山有理, 迎素子, 配島淳子, 山本健二, 加藤千恵, 曾田祥恵, 川端敦, 赤堀文昭, 代田欣二: 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl (PCB126) の子宮内および経乳汁曝露が雌ラットの春機発動に及ぼす影響. 第 93 回日本繁殖生物学会要旨集, II-3-33, p. 18 (2000),
 - 8) 堂山有理, 井上薫, 北澤郁恵, 迎素子, 配島淳子, 山本健二, 加藤千恵, 川端敦, 曾田祥恵, 赤堀文昭, 代田真理子, 代田欣二: コプラナーPCB の次世代への生体影響: 出生子の腎臓における CYP1A1 誘導. 第 130 回日本獣医学会学術集会要旨集 10F-2, p. 210 (2000).
 - 9) 迎素子, 井上薫, 北澤郁恵, 堂山有理, 配島淳子, 山本健二, 加藤千恵, 川端敦, 曾田祥恵, 池田輝雄, 赤堀文昭, 代田真理子, 代田欣二. コプラナーPCB の次世代への生体影響: 出生子の肝臓における CYP1A1 誘導. 第 130 回日本獣医学会学術集会要旨集, 10F-3, p. 210 (2000).
 - 10) 山本健二, 代田真理子, 井上薫, 迎素子, 堂山有理, 配島淳子, 加藤千恵, 川端敦, 曾田祥恵, 赤堀文昭, 代田欣二. コプラナーPCB 曝露ラットの雌出生子に認められた外部泌尿生殖器の形態異常. 第 130 回日本獣医学会学術集会要旨集 10F-4, p. 210 (2000),
 - 11) 配島淳子, 迎素子, 堂山有理, 井上薫, 北澤郁恵, 代田真理子, 赤堀文昭, 代田欣二: コプラナーPCB 曝露ラットの出生子における Thy-1 腎炎. 第 130 回日本獣医学会学術集会要旨集 P9-5, p. 241 (2000),
 - 12) Saito K, Takekuma M, Ogawa M, Kobayashi S, Sugawara Y, Ishizuka M, Nakazawa H, Matsuki Y. Study of extraction and cleanup methods of dioxins in house dust. ORGANOHALOGEN COMPOUNDS. 50: 134-137 (2001).
 - 13) Yamamoto K, Shirota M, Inoue K, Doyama A, Mukai M, Haishima A, Katoh C, Soda S, Kawabata A, Shirakura K, Sakurada Y, Akahori F, Shirota K. *In utero* exposure to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 126) induces hypospadias in female rats. ORGANOHALOGEN COMPOUNDS. 53: 303-305 (2001).
 - 14) Nakazawa H, Saito K, Takekuma M, Ogawa M, Kobayashi S, Sugawara Y, Ishizuka M, Matsuki Y. Development of dioxin toxicity evaluation method in human milk by enzyme-linked immunosorbent assay (Part IV: A study on simplification of pretreatment). ORGANOHALOGEN COMPOUNDS. 54: 55-58 (2001).

- 15) Ishizuka M, Sugawara Y, Saito K, Takekuma M., Ogawa M, Kobayashi S, Shan G, Hammock BD, Nakazawa H. Matsuki Y. Development of dioxin toxicity evaluation method in human milk by enzyme-linked immunosorbent assay (Part V: A study on improvement of stability). ORGANOHALOGEN COMPOUNDS. 54: 59-61 (2001).
- 16) Okuyama M, Endo W, Anjo T, Kambegawa A, Kobayashi N, Goto J, Matsuki Y. Enzyme-linked immunosorbent assay for dioxins based on monoclonal antibodies. ORGANOHALOGEN COMPOUNDS. 54: 77 -80(2001).
- 17) 曾田祥恵, 加藤千恵, 代田欣二, 太田亮, 佐藤昌子, 代田眞理子. 幼若ラットの卵巣における卵胞数評価方法に関する検討. 第 94 回日本繁殖生物学会, The Journal of Reproduction and Development 47 suppl.: P-16 (2001).
- 18) Sakurada Y, Mukai M, Kitazawa I, Inoue K, Doyama A, Haishima A, Akahori F, Shirota M, Shirota, K, Induction of CYP1A1 in the liver of offspring by *in utero* and lactational exposure to 3, 3', 4, 4', 5-pentachlorobiphenyl. 第 4 回日本内分泌攪乱化学物質学会研究会要旨集 PD-56, p. 350 (2001).
- 19) Okuyama M, Endo W, Anjo T, Matsuki Y., Hori S., Kobayashi N., Goto J, Itoh J. Development of simple and rapid purification methods for bioanalytical detection of dioxin. ORGANOHALOGEN COMPOUNDS. 58: 365-368 (2002).
- 20) Shirota M, Soda S, Katoh C, Asai S, Sato M, Ohta R, Watanabe G, Taya K, Shirota K. Effects of reduction in primordial follicle-stockpile size on neonatal follicular development and hormone levels in the rat. 35th Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction, Biology of Reproduction 64 suppl.1:212, pp. 189-190 (2002).
- 21) 櫻田陽右, 代田眞理子, 代田欣二. コプラナーPCB 曝露ラット出生子卵巣における遺伝子動態の定量的解析. 第 95 回日本繁殖生物学会大会要旨集PA-2, p. 139 (2002).
- 22) 加藤千恵, 曾田祥恵, 代田欣二, 代田眞理子. コプラナーPCB の経胎盤経乳汁曝露がラット乳児の卵巣における卵胞の形成および発育に及ぼす影響. 第 95 回日本繁殖生物学会大会要旨集PA-3, p. 140 (2002).
- 23) Soda, S, Katoh, C, Shirota, K, Shirota, M. The effect of *in utero* and lactational exposure to 3, 3', 4, 4', 5-pentachlorobiphenyl on ovarian follicles of female rats at the first ovulation. 第 5 回日本内分泌攪乱化学物質学会研究会要旨集 PD-69, p. 337 (2002).
- 24) Assessment of ovarian Toxicity of chemicals in infantile rats. 第 30 回日本トキコロジー学会年会パネルディスカッション”Assays, methodologies and risk assessment of endocrine disruptors in relation to product development” (2003)
- 25) Effects of vertically transferred 3, 3', 4, 4', 5-pentachlorobiphenyl (PCB 126) on the formation and development of ovarian follicles in the rat. The 3rd International Congress of Asian Society of Toxicology, Program and Abstract: (2004)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

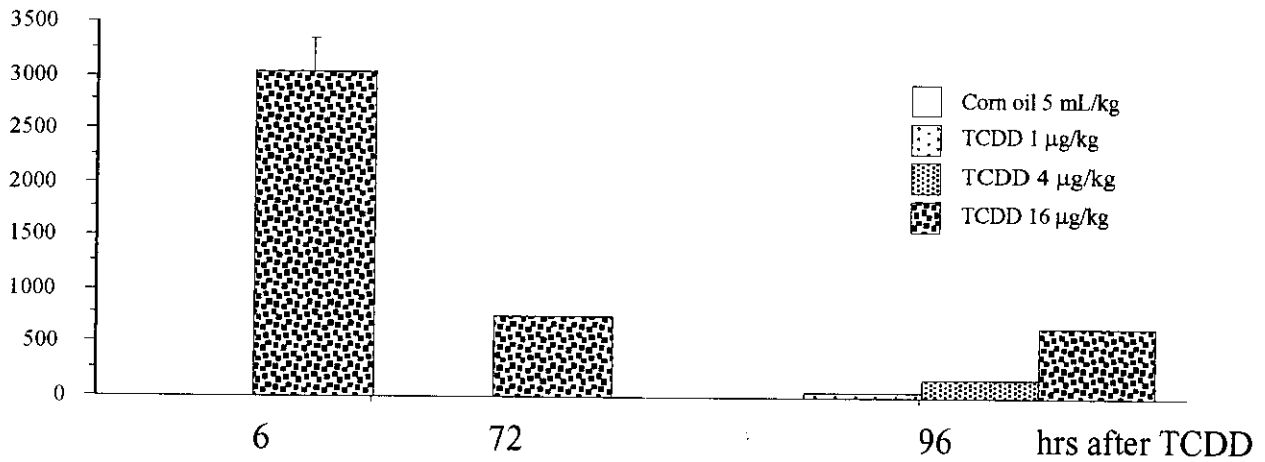
ダイオキシンに対するモノクローナル抗体 (特願 2000-315948号)

2. 実用新案登録

該当なし

図1 幼若雌ラットの卵巣における2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)投与後のTCDD濃度の推移とcytochrome P450 (CYP)1A1 mRNA発現量の変化

A. Ovarian Concentration of TCDD (pg/g)



B. Ovarian Expression of CYP1A1 mRNA (Relative Amount to GAPDH mRNA)

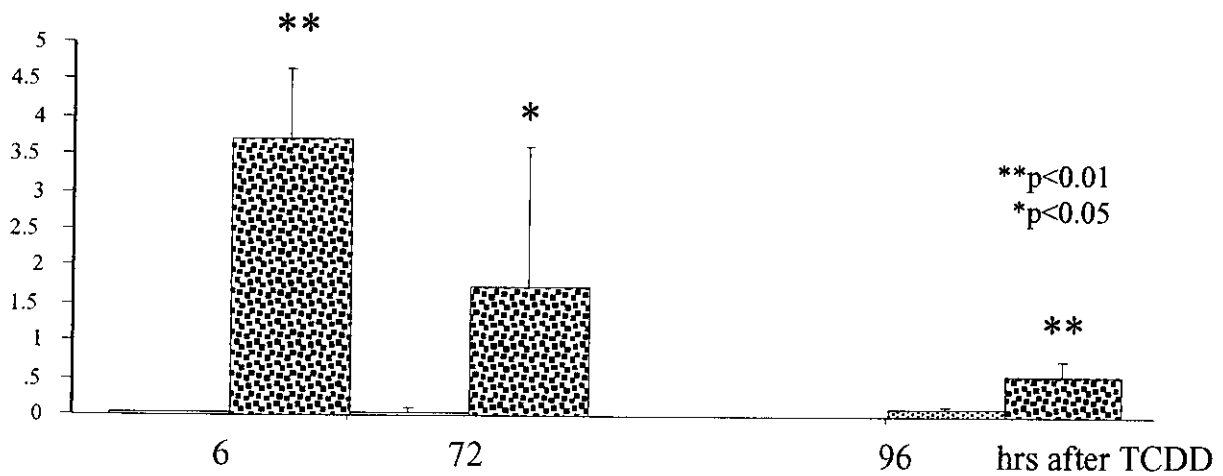
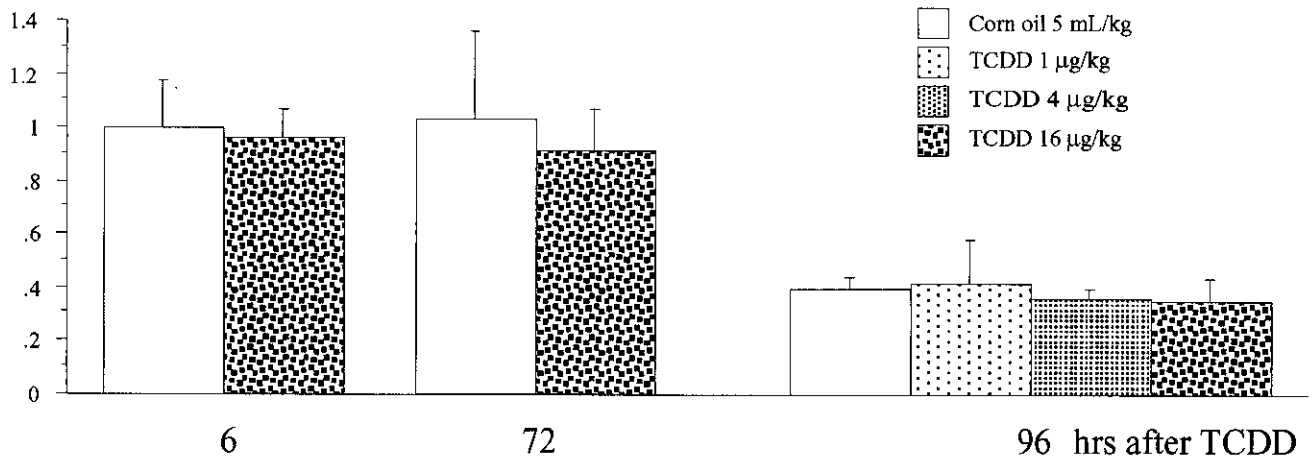
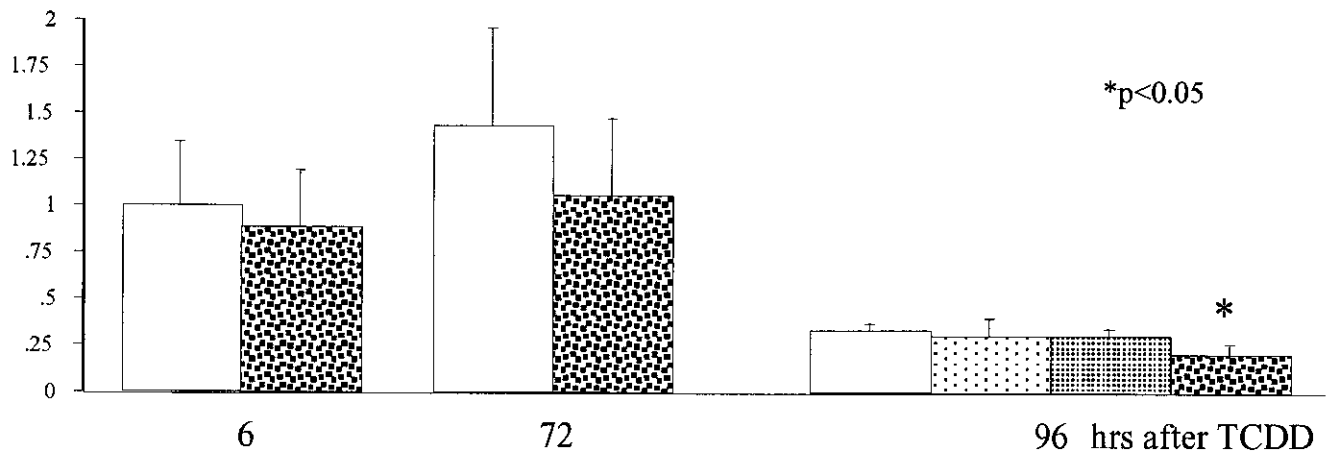


図2 幼若雌ラットの卵巣における2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)投与後のinhibin α 、inhibin/activin β Aおよび β Bをコードする mRNAの発現量の変化

A. Relative Amount of Inhibin α mRNA to Control Level



B. Relative Amount of Inhibin/Activin β A mRNA to Control Level



C. Relative Amount of Inhibin/Activin β B mRNA to Control Level

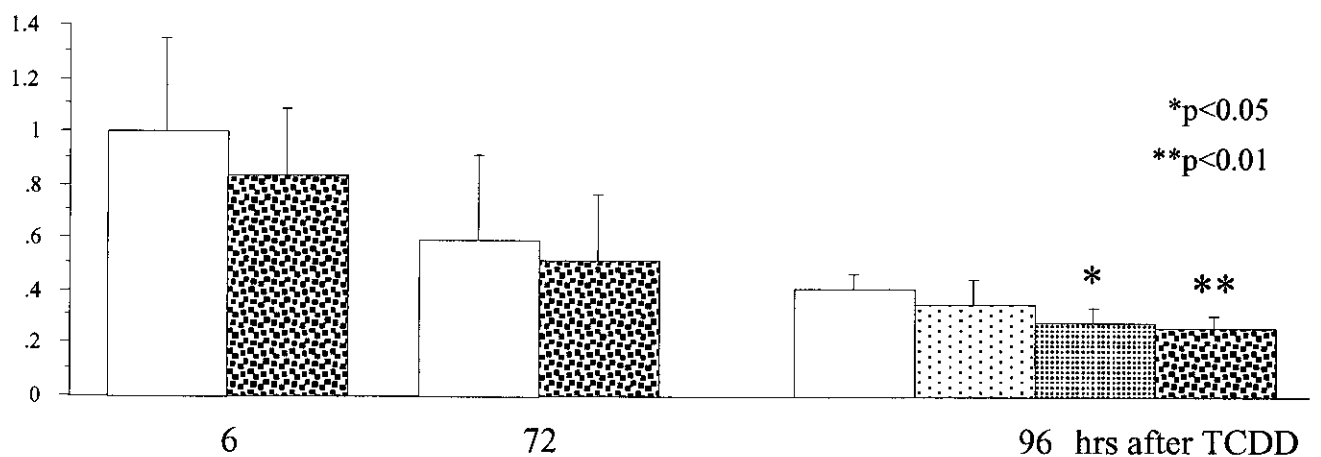


図3 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)/TCD-furan (TCDF)投与動物における体重推移

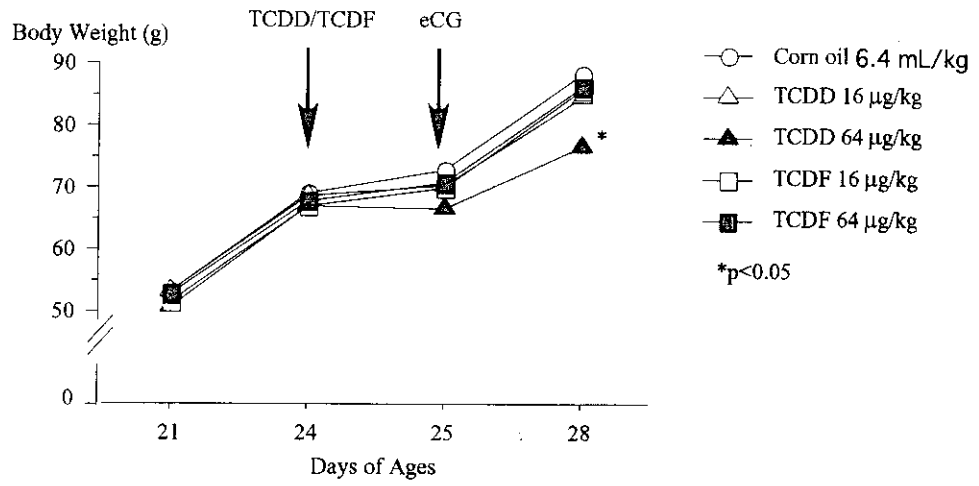


図4 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)/TCDF投与動物における排卵検査成績

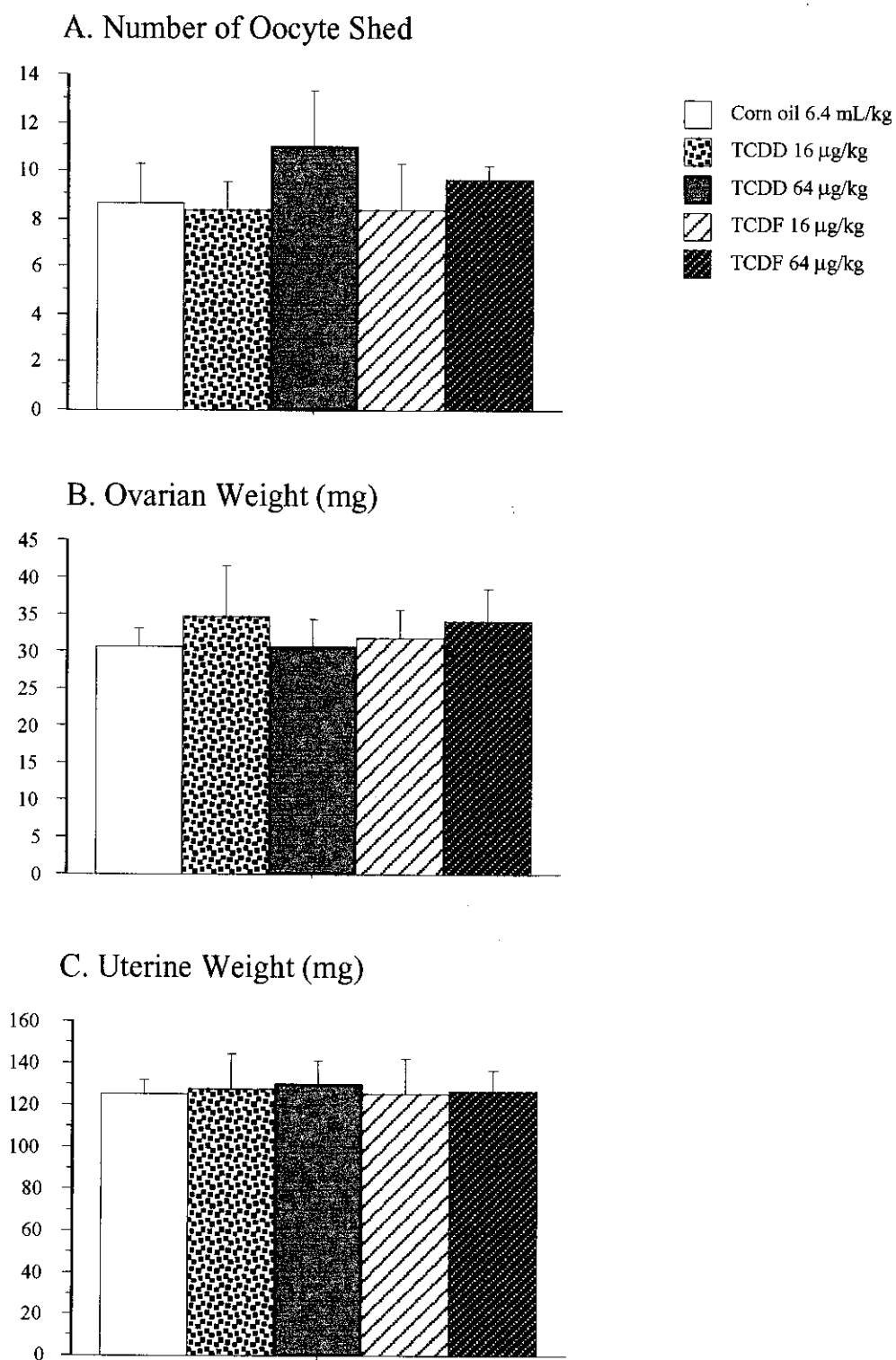
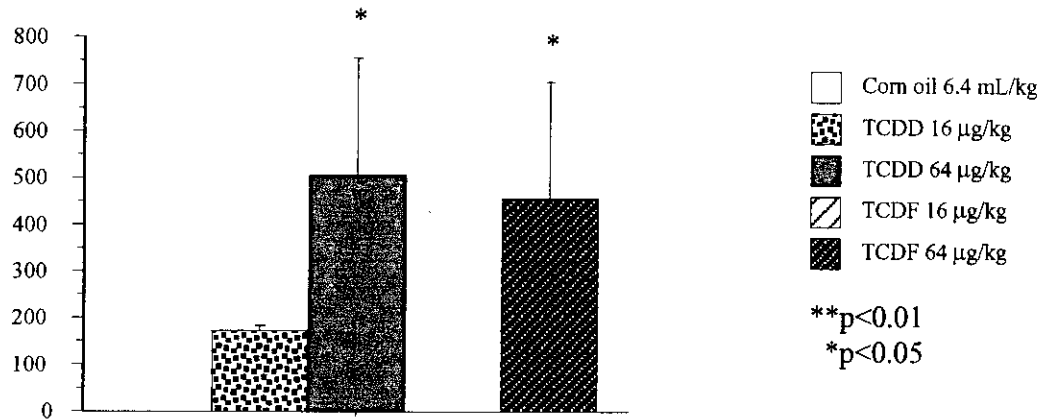


図5 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)/TCD-furan (TCDF) 投与動物の卵巣におけるTCDD/TCDF濃度とcytochrome P450 (CYP)1A1 mRNA発現量 (排卵検査時、投与後96時間)

A. Ovarian Concentration of TCDD/TCDF (pg/g)



B. Ovarian Expression of CYP1A1 mRNA (Relative Amount to GAPDH mRNA)

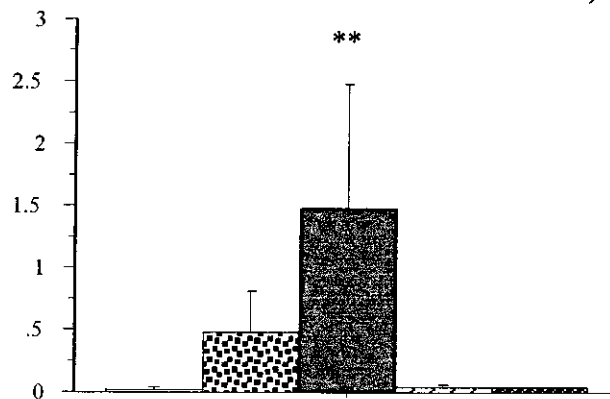


図6 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)/TCD-furan (TCDF) 投与動物の卵巣におけるinhibin α 、inhibin/activin β Aおよび β BをコードするmRNAの発現量（排卵検査時、投与後96時間）

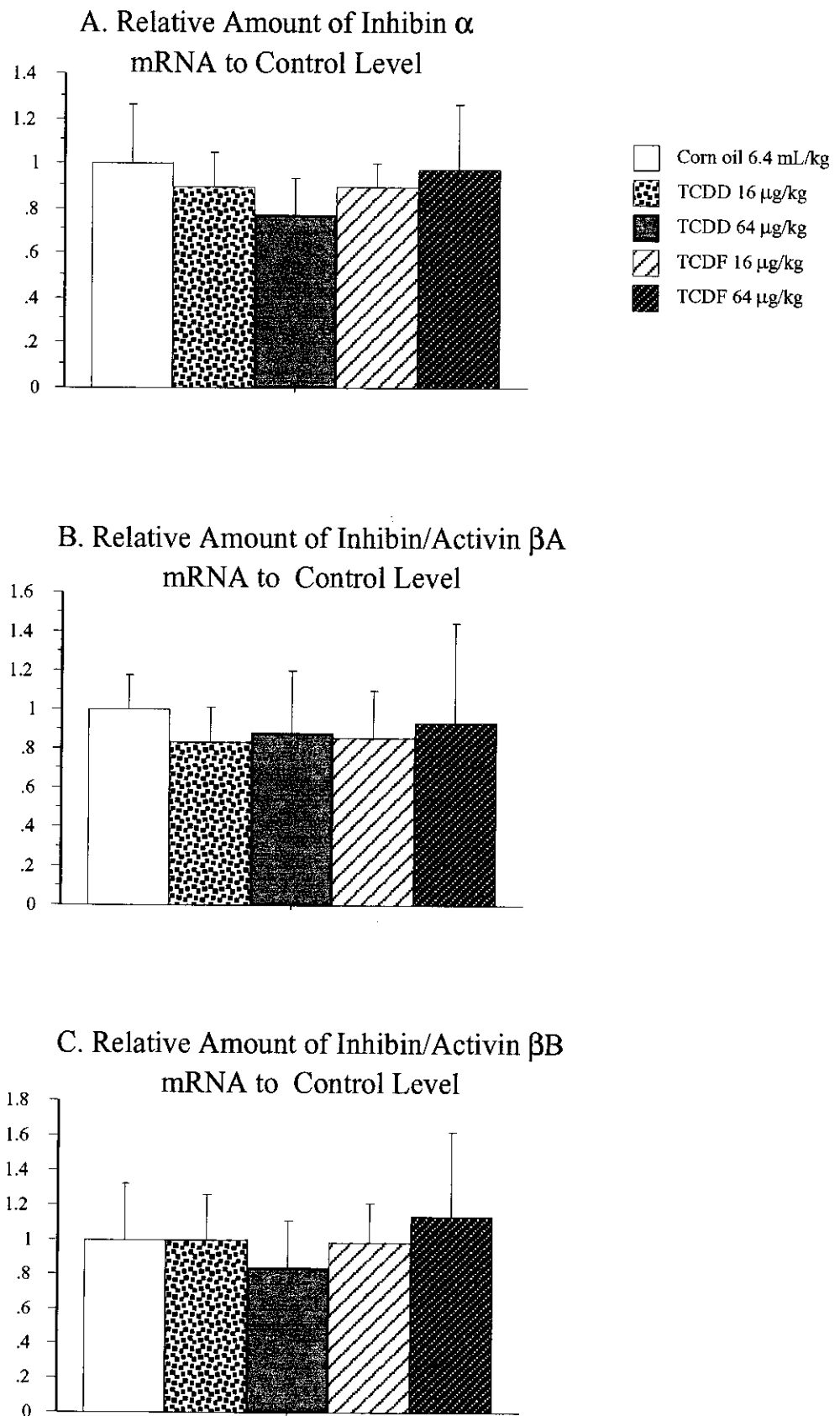


図7 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)/TCDF-furan (TCDF) 投与動物の肝臓および胸腺重量とそれらの組織におけるTCDD/TCDF濃度 (排卵検査時、投与後96時間)

