

200401251A

厚生労働科学研究費補助金

(化学物質リスク研究事業)

平成 16 年度総括研究報告書

ダイオキシン類の体内動態及び生体障害性の
解明に関する研究

主任研究者 久保田俊一郎 東京大学教授

平成 17 年 4 月

目 次

I 研究報告書

総括研究報告書

ダイオキシン類の体内動態及び生体障害性の解明に関する研究

主任研究者 久保田俊一郎

分担研究報告書

ダイオキシン類の生体障害性におけるタンパク質解析による解明

主任研究者 久保田俊一郎

研究協力者 太田万理

分担研究報告書

アカゲザルにおけるダイオキシンの臓器障害性の研究

分担研究者 福里利夫

研究協力者 是永龍己

分担研究報告書

ダイオキシン類の発癌性の解明に関する研究

分担研究者 村田宣夫

共同研究者 福里利夫

共同研究者 久保田俊一郎

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
暴露のアカゲザル口蓋ヒダ形成への影響に関する研究

分担研究者 安田峯生

研究協力者 安田以久

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) の胎児・授乳期
暴露を受けたアカゲザル児精巣の変化

分担研究者 隅田 寛

共同研究者 安田峯生

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) の胎生・授乳期
暴露によるアカゲザル児の腎弓状動脈・葉間動脈への影響

分担研究者 隅田 寛

共同研究者 安田峯生

分担研究報告書

ダイオキシン曝露におけるアカゲザルの臓器にみられる遺伝子発現
障害性の長期影響の解析および胎児期サルへの曝露における四肢
形成影響の検討

分担研究者 浅岡一雄

分担研究報告書

ダイオキシン曝露による免疫系への影響に関する研究

分担研究者 徳田信子

II 研究成果の刊行に関する一覧表

III 研究成果の刊行物・別刷

平成16年度厚生労働科学研究費
総括研究報告書

ダイオキシン類の体内動態及び生体障害性の解明に関する研究
主任研究者 久保田俊一郎 東京大学教授

研究要旨

ダイオキシン類による健康への影響が、親世代から次世代へ及ぶことが懸念されている。平成10年に、ダイオキシン類のTDIが、4pg/kg/dayと設定された。これは、齧歯類の実験結果を参考にして設定されたため、より妥当なTDIの設定およびより有効なダイオキシン対策をたてるべく、ヒトに最も近縁の霊長類であるアカゲザルを用いて本研究を遂行してきている。アカゲザルを用いて、母体に2,3,7,8-TCDD(0,30, 300 ng/kg)を皮下投与し母体および胎児での体内動態、F0世代への影響、F1世代の成長、生殖、免疫能、発癌を長期にわたって解析してきた。TCDD投与群（特に300ng/kg）は、胎児死亡及び流産、死産および生後死亡が多いという結果を得た(F1a)。F1bでも流死産、生後死は起こったが、F1aほどの顕著な影響ではなかった。TCDD300ng/kg投与群のうち追加投与群（9例中生存が2例のみ。流死産6例。F1死亡1例）を別にして、コントロール、30ng/kg投与群、300ng/kg投与群を比較した場合、流死産や生後死の頻度は本研究の目的であるTDIの妥当性の検討に有用な指標とはなりにくいと判断した。F1aを除く全ての生存サル（F0およびF1b、追加群）の屠殺を行い解析した。昨年度に1例報告した肝臓の癌化は、本年度の屠殺例では見られなかった。生殖能に関しては、F1a雌で、コントロール8例中5例に、30ng/kg投与群5例中3例に、300ng/kg投与群3例中3例に、月経の不規則な出現が見られた。雄では、精巣下降がコントロール4例中3例に、30ng/kg投与群6例中4例に、300ng/kg投与群5例中4例に見られ、精巣下降に関しては、TCDDの影響はほとんどないと考えられた。肛門—生殖器間距離を計測したが、TCDDの影響は見られなかった。精巣サイズおよび陰茎長を計測し生殖能（精子形成能）を推定したところ、まだ生殖年齢に達していないと判断し、さらに飼育を継続することとした。死亡例について、精巣の組織学的解析を行った。TCDD曝露群の精細管面積はコントロールに比して約60%に低下し、また強い浮腫が認められた。霊長類でもTCDDの母胎負荷によりその児の精巣発生に重大な影響が及ぶ可能性が示唆された。

免疫能に関して、TCDD 投与群の F0 では T リンパ球数・CD4/CD8 比に長期に渡って影響が見られた。また、F1 への胎生期・授乳期暴露の影響について、TCDD 投与群では、雌で CD4/CD8 比の減少、雄で T リンパ球の割合が減少する傾向が見られた。また、TCDD 投与群の F0、F1 ともに、胸腺に異常所見を示すものがあつた。TCDD はリンパ球系、特に、胸腺を中心とする T リンパ球系に長期に影響を及ぼし、経胎盤および授乳によって児にも影響を与える可能性があることが示唆された。

F1a 死亡例（コントロール 6 例、30ng/kg 投与群 4 例、300ng/kg 投与群 1 1 例）および F1b の屠殺例（コントロール 1 1 例、30ng/kg 投与群 1 0 例、300ng/kg 投与群 1 1 例）について詳細な病理学的解析を行なったところ、これまでに全く報告のない「特異な腎線維化」（腎臓間質性および腎盂周囲性線維化）および「多様な形成異常及び分化の異常」を見出した。さらにこの新規の病変は、コントロールおよび 30ng/kg 投与群ではほとんど見られず（30ng/kg 投与群 F1a 死亡例の中の 1 例のみの腎皮質内に、軽微な類似の病変が認められた）、F1a 死亡例 300ng/kg 投与群 1 1 例中 6 例、F1b の屠殺例 1 1 例中 5 例、総計で 2 2 例中 1 1 例、という高頻度で出現した。このように、F1a および F1b の両方で出現し、再現性のある結果であり、かつ 300ng/kg 投与群に高頻度で出現しており、現行の TDI が妥当であるという有用な情報提供をもたらす大きな成果を得た。

TCDD (300ng/kg) の影響を見るため、屠殺例（腎臓）について遺伝子解析を行なった。腎臓で解析された約 16,600 種類の遺伝子の中で、F1a（動物番号 106a）の腎組織では対照と比較して、211 個の遺伝子が発現変動し、132 個の遺伝子が発現増強、79 個の遺伝子が発現減少を示し、F1b（動物番号 39）の腎組織では対照と比較して、650 個の遺伝子が発現変動し、273 個の遺伝子が発現増強、377 個の遺伝子が発現減少を示していた。TCDD 投与長期経過後の F0 サル肝臓、脳において多くのタンパク質（Caspase-8、Bad, EGF-R など細胞死や増殖・発癌に関係する因子、cadherin の発現低下など）の有意な変動が 30ng/kg 投与群および 300ng/kg 投与群の両方で認められた。タンパク質解析の結果からは、30ng/kg の影響も大きいと考えられた。

TCDD 曝露におけるアカゲザルにおける四肢形成の異常について検討するとともに自然群で産まれた四肢奇形サルの血液からダイオキシン類を分析し

汚染物質と四肢奇形性の関連を検討した。TCDD を胎児期—離乳期に 30 または 300 ng/kg を曝露した約 40 頭とコントロール約 20 頭から分娩された児において四肢奇形を持つ個体は見られなかった。血液疫学調査を行った 2 地点の調査した 8 頭のサル総てからダイオキシンの異性体が検出された。TCDD は 2 頭の血液中から検出された。ポリ塩化ジベンゾフランとコプラナポリ塩化ビフェニルは高く占め、ポリ塩化ジベンゾパラジオキシンは低含量であった。異性体から算出した TEQ を用いて四肢奇形個体と正常四肢個体を比較した。誕生年毎の変化をプロットすると奇形個体の TEQ は正常個体の変化の範囲内であり差異はみられなかった。野生群および飼育群の間の TEQ についても差異は見られなかった。

本年度のまとめ：F1a の精巣サイズおよび陰茎長を計測し生殖能（精子形成能）を推定した結果、まだ生殖年齢に達していない（精子形成能を解析できない）と判断し、さらに飼育を継続することとした。本研究の大きな成果は、TCDD により出現したこれまでに全く報告のない「特異な腎線維化」（腎臓間質性および腎盂周囲性線維化）および「多様な形成異常及び分化の異常」である。この新規の病変は、コントロールおよび 30ng/kg 投与群では、30ng/kg 投与群の 1 例を除き全く見られず、一方、F1a 死亡例 300ng/kg 投与群 11 例中 6 例、F1b の屠殺例 11 例中 5 例、総計で 22 例中 11 例、という高頻度で見られた。このように、F1a および F1b の両方で出現し、再現性のある結果であり、かつ 300ng/kg 投与群に高頻度に出現していた。現行の TDI は、胎生期に TCDD 曝露を受けたラット雄児の生殖器系の異常を解析した結果を基盤に設定された。このラットの実験では、最小毒性量での母体の体内負荷量が 86ng/kg と算定された。本研究では、この値の約 3 分の 1 量（30ng/kg）と約 3 倍（300ng/kg）の投与量を設定して実験を行った。本研究で見出した腎臓病変は、これまでに全く報告のない新規の病変であり、学術的に価値の高い研究結果であるに止まらず、300ng/kg 投与群に特異的に出現していることから、現行の TDI の妥当性を支持する大きな成果と考えられる。

分担研究者

福里利夫	帝京大学教授
安田峯生	広島国際大学教授
岩本晃明	聖マリアンナ医大教授
隅田 寛	広島国際大学教授
村田宣夫	帝京大学教授
浅岡一雄	京都大学助手
徳田信子	山口大学助手
石島純夫	東京工業大学助手

A. 研究目的

ダイオキシン類による健康への影響が、親世代のみならず、親世代から次世代へ及ぶことが懸念されている。平成10年に、ダイオキシン類のTDIが、4pg/kg/dayと設定された。これは、齧歯類の実験結果を参考にして設定されたため、より妥当なTDIの設定およびより有効なダイオキシン対策をたてることを目的として、ヒトに最も近縁の霊長類であるアカゲザルを用いて本研究を遂行してきた。アカゲザルを用いて、母体に2,3,7,8-TCDD(30, 300 ng/kg)を皮下投与し母体および胎児での体内動態、F0世代への影響、さらにF1世代の生死、流死産、成長、生殖能、発癌性、免疫能等を平成11年より長期にわたって個体レベルおよび遺伝子・タンパク質レベルで解析した。

B. 研究方法

1. ダイオキシンの調整および投与

TCDDは、Wellington Laboratories Inc. (カナダ) および関東化学 (東京) で、溶媒としてトルエン/DMSO (1:2 v/v) を用いて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/ml (0.1 ml/kg), 300ng/ml (1ml/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) 1ml/kgをTCDD投与群と同様の方法で背部皮下に投与した。体内負荷量を維持するため、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%量を追加投与した。

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: 4~6kg)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(F1a)を哺育させた。

F1出生児に関しては、生後に、外生殖器の観察に加えて、肛門-生殖器間距離及び陰莖長を測定した。例数を増やして解析するため、F1a離乳後のメスを再交配して妊娠させ、TCDDの

投与を行い、F1bを得て、F1aと同様に解析した。なお、F1bの投与量に関しては、F1aの実験のTCDDの母体蓄積を考慮し、妊娠20日にTCDD 20 ng/kg（低投与量群）または200 ng/kg（高投与量群）を皮下投与した。その後はF1aと同様にTCDDを投与した。

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。詳細な解析は、電子顕微鏡を用いて行った。腎臓の線維化はコラーゲン（I型）を特異的に染色するシリウスレッドを用いて染色した。

F1雄児で、生育途中で死亡した児を解剖し、精巣の単位組織面積に占める精細管面積を測定し、TCDDが精巣に与える影響を評価した。精細管面積測定：精巣のヘマトキシリン-エオジン染色組織切片を顕微鏡下で撮影した。各組織切片標本につき2~3カ所の部を撮影した。顕微鏡写真から精細管の輪郭をトレースし、画像処理を行った。Scion Imageを使用してトレース輪郭内の面積を測定した。

4. タンパク質解析

TCDD投与長期経過後（3年以上）の影響（F0）をタンパク質レベルで解析する実験をウエスタンブロット法で行った。コントロール群：2頭（動物番号：6, 12）、

30ng/kg群：3頭（動物番号：19, 28, 29）、300ng/kg群：3頭（動物番号：34, 40, 57）の肝臓、脳（扁桃体、中心前回、海馬）などの組織を破碎し、ブラッドフォード法でタンパク質定量を行った。50 μ g-100 μ gのタンパク質を用いてウエスタンブロット法でタンパク質発現を解析した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、膜に転写後種々のタンパク質およびリン酸化抗体を用いてタンパク質およびリン酸化の発現レベルを解析した。発現レベルはフォトトープキット（Phototope®-HRP Western Blot detection system, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA）を用い、検出機器としてChemidoc XRS system and Quantity One® image analysis software（Bio-Rad Laboratories, Inc., USA）を用いた。

5. 遺伝子解析

アカゲザル腎組織（300ng/kg群F1a（動物番号106）1頭の腎、300ng/kg群F1b（動物番号39）1頭の腎、対照の0ng/kg群F1b腎）からtotal RNAを抽出し、Human expression chip（IntelliGene HS, タカラバイオ（株））を用いた網羅的遺伝子解析を行なった。このDNAチップは、ヒト遺伝子の中から発現が確実な遺伝子約16,600種類を選び、各遺伝子の約300 baseを選択して搭載したものである。

30ng-300ng/kg体重でTCDDを単回投与したアカゲザルの投与後49

日目の臓器において CYP1A1 遺伝子の発現変動が乳腺、皮膚、腎臓、膵臓、肝臓、および脳において検出されている (すでに報告済み)。このため従前と同様の RT-PCR 法を用いて長期影響の研究を行った。TCDD を負荷した母体と児の得られた総ての試料について肝臓から mRNA を得て CYP1A1 遺伝子の発現量を解析した。

6. 免疫学的解析

白血球数およびそれぞれの分画数を ADVIA120 (Bayer, PA, USA) で測定した。また、リンパ球については蛍光標識した表面抗原に対する抗体 (CD3-FITC, CD4-PE, CD8-APC, CD20-PE, いずれも BD Biosciences Pharminge, CA, USA) と反応させ、flow cytometer (FACS Calibur, BD Biosciences, CA, USA) を用いて各サブセットの割合を解析した。

データは F 検定を行い、等分散であるときは Student の t-test、等分散とみなされないときは Welch test を行った。採取した胸腺をカルノア固定し、パラフィンに包埋し、切片をヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色し、光学顕微鏡で観察した。

7. 児の四肢奇形の観察とサルのダイオキシン類汚染量の疫学調査

四肢形態については肉眼で観察した。また、サルのダイオキシン類汚染量の疫学調査を京都府嵐山野生群の四肢奇形を含むサルの捕獲調査および愛知県

犬山の飼育群の 2 地点について行った。調査地点において 2003 年に各 4 頭のサルから血液を得て分析を行った。血液試料からのダイオキシン汚染量については厚生省ダイオキシン測定暫定マニュアル 2000 年版によって分析した。

8. ダイオキシン測定

血液中の TCDD 濃度を島津テクノリサーチ株式会社に受託して測定した。2,3,7,8-TCDD はガスクロマトグラフィー質量分析法で測定し、湿重量あたりで換算してデータとした。

(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、動物愛護の配慮、指針に則って行った。ダイオキシンに関しては、実験従事者の安全性確保に細心の注意をはらった。ディスボーズブルマスク、キャップ、ゴーグル、防護衣を着用し、試料および廃棄物は、環境を汚染しないように注意をはらって回収後保管し、新日本科学株式会社で高温焼却した。

C. 研究結果

1. サルの剖検状況、交配、分娩、生存状況、血統一覧、TCDD 濃度 (血液、肝臓、腎臓) を別表にまとめた。

3 年以上経過後の F0 (15, 16, 18, 19, 31, 32, 33, 34, 40) の血中 TCDD 濃度は検出限界以下 (ND) ~0.23pg/g 湿重量の範囲にあり、一方、F1 (9b, 26b, 39b, 44b,

50b) の血中 TCDD 濃度は検出限界以下 (ND) ~0.1 pg/g 湿重量の範囲にあった。

2. 病理学的解析結果

(1) 生後死亡例精巣

生後死亡例の対照群 2 例は、死亡時の年齢が大きく異なるが、2 例の精巣とも精細管は良く発達しており、精上皮の形成状態はおおむね良好であった。間細胞も認められ、精巣中隔の結合組織は明瞭であった。本研究で使用したアカゲザル児の年齢では、精子形成は認められなかった。対照群の精巣組織単位面積あたりの精細管面積は、58%程度であり、精巣組織中約 6 割が精細管であると考えられた。

一方で、TCDD 低投与量群の精巣には、水腫傾向が認められ、血性水腫も認められた。水腫により精細管は圧迫されており、個々の精細管間の間隙も大きくなっていたため、精細管面積-精巣組織面積比は対照群のそれに比較して大幅に減少していた。水腫の程度には、個体差が認められたが、精細管面積-精巣組織面積比のばらつきは小さく、標準偏差は 7%程度であった。そのため、TCDD 低投与量群の精細管面積は対照群のそれに比較して有意に減少していた ($P < 0.01$)。

TCDD 高投与量群の精巣は、TCDD 低投与量群よりもさらに水腫傾向が強かった。TCDD 低投与量群に認められた例と同様に、血性水腫を認める例もあった。対照と比較して個々の精細

管間の間隙は大きく、TCDD 低投与量群に認められた水腫と組織学的に大きな差は認められなかった。線維芽細胞の増加は認められなかったが、TCDD 高投与量群の 1 例に、線維化が著しく明らかに精巣萎縮の症例が認められた。この例では、精細管は癒痕化した線維組織に圧排され、個々の精細管の径もまばらで、かつ腔が不明瞭であった。正常な精子形成細胞を確認することは可能であったが、間細胞集団は、対照群の組織に比較して確認が困難であった。TCDD 高投与量群の精細管面積-精巣組織面積比は低投与量群のそれよりもさらに小さく、対照の約 1/2 であった。TCDD 高投与量群の精細管面積-精巣組織面積比のばらつきは、対照群や TCDD 低投与量群のそれと同レベルであり、t 検定では TCDD 低投与量群の精細管面積-精巣組織面積比との間に有意差を示さなかった。(詳細は隅田分担報告書参照)

(2) 剖検例精巣

剖検例の精巣は、生後死亡例の精巣と類似の組織所見を示した。しかし、対照でも精巣中隔の結合組織にわずかな水腫傾向が認められた。精子形成は認められなかったが、精子形成細胞の成熟度は良く、精母細胞はよく認められた。一方で、TCDD 投与量群の精巣の水腫傾向は対照に比較すると著しかった。精細管そのものの発達が悪くないが、また TCDD 低投与量群の 1 例 (47b) は精巣自体の

サイズが他に比較して減少していた。TCDD 高投与量群の精巣では、水腫傾向が強い個体と、対照に比較して水腫傾向がほとんど変わらない個体が認められ、水腫程度のばらつきは大きかった。つまり、水腫の程度は必ずしも投与量に依存していない。TCDD 低投与量群、高投与量群とも精巣組織内で水腫はび漫性ではなく、高度な水腫を呈する部は限局していた。一部血性水腫も認められたが、生後死亡例に認められたものよりも血性の程度は軽微であった。

TCDD 投与群の精子形成細胞の成熟度は個体でまちまちであり、精母細胞の分布が、対照に比較して少ない個体も認められた。しかし、TCDD 高投与量群にも、対照と比較してほぼ同程度の精子形成細胞の成熟度を示す個体も認められた。したがって、今のところ精子形成細胞の成熟度と TCDD 投与量との間の関連は認められない。ただし、特に TCDD 高投与量群には、間細胞集団を認めにくい個体があった。セルトリ細胞の分布は TCDD 高投与量群、TCDD 低投与量群とも対照と同レベルであった。(詳細は隅田分担研究報告書参照)

(3) 腎臓の病理学的解析

F1a 死亡例と追加群における腎病変

コントロール群：6頭、30 ng/kg 群：4頭、300 ng/kg 群：11頭；死亡例8頭および追加群の死亡例1頭、屠殺例2頭 を解析した。

TCDD 非投与群及び 30ng/kg 投与群から生まれた F1 (各々 6 頭、4 頭) で腎病変は見られず、300ng/kg 投与群からの 11 頭中 6 頭に特異な腎線維化が認められた。いわゆる間質性腎炎とは異なり、炎症細胞浸潤は軽度で、尿細管の破壊・萎縮、尿細管周囲、糸球体周囲、および血管周囲の間質に強い線維化が認められた。同時に腎盂・腎杯周囲の強い線維化、腎乳頭萎縮、血管の強い硬化も認められた。300ng/kg 群では 2 頭が血中 BUN 上昇を来し、腎不全で死亡した。30ng/kg の中の 1 頭に、軽微な腎皮質内小病変が認められた。

下記の F1b について腎病変を解析した。

コントロール群：11 頭 (死亡例 3 頭、屠殺 8 頭)、30 ng/kg 群：10 頭 (死亡例 5 頭、屠殺 5 頭)、300 ng/kg 群：11 頭 (死亡 3 頭、屠殺 8 頭)

肉眼所見：屠殺例の 300ng/kg 群の中の 3 頭の腎が白色調を示し、やや硬く、表面に凹凸を伴った。コントロール群と 30ng/kg 群の腎臓には変化は見られなかった。

組織所見：300ng/kg 群の屠殺例 4 頭、死亡例 1 頭で、腎皮質の一部の尿細管の破壊・萎縮・脱落、間質の増生が認められた。糸球体はやや未熟なものが多く、一部に好酸性無構造物質の沈着や硬化像を伴った。コントロール群と 30ng/kg 群の腎臓には変化が見られなかった。

電顕所見：300ng/kg 群の病変部の糸球体内のメサンギウム領域に無構造物質の

沈着が認められた。

形態計測的研究：300ng/kg 群の病変腎では糸球体面積の増加、未熟な糸球体の増加が見られた。

タンパク質解析：免疫染色で腎病変部で1型コラーゲンの増加が見られた。

(詳細は福里分担報告書参照)

3. ウェスタンブロット法による

TCDD 投与後長期（3年～）のタンパク質解析の結果

TCDD 投与長期経過後の F0 サル肝臓において有意なタンパク質変動が認められた。肝臓、大脳（中心前回）、扁桃体に共通して変動するタンパク質は TCDD により誘導される解毒代謝酵素であるシトクロム p450 1A1 (CYP1A1)、細胞接着に関与する VE-cadherin とリン酸化されたセリン・スレオニンキナーゼである phospho-Akt、上皮増殖因子レセプターである EGFR とアポトーシスに関連する Bad であった。肝臓の CYP1A1 は 30 ng/kg 投与群と 300 ng/kg 投与群において対照群と比べ 2.17 倍、2.49 倍と有意に増加した。また大脳の CYP1A1 は 30, 300 ng/kg において対照群の 1.37 倍と 1.07 倍であり、扁桃体では 30, 300 ng/kg において対照群の 6.73 倍と 8.93 倍であった。

肝臓の VE-cadherin は 30, 300 ng/kg において対照群の 0.68 倍と 0.71 倍であり、大脳では 0.61 倍と 0.66 倍であった。また、扁桃体の VE-

cadherin は 30, 300 ng/kg で対照群の 0.42 倍と 0.58 倍であり TCDD 投与群に減少する傾向が認められた。

また扁桃体における VE-cadherin の減少が肝臓、中心前回に比べ顕著であった。肝臓における Akt のリン酸化は 30, 300 ng/kg で対照群の 1.12 倍と 1.83 倍であり、大脳では 1.27 倍と 1.56 倍であった。扁桃体の phospho-Akt は 30, 300 ng/kg で対照群の 3.53 倍と 3.69 倍であり TCDD 投与により増加する傾向が認められた。EGFR は肝臓において 30 ng/kg 投与群と 300 ng/kg 投与群で対照群と比べ 4.27 倍、2.15 倍と有意に増加した。また大脳の EGFR は 30, 300 ng/kg において対照群の 2.45 倍と 1.31 倍であり、扁桃体では 30, 300 ng/kg において対照群の 0.73 倍と 2.03 倍であった。

肝臓における Bad は 30, 300 ng/kg において対照群の 1.94 倍と 1.23 倍であり、大脳では 1.62 倍と 1.67 倍であった。また、扁桃体の Bad は 30, 300 ng/kg で対照群の 4.69 倍と 4.88 倍であり TCDD 投与群ににおいて増加する傾向が認められた。また扁桃体における Bad の増加が肝臓、中心前回に比べ顕著であった。ダイオキシンの毒性発現に関与することが知られる Ah-R (Aryl hydrocarbon Receptor) は扁桃体において最も顕著な変動が認められ、30, 300 ng/kg で AhR は対照群の 3.91 倍と

3.92 倍に増加していることが明らかとなった。また AhR の転写因子である Arnt1 (Ah receptor nuclear translocator protein 1) は扁桃体でタンパク質の変動が認められ、30, 300 ng/kg で対照群の 3.15 倍と 6.64 倍に有意に増加した。このほか、肝臓において変化の認められたものはアポトーシスに關与する caspase-8 であり、30, 300 ng/kg で対照群の 1.71 倍と 2.67 倍に増加した。また大脳と扁桃体において発癌に關与する Raf1 の発現が検出され、大脳において 30, 300 ng/kg で対照群の 2.40 倍と 1.88 倍、扁桃体において 30, 300 ng/kg で対照群の 2.54 倍と 3.01 倍に増加した。扁桃体においては PI3-kinase p110 や発癌に關係する AMPK α (AMP-activated protein kinase), c-Jun, 脳由来神経栄養因子 BDNF に変動が認められた。(詳細は久保田分担研究報告書参照)

4. 遺伝子解析

TCDD のサル腎臓遺伝子発現に及ぼす影響についてマイクロアレイ法で解析した。解析された約 16,600 種類の遺伝子の中で、仔アカゲザル F1a (動物番号 106a) の腎組織では対照と比較して、211 個の遺伝子が発現変動し、132 個の遺伝子が発現増強、79 個の遺伝子が発現減少を示し、仔アカゲザル F1b (動物番号 39) の腎組織では対照と比較して、650 個の遺伝子が発

現変動し、273 個の遺伝子が発現増強、377 個の遺伝子が発現減少を示していた。(福里分担研究報告書参照)

TCDD を負荷したのちに 3 年-5 年間の長期間に無曝露で経過した母体と児の肝臓における CYP1A1 遺伝子発現量を調べた。母体への 0 (溶媒)、30 または 300 ng/kg 投与の 3 群の計 40 個体、児への投与 3 群の計 26 個体からなる総計 66 個体について CYP1A1 遺伝子の発現量を解析したところ、母児ともに TCDD 曝露 30 または 300ng/kg 投与群はいずれも 0 ng/kg (溶媒) 投与群に比較して発現量の変動は検出されなかった。(浅岡分担報告書参照)

5. 免疫学的解析

(1) F0 血液の解析

初産のみの F0 では TCDD 投与から約 1300 日 (約 3 年半) 後、CD3⁺CD4⁺CD8⁻ (CD4⁺T 細胞) の割合が減少、CD3⁺CD4⁻CD8⁺ (CD8⁺T 細胞) の割合が増加する傾向が見られ、CD4/CD8 比は有意に減少していた。リンパ球数・顆粒球数には差が見られなかった。

第二児も出産した F0 では、30 ng, 300 ng 投与群ともにリンパ球数が有意に減少していた。また、TCDD 投与群で CD3⁺リンパ球 (T 細胞) 数が有意に減少していた。

(2) F1 血液の解析

F1a では、300 ng 投与群で顆粒球数

が有意に減少していた。表面抗原については、30 ng 投与群において、CD4⁺T 細胞の割合が減少、CD8⁺T 細胞の割合が増加し、CD4/CD8 比が減少する傾向があった。雄では、TCDD 投与群で顆粒球数が有意に増加していた。サブセットについては、300 ng 投与群において、T 細胞の割合が有意に減少し、CD20⁺細胞 (B 細胞) の割合が有意に増加していた。

F1b 雌では投与群が対照群に比較して T 細胞の割合が増加する傾向が見られたが、対照群の値が F0 や F1a の対照群の値と比較して少なかった。30 ng 投与群では CD8⁺T 細胞の割合が有意に減少していた。白血球系の細胞数には差は見られなかった。

(3) 胸腺組織像の解析

F0 および一部の F1 の胸腺組織像について検討したところ、TCDD 投与群において、異常所見が観察される例があった。これらの例では、腺様構造・リンパ濾胞様の構造や特殊な血管系など、正常の胸腺では見られない構造が観察された。著しい異常所は 300 ng 投与群に見られた。

(詳細は徳田分担研究報告書参照)

6. 児の口蓋ヒダを観察し、その形態変異がアカゲザルでも発生毒性検出指標として有用か否かを検討した。対照群でも一側の前方のヒダと他側の後方のヒダが正中部で癒合する「乗り換え」や、ヒダの前後に短い過剰なヒダが近接して存在する「交差」など、マウスやラットでは「異常」と判定され

る形態変異が頻発し、これらの異常頻度には TCDD 投与群と有意な差は認められなかった。アカゲザルで口蓋ヒダを発生毒性検出指標として活用するには、さらに対照群の例数を増し、「異常」の定義を検討する必要があると考えられる。(詳細は安田分担研究報告書参照)

7. 児の四肢奇形の観察とサルのだイオキシソ類汚染量の疫学調査

TCDD を胎児期—離乳期に 30 または 300 ng/kg を曝露した約 40 頭とコントロール約 20 頭から分娩された児において四肢奇形を持つ個体は見られなかった。血液疫学調査を行った 2 地点の調査した 8 頭のサル総てからだイオキシソの異性体が検出された。TCDD は 2 頭の血液中から検出された。ポリ塩化ジベンゾフランとコプラナポリ塩化ビフェニルは高く占め、ポリ塩化ジベンゾパラジオキシソは低含量であった。異性体から算出した TEQ を用いて四肢奇形個体と正常四肢個体を比較した。誕生年毎の変化をプロットすると奇形個体の TEQ は正常個体の変化の範囲内であり差異はみられなかった。野生群および飼育群の間の TEQ についても差異は見られなかった。

(詳細は浅岡分担研究報告書参照)

8. 生殖能解析

生殖器の形態、分化、肛門—生殖器間距離、精巣下降、月経など、別表にま

とめた。また、雄サルを麻酔し、生殖器（陰茎、精巣）を写真撮影した。生殖能に関しては、F1a 雌で、コントロール 8 例中 5 例に、30ng/kg 投与群 5 例中 3 例に、300ng/kg 投与群 3 例中 3 例に、月経の不規則な出現が見られた。雄では、精巣下降がコントロール 4 例中 3 例に、30ng/kg 投与群 6 例中 4 例に、300ng/kg 投与群 5 例中 4 例に見られ、精巣下降に関しては、TCDD の影響はほとんどないと考えられた。肛門－生殖器間距離を計測したが、TCDD の影響は見られなかった。精巣サイズおよび陰茎長を計測し生殖能（精子形成能）を推定したところ、まだ生殖年齢に達していないと判断し、さらに飼育を継続することとした。

D. 考察

F1a では、コントロールと比較して、TCDD300ng/kg 投与群（追加群を含めた場合）で、流死産、生後死が多発した。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、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、多くのタンパク質および遺伝

子の発現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と考えた。TCDD300ng/kg 投与群のうち追加投与群（9 例中生存が 2 例のみ。流死産 6 例。F1 死亡 1 例）を別にして、コントロール、30ng/kg 投与群、300ng/kg 投与群を比較した場合、流死産や生後死の頻度は本研究の目的である TDI の妥当性の検討に有用な指標とはなりにくいと判断した。

F1a 死亡例（0ng/kg 6 例、30ng/kg 3 例、300ng/kg 9 例）について詳細な解析を行なったところ、これまでに全く報告のない「特異な腎線維化」（腎臓間質性および腎盂周囲性線維化）および「多様な形成異常及び分化の異常」を見出した。さらにこの新規の病変は、コントロールおよび 30ng/kg 投与群では見られず、300ng/kg 投与群にのみ見られたことから、今後、と殺し解析する F1a の結果も合わせて判断する必要があるが、現行の TDI が妥当であるという有用な情報提供をもたらす大きな成果となる可能性が高いと考えられる。

この新規腎病変・疾患について以下に考察する。これまで全く報告がなく、本研究のアカゲザルを用いた実験で発見した新規の病変である。また、低用量投与で用量依存性に次世代（子サル）に高頻度（55%）で認められた

こと、最近明らかになった他のダイオキシン障害（安田班報告：歯の発生異常所見）との関連もみられたこと、腎不全という強い腎機能障害を伴うことなどから極めて重大な障害と判断される。そのため、障害を受けた特定の細胞や代謝系を今後明らかにすることは、ダイオキシンの生体障害性の解明に大きく貢献するのみでなく、TDIの妥当性の情報として重要であり、同病変やダイオキシン障害の診断や治療に大きく貢献すると考えられる。この病変がサルゆえに出現したのか、あるいは齧歯類でも出現するのは今後の課題である。腎間質性腎炎・線維化はヒトの薬物性腎障害あるいは腎移植後の病変として最近問題になることが多くなり、重篤な腎障害の大きな原因の一つであるが、原因が明らかでない場合が多く、有用な動物モデルもない。本研究の実験結果はダイオキシンによる新規腎病変・疾患（特異な腎間質線維化）発生機序の解明により、内分泌かく乱物質の臓器障害性の解明に大きく寄与するのみでなく、同病変（疾患）あるいは類似・近縁病変の有用な動物実験モデルの樹立に貢献できる。対象とする特異な腎間質線維化は腎盂・腎杯周囲線維化から連続して腎内に不規則な分布の線維化を伴うこと、腎乳頭萎縮を伴うこと、限局型が存在することなどの点で従来報告されている間質性腎炎・線維化とは異なり、新たな疾患概念に

分類されると考えられる。

妊娠アカゲザルおよび哺育中のアカゲザルにTCDDを皮下投与した時の雌雄出生児の生殖器の形態、精子形成および生殖能に及ぼす影響を解析する実験では、F1aで生後1日で見られた新生児の新生児の肛門-外生殖器間距離の短縮は生後日数とともに有意差がなくなった。外部形態についてはいずれの群においても異常は見られなかった。現在F1a雄は、班員の専門家の判断を参考にして年齢的にいまだ、F2を誕生させるという意味での生殖能を持つに至っていないと判断し、飼育を継続することとした。雌は不規則な月経が見られており、生殖能の解析が近いうちに可能と考えられるが、飼育を続けて最適の時期に解析する予定である。

昨年報告した肝臓の altered cell foci（1例）は、本年度の解析では見られていないが、発癌は時間のかかる可能性もあり、この結果のみで発癌性は見られないと結論できない。発癌に関して、タンパク解析の結果

（Caspase-8、Bad、EGF-Rの発現が誘導）も含めて考察すると、TCDDにより細胞死の情報伝達系が誘導され、その修復過程で発癌する可能性が考えられる。さらに、EGF-Rの高発現は、癌化との関連性がいわれており、EGF-Rの高発現自体が発癌に繋がる可能性が示唆される。

TCDD 投与後長期（3年以上）経過後の F0 サル肝臓におけるウェスタンブロッティング法による解析結果を考察する。

EGFR は増殖因子であることから癌化に伴い強く誘導されると考えられ、EGFR が TCDD 投与、特に 30 ng/kg 投与群において 4.2 倍と高く誘導されていること、さらに病理組織学的に増殖性病変が肝臓と胆管に認められたことから、TCDD による肝臓病変、特に F0 の癌化を *in vivo* で確認することが重要である。細胞のアポトーシスに伴って誘導される caspase 8 も TCDD 投与において顕著に増大したことから、さらなる研究が必要であると考えられる。

TCDD 投与後長期（3年以上）経過後の F0 サル脳（中心前回）におけるウェスタンブロッティング法による解析結果を考察する。運動野として知られる中心前は中枢神経系に関与する脳部位である。本研究では中心前回では扁桃体と比較して、変動したタンパク質は共通するものが多かったが、タンパク質の変動レベルは低いものであった。またタンパク質の変動レベルは中心前回において TCDD 30 ng/kg でのみ変動の見られるものと 300 ng/kg でより強い変動が見られるものと、2 種の傾向が認められた。また TCDD 投与により AhR, Arnt1 を介して誘導される cytochrome P450 (CYP1A1) は本研究において TCDD 投与群と対照群の間に有意な差、増加は認められなかった。扁桃体におけるデータ

と比較し、脳において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。

TCDD 投与後長期（3年以上）経過後の F0 サル脳（扁桃体）におけるウェスタンブロッティング法による解析結果を考察する。情動に関与すると考えられている扁桃体においては、肝臓、中心前回と比べさらに多くのタンパク質が誘導されていることが明らかとなった。特に CYP1A1, phospho-Akt, Bad においては TCDD 30 ng/kg 投与で対照群と比べ強く誘導されている。さらに、重要であると考えられる結果は扁桃体における TCDD 受容体、AhR とその転写因子 Arnt1 が TCDD 30 ng/kg においても顕著に誘導されており、タンパク質レベルでは、TCDD 30 ng/kg の影響も大きいと考えられる。TCDD の脳への影響を調べた報告は多くないことから、サルを用いた本研究結果は貴重な情報となる。

TCDD を胎児期—離乳期に 30 または 300 ng/kg を曝露した約 40 頭とコントロール約 20 頭から分娩された児において四肢奇形を持つ個体は見られなかった。血液疫学調査を行った 2 地点の調査した 8 頭のサル総てからダイオキシンの異性体が検出され、TCDD は 2 頭の血液から検出された。TCDD が検出された 2 頭においては四肢奇形性との関連はみられなかった。TEQ において野生群および飼育群の

間および四肢奇形と正常四肢の個体間の差異はいずれも見られなかった。ヒトにおいて四肢奇形性は胎児期 12 ステージで生じることが知られている。アカゲザルやニホンザルなどのマカク属サルには四肢奇形が生じ、この感受期は妊娠 24 日以後と報告されている。我々の実験計画は曝露を妊娠 20 日目から始めていることから TCDD の四肢形成影響を検討することに合理性がある。以上を合わせて考慮すると、ダイオキシン類から換算された TCDD または曝露された TCDD は少なくとも単独では四肢奇形形成に関連しないと推定された。

TDI 妥当性に関して以下に考察する。

本研究は、Faqi や Gray らの実験

(TCDD の影響を齧歯類で解析し、オス児の精子産生数の減少、メス児の泌尿生殖器の形態異常, LOAEL86ng/kg) を参考にして設定された TDI (4pg/kg/day) の妥当性をよりヒトに近いサルで行い検討することが目的である。母体負荷量として、86ng/kg が中間になるように、TCDD30ng/kg と 300ng/kg を投与する実験を設定した。本研究で、TCDD が、これまでに全く報告のない「特異な腎線維化」(腎臓間質性および腎盂周囲性線維化) および「多様な形成異常及び分化の異常」を引き起こすことを見出した。コントロールと TCDD30ng/kg では、後者

での 1 例の軽度の病変を除いてこの病変は誘導されず、300ng/kg で誘導された結果からは、現行の TDI は妥当と考えられた。

ただ、遺伝子解析、タンパク質解析、病理組織学的解析などの結果からは、30ng/kg の影響も大きいと考えられた。また、TDI 設定に、AhR 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るべきとの考え方が強くなってきており、我々が行っている AhR 自体の発現解析、AhR を介する情報伝達系の解明も重要な実験と考えられる(昨年度の報告書参照)。今後「特異な腎線維化」(腎臓間質性および腎盂周囲性線維化) および「多様な形成異常及び分化の異常」と AhR の発現の関連性も解析し、総合的に判断する必要がある。

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、平成 11 年より一連の継続的実験を行ってきた。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、TCDD300ng/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、F1a 程の顕著な差が見られなかった。TCDD 300ng/kg 投与群のうち追加投与群（9 例中生存が 2 例のみ。流死産 6 例。F1 死亡 1 例）を別にして、コントロール、30ng/kg 投与群、300ng/kg 投与群を比較した場合、流死産や生後死の頻度は本研究の目的である TDI の妥当性の検討に有用な指標とはなりにくい判断した。

F1a 死亡例、F1b の屠殺例について、新規の「特異な腎線維化および多様な形成異常及び分化の異常」を見出した。この病変は、対照群および 30ng/kg 投与群では、後者の軽微な 1 例を除いて全く見られず、F1a 死亡例 300ng/kg 投与群 11 例中 6 例、F1b の屠殺例 11 例中 5 例、総計で 22 例中 11 例、という高頻度で出現した。再現性があり、300ng/kg 投与群に高頻度で出現しており、現行の TDI の妥当性を支持するデータであった。

昨年度報告した 1 例の肝臓に altered foci は本年度の解析では見られなかった。TCDD による発癌性との関連でタンパク質発現を解析した。Caspase-8、Bad、EGF-R の発現が誘導されており、TCDD により細胞死の情報伝達系が誘導され、その修復過程で発癌する可能性が示唆された。さらに、EGF-R の高発現は、癌化との関

連性がいわれており、EGF-R の高発現自体が発癌に繋がる可能性も示唆された。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結果、30ng/kg および 300ng/kg 投与群の両方で多くのタンパク質の発現が変動していた。

生殖器の形態、分化、精巣下降、陰茎のサイズ、精巣サイズ、月経などから、まだ生殖年齢に達していないと判断し、さらに飼育を継続することとした。ただ、雌は月経が不規則に発現しており、1 年以内に解析できる可能性がある。

まとめ=TCDD（高投与量群）の F1 世代への影響として、新規の病変である「特異な腎線維化および多様な形成異常及び分化の異常」を発見した。現行の TDI の妥当性を支持する大きな成果を得た。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Asaoka, K., Iida, H., Suzuki, J., Watanabe, K., Goda, H., Ihara, T., Nagata, R., Yasuda, M., and Kubota, S. No effects of dioxin singly on limb malformations in Macaque monkeys through epidemiological and treated studies. Organohalogen Compounds 66, 3421-34, 2004
- (2) Korenaga, T., Kubota, S., Ohta,

- M., Asaoka, K., Murata, N., Nomizu, M., Arima, A., and Fukusato, T.: Liver injury in Rhesus monkeys subcutaneously injected with 2, 3, 7, 8-tetrachloro dibenzo-*p*-dioxin. *Organohalogen Compounds* 66:3315-3320, 2004
- (3) Ohta, M., Akema, S., Tsuzuki, M., Korenaga, T., Fukusato, T., Asaoka, T., Murata, N., Nomizu, M., Arima, A., and Kubota, S.: Effects of 2,3,7,8-tetrachloro dibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on signal transduction pathway-related protein expression in liver and cerebrum of Rhesus monkey. *Organohalogen Compounds* 66:3299-3304, 2004
- (4) Yasuda, I., Yasuda, M., Sumida, H., Arima, A., Ihara, T., Kubota, S., Asaoka, K., Takasuga, T., Tsuga, K., and Kagawa, Y. In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) affects tooth development in Rhesus monkeys. *Organohalogen Compounds* 66:3321-3325, 2004
- (5) Yasuda, I., Yasuda, M., Sumida, H., Tsusaki, H., Arima, A., Ihara, T., Kubota, S., Asaoka, K., Tsuga, K., and Akagawa, Y. In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) affects tooth development in Rhesus monkeys. *Reproductive Toxicology* in press
- (6) Asaoka, K., Iida, H., Watanabe, K., Miyaji, K., Goda, H., Ihara, T., Yasuda, M., and Kubota, S. Contamination of dioxins in free ranging and breeding monkeys in Japan and relationship analysis between limb malformations and administration with 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on macaque monkeys. (submitted to *Chemosphere*)
- (7) Ohta, M., Akema, S., Tsuzuki, M., Korenaga, T., Fukusato, T., Asaoka, K., Murata, N., Arima, A., and Kubota, S. (2005) Long-term Effects of 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on signal transduction pathway-related protein expression in precentral gyrus, amygdaloid body and liver of rhesus monkey. (submitted to *Chemosphere*)
- (8) Korenaga, T., Fukusato, T., Ohta, M., Asaoka, K., Murata, N., Arima, A., and Kubota, S. (2005) Long-term effects of subcutaneously injected 2,3,7,8-tetra-chlorodibenzo-*p*-dioxin on the liver of rhesus monkeys.