



Bar means \pm SD (n=3), ** $p < 0.01$

図 3-11. TCDD 単回投与アカゲザル (F0) の扁桃体におけるタンパク質変動
-c-Jun-

表 1 使用一次抗体一覧

No.	一次抗体名	Cat. No.
1	CYP1A1	299124* ¹
2	Ah-R	sc* ² -5579
3	Arnt1	sc-8076
4	Akt 1/2	sc-8312
5	p-Akt1/2/3-R	sc-7985
6	p-Akt (Ser473)	#4051* ³
7	p-Erk 42/44	#9101
8	p-p42/44 MAPK	#9106
9	p-MEK1/2	#9121
10	p-SAPK/JNK	#9255
11	p-JNK	sc-6254
12	p53	sc-1314
13	p-p53	sc-7997
14	p-c-Src-R	sc-12350R
15	p-p38	sc-9216
16	PI3K p85	sc-423
17	PI3K p110	sc-1332

表1 使用抗体一覽 b

18	p-GSK3 β (Ser9)	#9336
19	p-GSK 3 α / β	#9331
20	caspase 3	sc-7148
21	caspase 7, p20	sc-8512
22	caspase 8, p20	sc-7890
23	caspase 9, p10	sc-7885
24	p- β -Catenin (Thr41/Ser45)	#9565
25	MMP2	sc-6838
26	Bcl-2	sc-7832
27	Bcl-Xs/L	sc-1041
28	MKP2	sc-1200
29	integrin- β 1	sc-8978
30	catenin	sc-9565
31	catenin	sc-9561
22	EGFR	sc-03
23	VE-cadherin	sc-6458
24	integrin- β 1	sc-8978
25	Laminin α -1	sc-5582
26	HGF α	sc-7949

表1 使用抗体一覽 c

27	NGF	sc-548
28	CNTF	sc-13996
29	EGFR	sc-03
30	VE-cadherin	sc-6458
31	integrin- β 1	sc-8978
32	Laminin α -1	sc-5582
33	HGF α	sc-7949
34	NGF	sc-548
35	CNTF	sc-13996
36	EGFR	sc-03
37	VE-cadherin	sc-6458
38	p- β -Catenin (Ser33/37/Thr41)	#9561
39	BDNF	sc-546
40	PDGFR α	sc-338
41	p-VEGF-R2	#2474
42	HSP60	sc-1052
43	Raf1	sc-227
44	Bad (C7)	sc-8044
45	Bax	sc-493
46	Bcl-x s/L	sc-1041

47	BDNF	sc-546
48	AMPK- α	#2532
49	p-Tyr	sc-7020
50	c-Jun	sc-45
51	p-c-Jun	#9261
52	c-Fos (4)	sc-52
53	L-Myc	sc-790
54	N-Myc	sc-791
55	c-Myc	sc-40
56	Met (c-28)	sc-161
57	PARP	sc-1561
58	p70 s6 kinase	sc-230
59	cas	#4011
60	p-APP (Ser668)	#2451
61	Ob	sc-842
62	Ob-receptor	sc-8391

*1 第一化学薬品株式会社

*2 sc: Santa-Cruz Biotechnology, Inc.

*3 #: Cell Signaling Technology.

表2 ウェスタンブロッティングによる解析結果, 肝臓

No.	一次抗体名	Cat. No.	Monkey No.			/control		t 検定			傾向
			cont.	TCDD		TCDD		p	有意差		
				30ng	300ng	30 ng/kg	300 ng/kg				
1	Ah-R	sc-5579	6	19	40	ND	ND				ND
			12	28	57	ND	ND				
				29	34	ND	ND				
			mean								
			SD								
2	Arnt1	sc-8076	6	19	40	ND	ND				ND
			12	28	57	ND	ND				
				29	34	ND	ND				
			mean								
			SD								
3	CYP1A1	299124	6	19	40	0.968	1.135	c-30	0.0019	**	↑
			12	28	57	1.923	4.529	c-300	0.0010	**	
				29	34	3.611	1.794	30-300	0.3561	-	
			mean			2.167	2.486				
			SD			1.338	1.800				
4	VE-cadherin	sc-6458	6	19	40	0.454	0.619	c-30	0.0461	*	↓
			12	28	57	0.965	1.102	c-300	0.0261	*	
				29	34	0.605	0.416	30-300	0.3569	-	
			mean			0.675	0.713				
			SD			0.263	0.352				
5	EGFR	sc-03	6	19	40	9.442	3.745	c-30	0.0002	**	↑

表2 ウエスタンブロッティング解析結果・肝臓 f

			12	28	57	1.726	1.173	c-300	0.0017	**	
				29	34	1.627	1.528	30-300	0.0881	-	
			mean			4.265	2.149				
			SD			4.483	1.394				
6	Akt	sc-1042	6	19	40	0.433	0.718	c-30	0.1113	-	→
		sc-8312	12	28	57	1.008	1.055	c-300	0.3195	-	
		sc-8312		29	34	0.988	0.886	30-300	0.2105	-	
		mean			0.810	0.886					
		SD			0.326	0.168					
7	p-Akt1/2/3	sc-7985	6	19	40	1.259	2.038	c-30	0.1681	-	↑
			12	28	57	1.013	1.372	c-300	0.0210	*	
			12	29	34	1.072	2.069	30-300	0.0961	-	
		mean			1.115	1.826					
		SD			0.128	0.394					
8	Bad (C7)	sc-8044	6	19	40	1.409	1.220	c-30	0.0072	**	↑
			12	28	57	1.710	1.048	c-300	0.0913	-	
				29	34	2.708	1.412	30-300	0.0669	-	
		mean			1.943	1.226					
		SD			0.680	0.182					
9	caspase 8	sc-7890	6	19	40	2.941	5.026	c-30	0.0029	**	↑
			12	28	57	1.082	1.390	c-300	0.0008	**	
				29	34	1.118	1.604	30-300	0.2135	-	

表2 ウェスタンブロッティング解析結果・肝臓 g

			mean			1.714	2.673				
			SD			1.063	2.041				
10	Raf1	sc-227	6	19	40						↑
			12	28	57	3.022	1.433				
				29	34	1.784	2.330				
			mean			2.403	1.881				
			SD			0.875	0.635				

各データにつき Student-*t* 検定を行い各群間の有意差を検定した. *P* 値が 0.05, 0.01 以下を有意差有り と判定した.

p* < 0.05, *p* < 0.01, -: not significant.

表3 ウェスタンブロッティングによる解析結果, 大脳 (中心前回)

No.	一次抗体名	Cat. No.	Monkey No.			/control		t 検定			傾向
			cont.	30ng	300ng	30 ng/kg	300 ng/kg		p	有意差	
1	Ah-R	sc-5579	6	19	40	ND	ND				
			12	28	57						
				29	34						
			mean								
SD											
2	Arnt1	sc-8076	6	19	40	0.573	0.248	c-30	0.0411	*	→
			12	28	57	1.539	1.990	c-300	0.0124	**	
				29	34	1.031	0.769	30-300	0.2260	-	
			mean			1.009	0.966				
			SD			0.360	1.557				
3	CYP1A1	299124	6	19	40	1.660	1.383	c-30	0.0551	-	→
			12	28	57	1.429	0.959	c-300	0.0655	-	
				29	34	1.182	1.083	30-300	0.4541	-	
			mean			1.368	1.070				
			SD			0.163	0.300				
4	VE-cadherin	sc-6458	6	19	40	0.320	1.140	c-30	0.0417	*	↓
			12	28	57	0.863	0.216	c-300	0.0152	**	
				29	34	0.685	0.594	30-300	0.2620	-	

表3 ウェスタンブロットリング解析結果・中心前回 i

			mean			0.614	0.656				
			SD			0.384	0.267				
5	EGFR	sc-03	6	19	40	1.030	1.173	c-30	0.0019	**	↑
			12	28	57	3.524	0.143	c-300	0.0010	**	
				29	34	1.500	3.636	30-300	0.3528	-	
			mean			2.450	1.308				
			SD			1.431	2.470				
6	Akt	sc-1042	6	19	40	0.775	1.729	c-30	0.1225	-	→
			12	28	57	1.380	1.011	c-300	0.0717	-	
		sc-8312		29	34	0.968	1.008	30-300	0.3563	-	
			mean			1.078	0.757				
			SD			0.291	0.002				
7	p-Akt1/2/3	sc-7985	6	19	40	1.239	1.212	c-30	0.1979	-	↑
			12	28	57	1.159	1.932	c-300	0.0223	*	
				29	34	1.388	1.347	30-300	0.0844	-	
			mean			1.273	1.558				
			SD			0.162	0.414				
8	Bad	sc-8044	6	19	40	1.742	1.712	c-30	0.0204	*	↑
			12	28	57	1.886	1.228	c-300	0.0203	*	
				29	34	1.133	2.023	30-300	0.4989	-	
			mean			1.624	1.665				

表3 ウェスタンブロッティング解析結果・中心前回 j

			SD			0.533	0.562				
9	Raf1	sc-227	6	19	40	1.769	2.308	c-30	0.0243	*	↑
			12	28	57	1.667	0.794	c-300	0.0054	**	
				29	34	1.091	1.182	30-300	0.1777	-	
			mean			1.609	1.069				
			SD			0.073	1.071				
10	caspase3	sc-7148	6	19	40	0.688	4.188	c-30	0.1061	-	↑
			12	28	57	0.879	2.150	c-300	0.0022	**	
				29	34	1.022	2.000	30-300	0.0019	**	
			mean			0.829	3.025				
			SD			0.168	1.222				

各データにつき Student-*t* 検定を行い各群間の有意差を検定した。P 値が 0.05, 0.01 以下を有意差有り と判定した。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, -: not significant.

表4 ウェスタンブロッティングによる解析結果, 扁桃体

No.	一次抗体名	Cat. No.	Monkey No.			/control		t 検定			傾向
			cont.	30ng	300ng	30 ng/kg	300 ng/kg		p	有意差	
1	Ah-R	sc-5579	6	19	40	3.574	3.458	c-30	0.0010	**	↑
			12	28	57	3.500	3.074	c-300	0.0003	**	
				29	34	6.729	8.928	30-300	0.2406	-	
			mean			3.906	3.925				
			SD			1.843	3.275				
2	Arnt1	sc-8076	6	19	40	2.552	8.084	c-30	0.0034	**	↑
			12	28	57	4.108	5.332	c-300	0.0015	**	
				29	34	2.292	5.705	30-300	0.3020	-	
			mean			3.153	6.640				
			SD			0.982	1.493				
4	VE-cadherin	sc-6458	6	19	40	0.666	0.777	c-30	0.0536	-	↓
			12	28	57	0.426	0.838	c-300	0.0288	*	
				29	34	0.181	0.229	30-300	0.3433	-	
			mean			0.422	0.581				
			SD			0.243	0.335				
5	EGFR	sc-03	6	19	40	0.530	2.241	c-30	0.0245	*	↑
			12	28	57	0.579	1.596	c-300	0.0248	*	
				29	34	1.180	2.204	30-300	0.4967	-	

表4 ウェスタンブロッティング解析結果・扁桃体 1

			mean			0.733	2.033					
			SD			0.362	0.362					
6	Akt	sc-1042	6	19	40	1.431	1.219	c-30	0.0316	*		
			12	28	57	0.948	1.169					c-300
		sc-8312		29	34	0.827	0.757	30-300	0.3863	-		
			mean			1.089	1.042					
			SD			0.320	0.254					
7	p-Akt1/2/3	sc-7985	6	19	40	4.868	6.143	c-30	0.0013	**	↑	
			12	28	57	4.519	3.339					c-300
		sc-7985		29	34	1.931	2.105	30-300	0.3755	-		
			mean			3.527	3.688					
			SD			1.604	2.070					
8	p-Akt (Ser473)	#4051	6	19	40	0.062	2.977	c-30	-		↑	
			12	28	57	0.609	3.082					c-300
		#4051		29	34			30-300	-			
			mean			0.423	3.046					
			SD			0.387	0.074					
9	Bad	sc-8044	6	19	40	4.158	4.645	c-30	0.0028	**	↑	
			12	28	57	5.961	5.819					c-300
		sc-8044		29	34	4.001	4.250	30-300	0.3596	-		
			mean			4.692	4.883					

表4 ウェスタンブロッティング解析結果・扁桃体 m

			SD			1.089	0.816				
10	Raf1	sc-227	6	19	40	2.409	1.476	c-30	0.0132	*	↑
			12	28	57	3.233	9.421	c-300	0.0002	**	
				29	34	2.330	1.340	30-300	0.0115	*	
			mean			2.540	3.007				
			SD			0.500	4.627				
11	AMPK		6	19	40	1.691	6.013	c-30	0.4892	-	↑
			12	28	57	1.713	1.942	c-300	0.0008	**	
				29	34	1.606	3.233	30-300	0.0007	**	
			mean			1.673	3.446				
			SD			0.057	2.080				
12	PI3K-p110		6	19	40	2.617	3.746	c-30	0.0202	*	↑
			12	28	57	3.055	1.665	c-300	0.0113	*	
				29	34	1.494	2.192	30-300	0.3564	-	
			mean			2.337	2.827				
			SD			0.805	1.082				
13	BDNF		6	19	40	9.458	22.131	c-30			
			12	28	57			c-300			
				29	34			30-300			
			mean								
			SD								

表4 ウェスタンブロッティング解析結果・扁桃体 n

14	c-Jun		6	19	40	2.568	1.077	c-30	0.0053	**	↑
			12	28	57	4.779	6.681	c-300	0.0017	**	
				29	34	1.719	3.777	30-300	0.2411	-	
		mean				2.853	1.907				
		SD				1.580	2.803				

各データにつき Student-*t* 検定を行い各群間の有意差を検定した. *P* 値が 0.05, 0.01 以下を有意差有り と判定した.

p* < 0.05, *p* < 0.01, -: not significant.

平成 16 年度厚生労働科学研究費
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 帝京大学 教授
研究協力者 是永 龍巳 日本食品衛生協会
リサーチ・レジデント

研究要旨

ダイオキシン類による臓器障害が種々の臓器で、しかも親世代のみでなく次世代にもみられることが問題になっている。ヒトに近い霊長類における実験的研究により TDI 値の妥当性を再検証することが今回の研究の目的である。妊娠アカゲザルに 0, 30, 300 ng/kg TCDD を背部皮下投与し、妊娠 20 日から分娩後 90 日まで初回投与後 30 日毎に血中濃度維持量である初回投与量の 5% 量を追加投与した。剖検時および屠殺時の母動物および出生仔ザルにおける諸臓器を肉眼観察、光学顕微鏡に組織学検討、電子顕微鏡による超微構造の観察、免疫組織化学的検討、western blotting に蛋白の変動、microarray に網羅的遺伝子解析などによって検索した。母動物の臓器変化で特記すべきは肝臓病変で、局所性の脂肪化(focal fatty change)、梗塞、出血、類洞内微小血栓形成などで、いずれも肝内の循環障害を示しており、また、その循環障害と関連する病変として、小葉内に不規則な分布で肝細胞密度の増加(small cell hypercellularity)、類洞内の α 平滑筋アクチン陽性細胞の増加が認められた。さらに、電子顕微鏡による検討で、類洞内皮細胞の変性と星細胞の活性化を示す所見が得られた。昨年度までの成果にさらに詳細な蛋白分析の結果を加えた。仔ザルにおける臓器障害で特記すべきは腎病変で、昨年見出した第 1 仔の死亡剖検例の間質性腎炎様変化に加えて、第 1 仔の屠殺例および第 2 仔の屠殺例の腎に多様な形成異常及び分化の異常

が明らかとなった。腎病変のほとんどが TCDD 300 ng/kg 投与群で認められた。これらの所見は今回の所期の目的である TDI の検討にも極めて有用なデータとなると判断される。

A. 研究目的

妊娠アカゲザルに TCDD を皮下投与した時の母動物 (F0), 雌雄出生仔 (F1) の諸臓器への影響を調べる。この研究により最も妥当性のあるダイオキシンの TDI 値設定に有用な情報を提供し, 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 Laboratory あるいは関東化学で調整済みの 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) を使用した。TCDD の希釈調製および対照群にはトルエン/DMSO (1:2, v/v) を用いた。ダイオキシンの終濃度の測定にはガスクロマトグラフィーを用い確認を行った。

2. 試験動物: 本研究には集団飼育されたアカゲザルを用い, アカゲザルは China National Scientific Instruments & Materials Import/Export Corporation, Beijing, China から購入した。アカゲザルは株式会社 新日本科学 (鹿児島)

において検疫, 予備飼育を行った。一般状態の観察, 体重・身長測定, 血液生化学検査を行い異常のないアカゲザル (年齢: 3~10 歳, 体重: 4~7 kg) を本研究の実験動物として選択した。妊娠動物の実験は, 約 20 匹/群, 計 60 匹を用いた。交尾が確認された雌アカゲザルにおいて交尾期の中央日 (月経サイクルの Day 13) を妊娠日 (gestation day: GD 0) とした。GD 18, 19 において超音波検査により妊娠を確認した。妊娠したアカゲザル (F0) を三群に分け, TCDD, 0, 30, 300 ng/kg をサルの背部皮下に単回投与し, 妊娠 20 日から分娩後 90 日まで, 維持量として投与後 30 日毎に初回投与量の 5% 量を追加して投与した。妊娠動物は自然分娩させ, 出産日を生後 0 日とし児 (F1) を哺育させた。F1a および F1b を得た。F0 アカゲザルにおいては分娩後 4 年間飼育, 観察を行い, 屠殺・剖検を行った。

3. 死亡例の剖検時および生存例の屠殺時に諸臓器の①肉眼観察を行い, 適切な部位・臓器の検体採取と検

体処理を行った後、②病理組織学的検討、③組織化学的検討、④免疫組織化学的検討、⑤超微形態学的（電子顕微鏡的）検討、⑥形態計測的解析、⑦Western blot analysisなどを行った。

4. タンパク質解析

剖検後、組織を破砕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ェ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. 網羅的遺伝子解析

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

遺伝子解析を委託した。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。

6. 統計処理

データはスチューデント t 検定法により有意差検定を行った。なお有意水準 95%, 99% を採用し $p < 0.05$, $p < 0.01$ を有意差と判定した。

C. 研究結果

1. 親アカゲザル (母動物, F0) における肝病変

2004年1年10日と2月25日にF0サルの剖検(計10頭)を行いTCDD投与長期経過後(4年以上)の影響を解析する実験を遂行した。昨年度

までの解析結果に加えて、さらに詳細な蛋白分析を行った。肝組織内のダイオキシン受容体(AhR)蛋白および血管内皮細胞カドヘリン(VE-cadherin)蛋白の発現が投与ダイオキシン用量依存性に減少し、肝組織内の CYP1A1 蛋白および TGF-beta 蛋白の発現はダイオキシン用量依存性に増加していた。

2. 仔アカゲザル (第1仔) (F1a)死亡例と追加群における腎病変

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 頭でのみ特異な腎線維化が認められた。詳細に検討した結果、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、同時に腎盂・腎杯周囲の強い線維化も伴い、腎乳頭萎縮、血管の強い硬化も認められた。300ng/kg 群では 2 頭が腎不全で死亡していた。

組織学的に詳細に検討する 30ng/kg の中の 1 頭でもごく軽微が腎皮質内小

病変が認められた。本解析の対象となったアカゲザルを以下に示した。

コントロール群：6 頭

サル番号：3,9,15,58,61,49'

30 ng/kg 群：4 頭

サル番号：16,23,24,26

300 ng/kg 群：11 頭

サル番号：死亡例 8 頭

(32,38,40,41,45, 51,57,68)

追加サル番号：死亡例 1 頭(102)、
屠殺例 2 頭(106,109)

3. 仔アカゲザル (第2仔) (F1b)の腎病変

①本解析の対象となったアカゲザルを以下に示した。

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)

②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、表面に凹凸を伴う。コントロール群と 30ng/kg 群の腎に著変なし。

③組織所見：300ng/kg 群で屠殺例 4