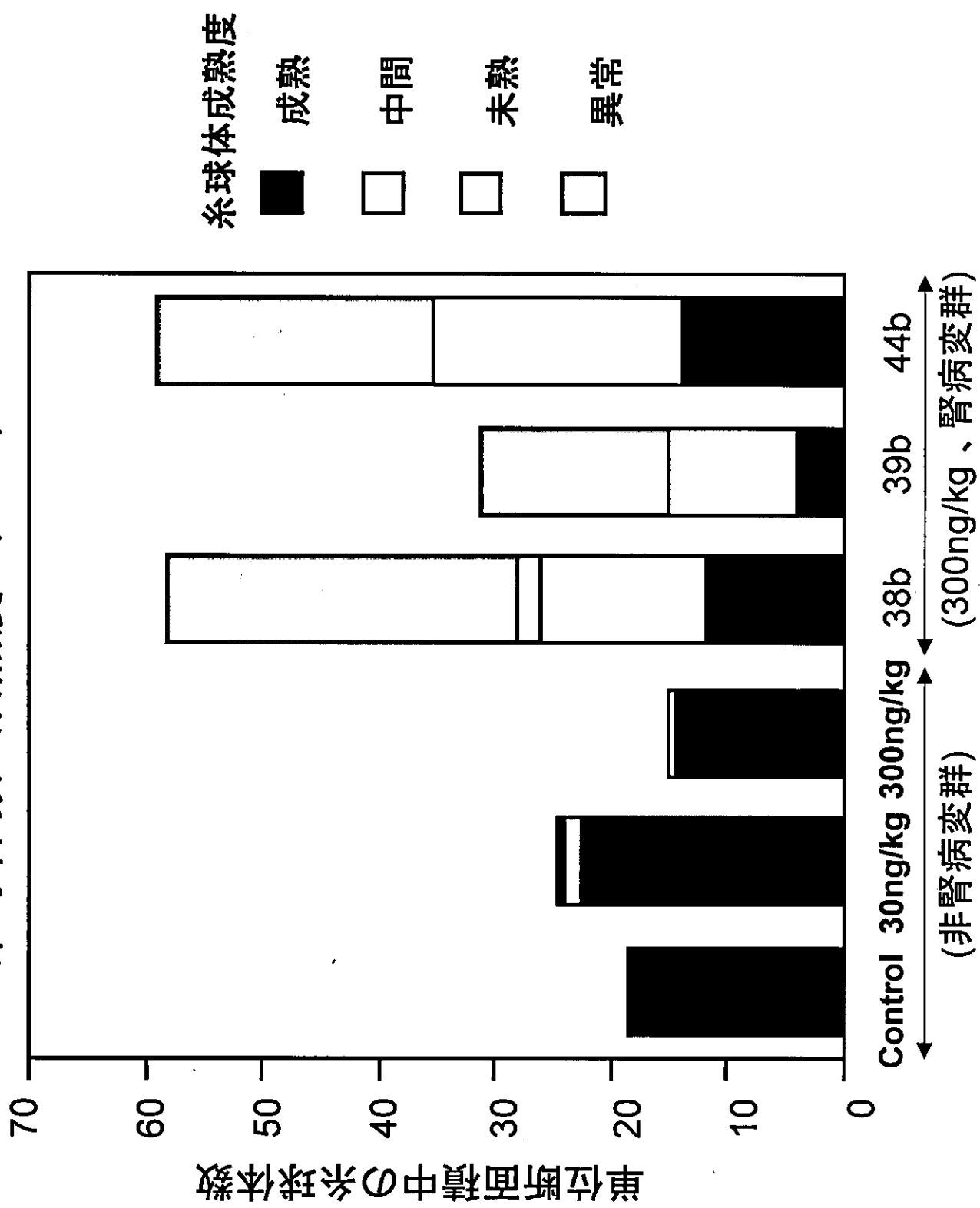


糸球体数と成熟度 (F1b)



腎病変のまとめ

- TCDD非投与群及び30ng/kg投与群から生まれたF1（各々6頭、3頭）で腎病変は見られず、300ng/kg投与群からの9頭中5頭でのみ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、腎乳頭萎縮も認められた。

仔アカゲザルの腎病変

	TCDD 0ng/kg	TCDD 3-30ng/kg	TCDD 300ng/kg
実験1	0/6	1/4	6/11
実験2	0/11	0/10	5/11
実験3	0/1	0/3	1/1
合計	0/18	1/17	12/23

平成16年度厚生労働科学研究費
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	帝京大学教授
共同研究者	福里 利夫	帝京大学教授
共同研究者	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、親世代のみでなく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、齧歯類の実験結果を参考にして4pg/kg/dayと設定された。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行ってきた。アカゲザルの母体に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。F1世代への影響として、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。本分担研究は、特に、TCDDによる発癌性を病理組織学およびタンパク質解析をとおして検討する目的で行われた。昨年度、F1の1例に、altered foci（癌化）が見出された。また、TCDDの受容体であるAhRをヒト肝臓癌組織で解析し、TCDDによる発癌性とヒト肝臓癌の密接な関連性について考察した。今年度は、F1aを除く全ての生存サル（F0およびF1b、追加群）の屠殺を行い癌化に関する解析を行なった。肝臓のaltered foci（癌化）は、本年度の屠殺例では見られなかった。TCDD投与後3年以上経過したF0サルの肝臓を用いて、癌化と密接な関連性がある細胞死あるいは細胞増殖と関連のあるタンパク質の発現解析を行い、以下の結果を得た。細胞死の情報伝達系のCaspase-8では、30ng/kg および300ng/kg TCDDの両方で発現誘導が認められたが、300ng/kg TCDDでより強い発現誘導であった。同じく、細胞死の情報伝達系のBadは、30ng/kg および300ng/kg TCDDの両方で発現誘導が認められたが、30ng/kg TCDDでより強い発現誘導であった。細胞増殖に関与するEGFRは、30ng/kg および300ng/kg TCDDの両方で発現誘導が認められたが、30ng/kg TCDDでより強い発現誘導であった。このように、タンパク質解析の結果からは、TCDD 30ng/kgの影響も大きいと考えられた。

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する総合研究の分担研究として、主として、TCDDによる発癌性の解明を目的とした。

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 (F1a)。F1bの投与量は、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。

2. 試験動物

アカゲザル (年齢: 5~7歳, 体重: 4~6 kg) 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。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。

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。

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。

4. タンパク質解析

F0世代は、TCDD投与後3年以上経過しており、長期間の影響を細胞増殖（発癌）や細胞死（発癌に関与）に密接に関与するタンパク質の発現を解析した。タンパク質の発現は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number：6, 12）、30ng/kg群：3頭（動物number：19, 28, 29）、300ng/kg群：3頭（動物number：34, 40, 57）の肝臓組織を破碎し、遠心後、可溶性分画を得た。アルブミンをスタンダードとして、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。10% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて、電気泳動を行い、ニトロセルロース膜に転写後種々のタンパク質およびリン酸化タンパク質の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。

発現レベルの検出はフォトトープキット（Phototope®-HRP Western Blot detection system, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA）を用いた。定量は、Chemidoc XRS system and Quantity One® image analysis software（Bio-Rad Laboratories, Inc., USA）を用いた。

（倫理面への配慮）

サルを麻酔下で、放血安楽死させ、動物愛護の配慮、指針に則って実験を行った。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。ディスプレイマスク、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. サルの剖検状況表、交配・分娩・生存状況表、血統一覧表を別表として示した。

2. 病理学的解析結果

平成16年度のサルの剖検は、F1aを除いて別表のサル剖検状況表のように実施した。昨年度F1の1例に見出された altered foci（癌化）は今年

度剖検したサル解析では見られなかった。そこで、次項の、発癌性と密接な関係のあるタンパク質の発現解析を行い、TCDDの発癌性を検討した。

3. 発癌性に関与するタンパク質の発現解析の結果

TCDD投与後3年以上経過したF0サルの肝臓において、癌化と密接な関連性がある細胞死あるいは細胞増殖と関連のあるタンパク質の発現解析を行った。

EGFR(上皮増殖因子レセプター)は、癌細胞で発現上昇が見られるタンパク質であるが、TCDD投与サル肝臓において、対照群の発現を1として、30 ng/kg投与群で、4.27倍、300 ng/kg投与群で2.15倍と有意に発現上昇が見られた。

アポトーシスの情報伝達系の分子であるBadとcaspase-8もTCDDで発現が誘導されていた。

Badは対照群の発現を1として、30 ng/kg投与群で、1.94倍、300 ng/kg投与群で1.23倍と有意な発現上昇が見られた。

caspase-8は対照群の発現を1として、30 ng/kg投与群で、1.71倍、300 ng/kg投与群で2.67倍と有意な発現上昇が見られた。

リン酸化Aktの発現は30、300

ng/kgで、それぞれ、対照群の1.12倍と1.83倍であった。

D. 考察

昨年見出された肝臓のaltered cell foci(癌化)は、本年度の解析では見られなかった。しかし、発癌に至る時間的経過は、さらに長い可能性もあり、この結果のみで発癌性は見られないと結論することはできないと考えられる。それを裏付ける結果として、発癌に密接な関係のあるタンパク質(Caspase-8、Bad、EGFR)の発現が増加していることが挙げられる。Caspase-8、Badの発現が誘導されたことは、TCDDにより細胞死の情報伝達系が誘導されていることを意味しており、その修復過程で発癌する可能性が考えられる。さらに、EGFRの高発現は、癌化との関連性がいわれており、EGFRの高発現自体が発癌に繋がる可能性が示唆される。

TCDDの投与量との関連で注目すべきは、caspase-8の発現が容量依存性であるのに比して、BadとEGFRの発現は30 ng/kg投与で、より強い誘導が見られたことである。従って、タンパク質レベルでの解析結果からは、30 ng/kg TCDDの影響は無視できないが、

TDI の検討の際には、総合的な判断が必要であると考えられる。

E. 結論

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。そこで、TCDD による発癌性との関連があるタンパク質の発現を解析した。TCDD 投与後 3 年以上経過した F0 サルの肝臓を用いて、癌化と密接な関連性がある細胞死あるいは細胞増殖と関連のあるタンパク質の発現解析を行い、以下の結果を得た。細胞死の情報伝達系の Caspase-8 では、30ng/kg および 300ng/kg TCDD の両方で発現誘導が認められたが、300ng/kg TCDD でより強い発現誘導であった。同じく、細胞死の情報伝達系の Bad は、30ng/kg および 300ng/kg TCDD の両方で発現誘導が認められたが、30ng/kg TCDD でより強い発現誘導であった。細胞増殖に関与する EGFR は、30ng/kg および 300ng/kg TCDD の両方で発現誘導が認められたが、30ng/kg TCDD でより強い発現誘導であった。このように、タンパク質解析の結果からは、TCDD 30ng/kg の影響も大きいと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 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
- (2) 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
- (3) 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, amygdaroid body and liver of rhesus monkey. (submitted to Chemosphere)
- (4) 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.
(submitted to Chemosphere)

2 学会発表

国際学会

24th International Symposium
on Halogenated Organic &
Persistent Organic Pollutants.
The Technical University In
Berlin, Germany September 5 -
11, 2004

(1) M.Ohta, S. Akema, M.Tsuzuki,
T. Korenaga, T.Fukusato, K.
Asaoka, N. Murata, M. Nomizu,
A. Arima, S. Kubota. 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.

(2) T. Korenaga, S. Kubota, M.
Ohta, K. Asaoka, N. Murata,
M.Nomizu, A. Arima, and T.
Fukusato. Liver injury in
rhesus monkeys subcutaneous
ly injected with 2, 3, 7, 8-tetra
chlorodibenzo-*p*-dioxin.

国内学会

Fukusato, T., Korenaga, T., Ohta,
M., Asaoka, K., Sumida, H.,
Yasuda, M., Arima, A., Murata, N.,
Kubota, S., Prenatal and
lactational exposure to 2,3,7,8-
tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin
(TCDD) induces renal injury in
rhesus monkeys. 第7回日本内分泌
攪乱化学物質学会大会 (2004年12
月14日-15日, 名古屋市) 講演要旨
集 p114.

Ohta, M., Akema, S., Tsuzuki, M.,
Korenaga, T., Fukusato, T.,
Asaoka, K., Murata, N., Nomizu,
M., Arima, A., Yasuda, M., Kubota,
S. Long term effects of 2,3,7,8-
tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin
(TCDD) on signal transduction
pathway-related protein
expression in liver and cerebrum
of TCDD-treated rhesus monkeys
during pregnancy. 第7回日本内分泌
攪乱化学物質学会大会 (2004年
12月14日-15日, 名古屋市) 講演要
旨集 p316

Korenaga, T., Kubota, S., Ohta, M.,
Asaoka, K., Toida, S., Murata, N.,
Nomizu, M., Arima, A., Fukusato,
T. Hepatic injury in rhesus

monkeys injected with low doses
of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-
dioxin during gestation and
lactation. 第7回日本内分泌攪乱化
学物質学会大会 (2004年12月14
日-15日, 名古屋市) 講演要旨集 p350

G 知的所有権の取得状況
なし

剖検日リスト (SBL89-05, SBL89-59, SBL89-05-02)

2005年2月2日

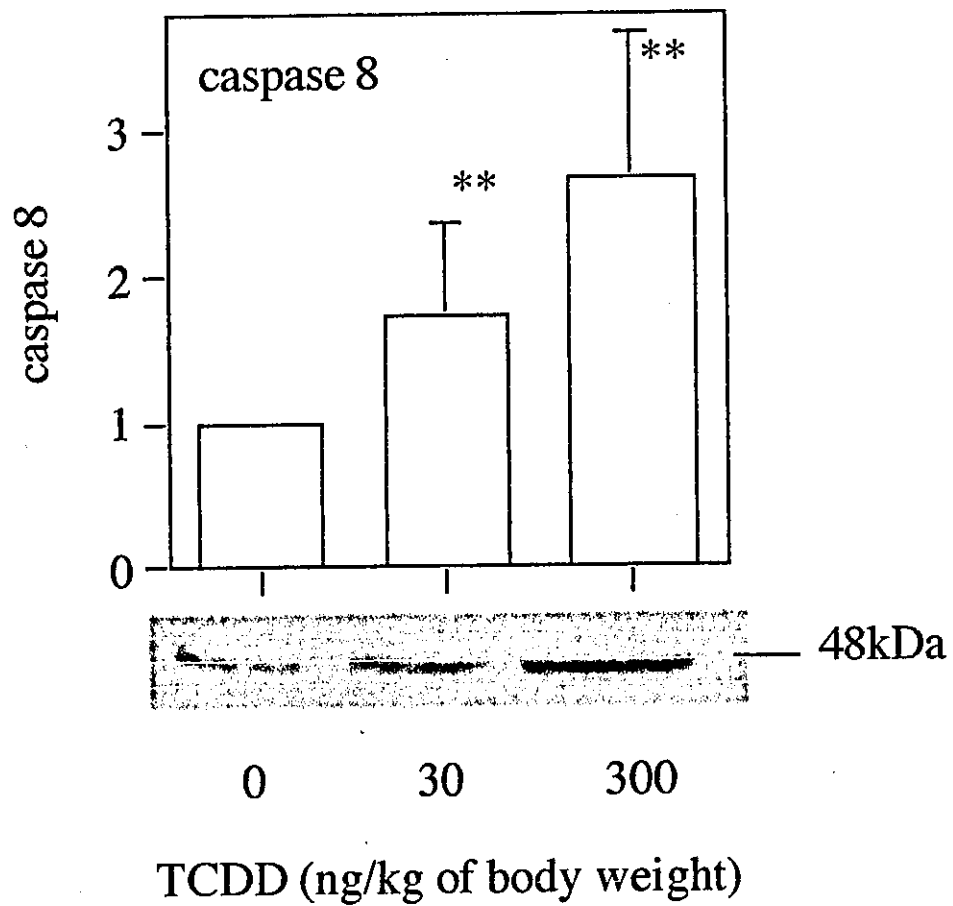
剖検日	動物番号	FO or F1	用量 (ng/kg)	性別	試験番号	備考 (死亡or切迫)
2004.1.2	31b	F1	300	♂	SBL89-05	死亡
2004.1.5	61a	F1	0	♂	SBL89-05	死亡
2004.1.7	24b	F1	30	♂	SBL89-05	死亡
2004.1.10	6	F0	0	♀	SBL89-05	
2004.1.10	19	F0	30	♀	SBL89-05	
2004.1.10	34	F0	300	♀	SBL89-05	
2004.1.10	40	F0	300	♀	SBL89-05	
2004.1.11	32	F0	300	♀	SBL89-05	切迫
2004.1.15	3b	F1	0	♀	SBL89-05	死亡
2004.1.17	65b	F1	30	♂	SBL89-05	死亡
2004.1.23	103	F0	300	♀	SBL89-05	切迫
2004.1.24	23b	F1	30	♀	SBL89-05	切迫
2004.2.2	4	F0	3	♀	SBL89-05-02	死亡
2004.2.3	7	F0	300	♀	SBL89-05-02	切迫
2004.2.22	21b	F1	30	♂	SBL89-05	死亡
2004.2.25	12	F0	0	♀	SBL89-05	
2004.2.25	15	F0	0	♀	SBL89-05	
2004.2.25	28	F0	30	♀	SBL89-05	
2004.2.25	29	F0	30	♀	SBL89-05	
2004.2.25	30	F0	30	♀	SBL89-05	
2004.2.25	57	F0	300	♀	SBL89-05	
2004.3.3	38b	F1	300	♂	SBL89-05	切迫
2004.3.17	27b	F1	30	♂	SBL89-05	死亡
2004.5.31	10	流出胎児	300	♂	SBL89-05-02	流産
2004.8.4	23a	F1	30	♀	SBL89-05	死亡
2004.9.6	9	F0	0	♀	SBL89-05	
2004.9.6	46	F0	0	♀	SBL89-05	
2004.9.6	61	F0	0	♀	SBL89-05	
2004.9.6	63	F0	0	♀	SBL89-05	
2004.9.6	25	F0	30	♀	SBL89-05	
2004.9.6	26	F0	30	♀	SBL89-05	
2004.9.6	27	F0	30	♀	SBL89-05	
2004.9.6	47	F0	30	♀	SBL89-05	
2004.9.6	39	F0	300	♀	SBL89-05	
2004.9.6	42	F0	300	♀	SBL89-05	
2004.9.6	44	F0	300	♀	SBL89-05	
2004.9.6	45	F0	300	♀	SBL89-05	
2004.10.22	2	F0	0	♀	SBL89-05	
2004.10.22	3	F0	0	♀	SBL89-05	
2004.10.22	4	F0	0	♀	SBL89-05	
2004.10.22	21	F0	30	♀	SBL89-05	
2004.10.22	23	F0	30	♀	SBL89-05	
2004.10.22	24	F0	30	♀	SBL89-05	
2004.10.22	31	F0	300	♀	SBL89-05	
2004.10.22	33	F0	300	♀	SBL89-05	
2004.10.22	35	F0	300	♀	SBL89-05	
2004.10.25	101	F0	300	♀	SBL89-05	
2004.10.25	102	F0	300	♀	SBL89-05	
2004.10.25	104	F0	300	♀	SBL89-05	
2004.10.25	105	F0	300	♀	SBL89-05	
2004.10.25	106	F0	300	♀	SBL89-05	
2004.10.25	107	F0	300	♀	SBL89-05	
2004.10.25	108	F0	300	♀	SBL89-05	
2004.10.25	109	F0	300	♀	SBL89-05	
2004.11.1	5	F0	0	♀	SBL89-05	
2004.11.1	7	F0	0	♀	SBL89-05	
2004.11.1	62	F0	0	♀	SBL89-05	

2004.11.1	49'	F0	0	♀	SBL89-05	
2004.11.2	64	F0	0	♀	SBL89-05	
2004.11.2	20	F0	30	♀	SBL89-05	
2004.11.2	50	F0	30	♀	SBL89-05	
2004.11.2	65	F0	30	♀	SBL89-05	
2004.11.2	51	F0	300	♀	SBL89-05	
2004.11.2	68	F0	300	♀	SBL89-05	

2004.11.8	1	F0	0	♀	SBL89-59	
2004.11.8	2	F0	0	♀	SBL89-59	
2004.11.8	3	F0	30	♀	SBL89-59	
2004.11.8	4	F0	30	♀	SBL89-59	
2004.11.8	5	F0	300	♀	SBL89-59	
2004.11.8	6	F0	300	♀	SBL89-59	
2004.11.9	51b	F1	300	♂	SBL89-05	死亡
2004.11.22	2b	F1	0	♀	SBL89-05	
2004.11.22	4b	F1	0	♂	SBL89-05	
2004.11.22	11b	F1	0	♂	SBL89-05	
2004.11.22	20b	F1	30	♀	SBL89-05	
2004.11.22	25b	F1	30	♂	SBL89-05	
2004.11.22	47b	F1	30	♂	SBL89-05	
2004.11.22	42b	F1	300	♂	SBL89-05	
2004.11.22	44b	F1	300	♂	SBL89-05	
2004.11.22	45b	F1	300	♂	SBL89-05	
2004.12.20	61b	F1	0	♀	SBL89-05	
2004.12.20	63b	F1	0	♀	SBL89-05	
2004.12.20	64b	F1	0	♀	SBL89-05	
2004.12.20	16	F0	30	♀	SBL89-05	
2004.12.20	22	F0	30	♀	SBL89-05	
2004.12.20	53	F0	30	♀	SBL89-05	
2004.12.20	37	F0	300	♀	SBL89-05	
2004.12.20	41	F0	300	♀	SBL89-05	
2004.12.20	60	F0	300	♀	SBL89-05	
2004.12.20	66	F0	300	♀	SBL89-05	
2004.12.24	9b	F1	0	♀	SBL89-05	
2004.12.24	46b	F1	0	♀	SBL89-05	
2004.12.24	26b	F1	30	♀	SBL89-05	
2004.12.24	50b	F1	30	♀	SBL89-05	
2004.12.24	33b	F1	300	♀	SBL89-05	
2004.12.24	35b	F1	300	♀	SBL89-05	
2004.12.24	39b	F1	300	♀	SBL89-05	
2004.12.24	68b	F1	300	♂	SBL89-05	
2004.12.24	106	F1	300	♀	SBL89-05	
2004.12.24	109	F1	300	♂	SBL89-05	
2005.1.21	38	F0	300	♀	SBL89-05	
2005.1.21	1	F0	0	♀	SBL89-05-02	
2005.1.21	3	F0	3	♀	SBL89-05-02	
2005.1.21	5	F0	3	♀	SBL89-05-02	
2005.1.21	9	F0	3	♀	SBL89-05-02	
2005.1.21	6	F0	300	♀	SBL89-05-02	
2005.1.21	8	F0	300	♀	SBL89-05-02	
2005.1.21	10	F0	300	♀	SBL89-05-02	
2005.1.21	1	F1	0	♀	SBL89-05-02	
2005.1.21	3	F1	3	♂	SBL89-05-02	
2005.1.21	5	F1	3	♂	SBL89-05-02	
2005.1.21	9	F1	3	♀	SBL89-05-02	
2005.1.21	8	F1	300	♂	SBL89-05-02	

発癌性と関連性のあるタンパク質の発現解析

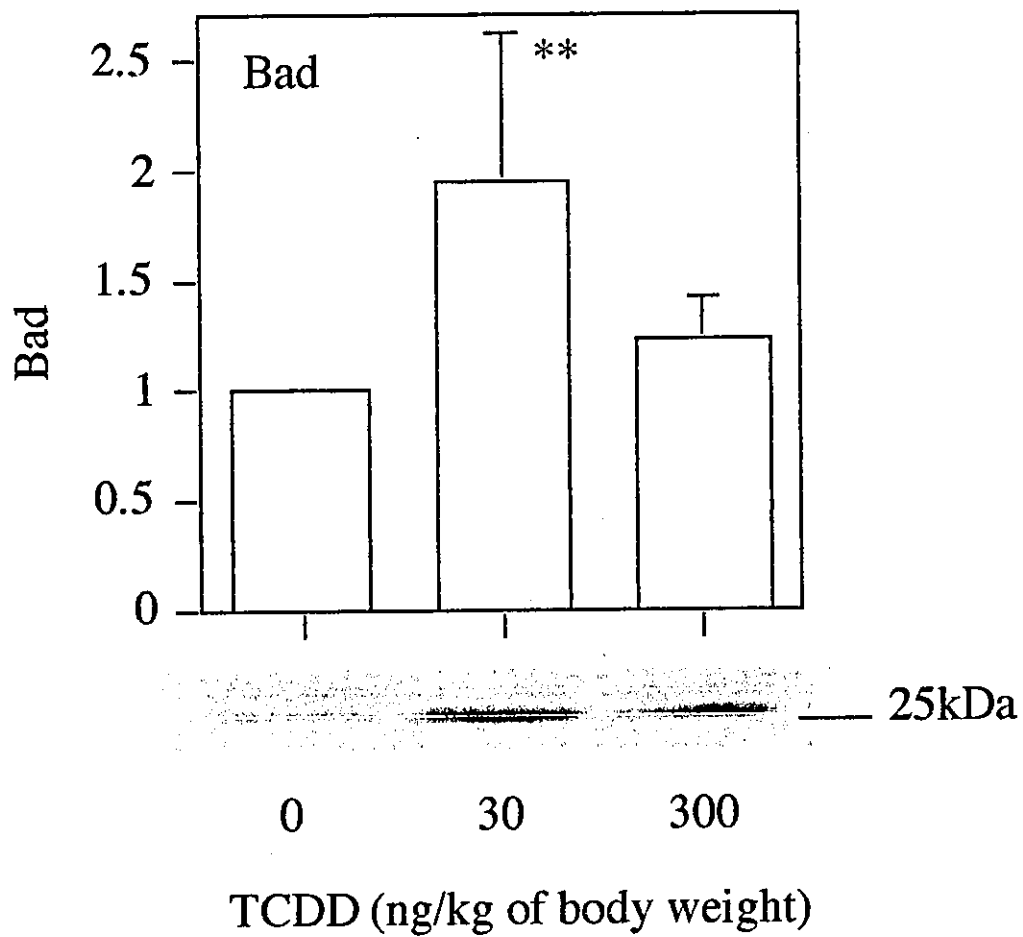
(western blotting)



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

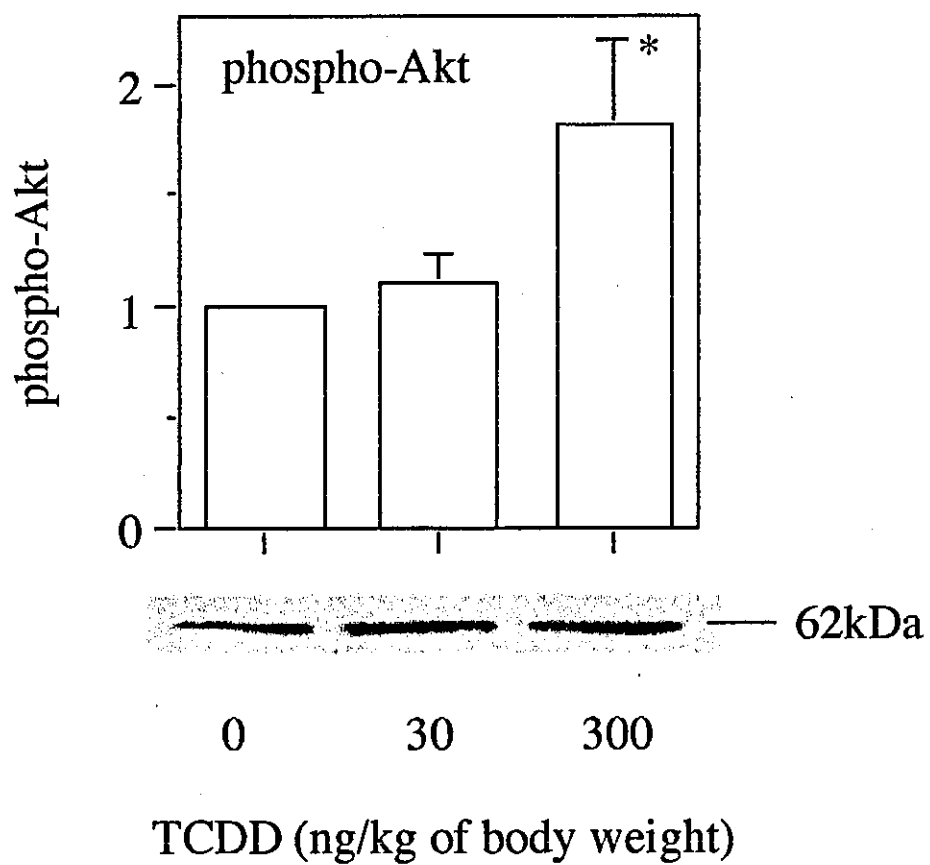
TCDD 単回投与アカゲザル (F0) の肝臓における
タンパク質変動

Caspase 8



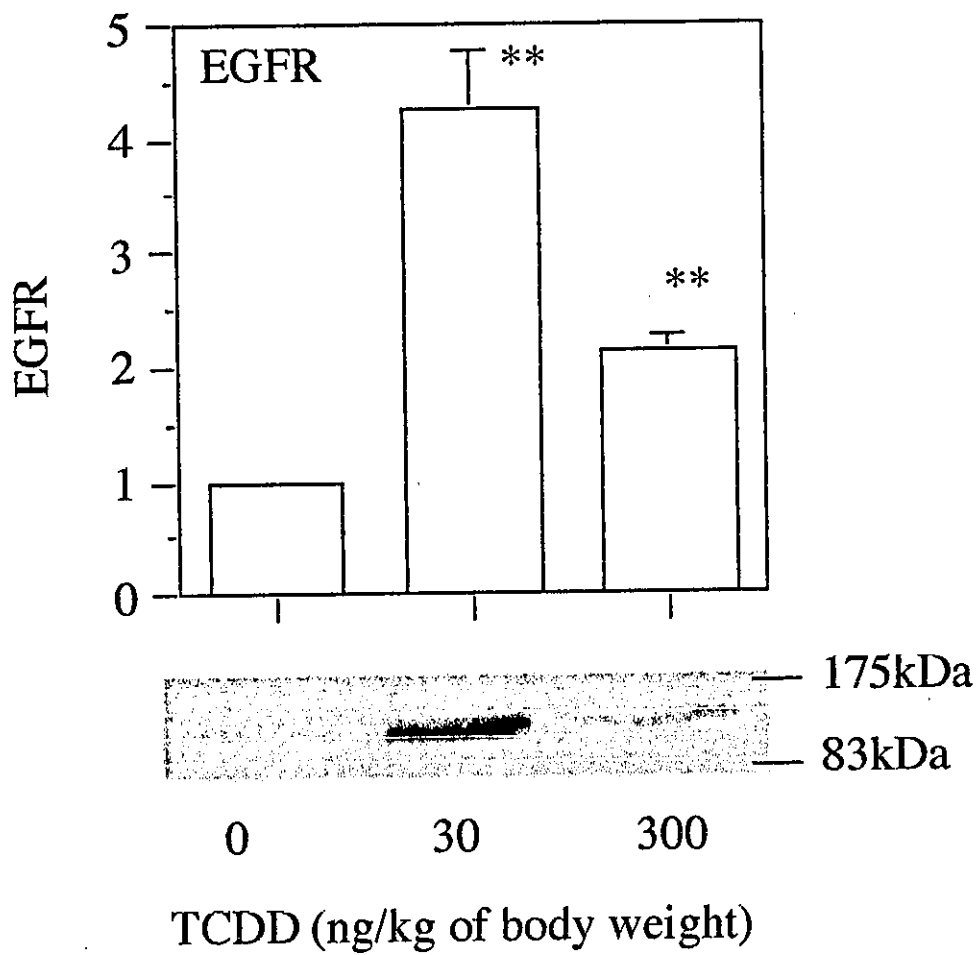
Bar means \pm SD (n=3), ** $p < 0.01$

TCDD 単回投与アカゲザル (F0) の肝臓における
 タンパク質変動
 -Bad -



Bar means \pm SD (n=3), * $p < 0.05$

TCDD 単回投与アカゲザル (F0) の肝臓における
タンパク質変動
-phospho-Akt -



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

TCDD 単回投与アカゲザル (F0) の肝臓における
タンパク質変動
-EGFR -

平成 16 年度厚生労働科学研究費

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 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

ダイオキシン類の胎生期暴露はげっ歯類で口蓋裂を誘発すること、口蓋裂を免れた児にも口蓋ヒダの異常が誘発されることが知られている。本研究では胎生期および授乳期に 2,3,7,8-四塩化ジベンゾパラジオキシン(TCDD)に暴露されたアカゲザル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。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(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。生存児の口蓋ヒダを口腔内デジタルカメラで撮影し、観察した。アカゲザルの口蓋ヒダは 8 ないし 9 対認められる。前方より尾方に向かってこれらのヒダに 1 ないし 9 と番号を付け、形態変異を記載した。アカゲザル生存児では、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。

A. 研究目的

げっ歯類では口蓋ヒダの形態変異は化学物質の発生毒性指標として有用であることが知られている。アカゲザルでも明瞭な口蓋ヒダが認められるので、TCDD 暴露を受けた児のヒダ形態変異を観察することにより、本実験系における TCDD の最低毒性量 (LOAEL) の評価に役立つ情報を得ることが本研究の目的である。

B. 研究方法

1. TCDD の投与とアカゲザル飼育

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。妊娠動物は自然分娩させ、児を哺育させた。TCDD の調整、試験動物についての詳細は主任研究者の報告にあるので省略する。口蓋ヒダ観察の対象となったのは、生存児対照群 13 例、30ng/kg 群 12 例、300 ng/kg 群 10 例である。

2. 口蓋ヒダの観察

生後 3~4 年の児に塩酸ケタミン 10 mg/kg を大腿部筋肉内に投与して軽く麻酔した後、口蓋を口腔内デジタルカメ

ラ (クリスタル・カム II, GC) で撮影した。口蓋全体を焦点深度に含めて撮影するのは困難であるので、各児につき数枚の写真を撮影し、その所見を記録用紙に記入した。記録用紙はアカゲザル口蓋ヒダの正常像を模式化し (図 1)、これを薄いグレーで印刷したものを用いた。観察された形態変異をこの用紙に黒鉛筆で描いた。

(倫理面への配慮)

実験動物は愛護的に扱い、また実験関係者が TCDD の悪影響を受けないように配慮した。

C. 研究結果

アカゲザルの口蓋ヒダは普通 9 対あり、いずれも前方すなわち吻側に凸な弓状を描く (図 1, 3)。これらに前方より 1 ないし 9 と番号をつけた。多くの例で吻側の 2 ないし 3 対のヒダは正中部で左右のものが接していた。

観察されたヒダの形態変異を模式的に図 2 に示し、実際の変異の例を図 4, 5, 6 に示す。途中でヒダが中断しているものは分断、正常の長さの 3 分の 2 以下なのは短小、ヒダの間に小さなヒダがみられるものを過剰、ヒダがうねっているもの