

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 14～16 年度総合研究報告書

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 総合研究報告書

平成 14 年度～16 年度総合研究報告書

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

平成 14 年度～16 年度総合 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

平成 14 年度～16 年度総合 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

分担研究者 久保田俊一郎

分担研究者 野水基義

共同研究者 浅岡一雄

共同研究者 福里利夫

共同研究者 村田宣夫

研究協力者 太田万理

平成 14 年度～16 年度総合 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

平成 14 年度～16 年度総合 分担研究報告書

ダイオキシン曝露によりアカゲザルの臓器に発現障害性がみられた遺伝子群の DNA マイクロアレイ製作およびヒトの発癌における共通性の検討

分担研究者 浅岡一雄

共同研究者 福里利夫

共同研究者 村田宣夫

共同研究者 久保田俊一郎

平成 14 年度～16 年度総合 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

平成 14 年度～16 年度総合 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

平成 14 年度～16 年度総合 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

平成 14 年度～16 年度総合 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

平成 14 年度～16 年度総合 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

(平成 14 年度～16 年度)

III 研究成果の刊行物・別刷

(平成 14 年度～16 年度)

厚生労働科学研究費
平成14年度—16年度総合研究報告書

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た。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、生殖能、免疫能、発癌性を長期にわたって解析してきた。まず、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母動物、胎児および出生児への組織移行性を解析した。その結果、母動物の組織に血中より高濃度で移行すること、胎盤經由で胎児へ、乳汁を介して新生児へ移行し、肝臓、脂肪組織、生殖器に高濃度で分布することを明かにした。雌雄出生児(F1)の新生児の外部形態についてはいずれの群においても異常はなく、雌雄新生児の肛門-外生殖器間距離についても有意差は見られなかった。次に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。コントロール、TCDD 30ng/kg投与群、TCDD 300ng/kg投与群を比較した場合、流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(F1aは下述のように生殖能を解析する)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。TCDDの長期間(3年以上)投与によるF0への影響を解析した結果、TCDD 30ng/kg, 300ng/kg群の両方において、肝臓、胆管に増殖性病変および肝臓に循環障害が見られたが、30ng/kg TCDD群の障害の程度が小さかった。発癌性に関しては、F1の1例のみ肝臓にaltered fociが見出された。1例のみのため、発癌性を考察できないが、これに関連した実験としてTCDDの受容体であるAhRの発現をヒト肝臓癌組織を用いて免疫染色で解析したところ、非癌部と癌部での染色性に相違が見られた(後者で染色性が強い)。この結果はTCDDと肝

臓組織での発癌性との関連性を示唆すると考えられる。サル遺伝子の網羅的クローニングを行い、ヒト遺伝子とのホモロジーが96%であることを明らかにした。この結果は、TCDDのヒトへの影響を、げっ歯類ではなく、サルを用いて行った本研究の妥当性を支持した。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、精巣下降に対してTCDDの影響はほとんどないと考えられた。精巣サイズおよび陰莖長を計測し生殖能（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、雌雄のF1aの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、胎盤経由および授乳経由で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11例）およびF1bの屠殺例（コントロール11例、30ng/kg投与群10例、300ng/kg投与群11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。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 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 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。これらの遺伝子発現変化が新規の腎臓病変にどのように関与しているかは、腎臓の発生、分化の機構の解明やその機構に対する TCDD の影響を含めて解析し、明らかにする必要がある。今後の大きな課題である。

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。メスでは、不規則な月経が見られているが、最適の時期に解析するため、飼育を継続することとした。生殖能に関して、現時点で評価できる項目は、精巣下降であり、精巣下降への影響はほとんどないと考えられた。本研究の大きな成果は、TCDD により引き起こされ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のみならず、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
野水基義	北海道大学助教授
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: 4-6 kg) 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. TCDD の体内動態

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母動物、胎児および出生児への組織移行性を解析した。妊娠(140日目)および分娩後(30日目)のアカゲザルに 2,3,7,8-TCDD(0, 30, 300 ng/kg)の皮下投与を行い、投与後7日目の母動物、胎児、新生児の組織内濃度を測定し、胎児移行と乳汁を介する新生児への移行を解析した。

4. 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。

5. 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)、300 ng/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.

6. 遺伝子解析

遺伝子クローニング法

肝臓由来の mRNA を用いた。RT-PCR により生成した PCR 産物を電気泳動により分離後、TA ベクターに組み込んだ。コンピテント大腸菌に形質転換し、クローニングした。プラスミドを精製し、PCR を行ない、キャピラリーDNA 配列解析装置を用いて塩基配列を決定した。全長の遺伝子を約 100 個クローニングし、ヒト遺伝子と比較解析を行った。その目的は、ヒトとアカゲザルの遺伝子のホモロジーの率を算出し、ダイオキシンのヒトへ影響をサルで実験する根拠を示し、優位性を明らかにすることである。

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 を選択して搭載している。

7. 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。。

8. ダイオキシンの測定

血液中の TCDD 濃度を島津テクノロジー株式会社 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。

9. 血清中 CA125 測定による子宮内膜症の有無の検討

TCDD と子宮内膜症の関連性が考えられている。また、ヒトで、血清 CA125 値が子宮内膜症の指標となることがいわれている。そこで、TCDD によりサルに子宮内膜症が引き起こされている可能性を検討するために、血清中の CA125 値をイミュノアッセイ法（人用のキット）で、下記のサルで測定した。

コントロール

2, 3, 4, 5, 7, 9, 46, 49, 61, 62, 63, 64

30ng/kg 群

16, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 47,

50, 53, 65

300ng/kg 群

31, 33, 35, 37, 38, 39, 41, 42, 44, 45, 5

1, 60, 66, 68

300ng/kg 追加群

101, 102, 104, 105, 106, 107, 108, 109

（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

本研究でのサルの剖検状況、交配、分娩、生存状況、血統一覧を別表に示す。

1. TCDD の体内動態

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母動物、胎児および出生児への組織移行性を解析した。妊娠（140日目）および分娩後（30日目）のアカゲザルに 2,3,7,8-TCDD(0, 30, 300 ng/kg)の皮下投与を行い、投与後7日目の母動物、胎児、新生児の組織内濃度を測定し、胎児移行と乳汁を介する新生児への移行を解析した。その結果、母動物の組織に血中より高濃度で移行すること、胎盤経由で胎児へ、乳汁を介して新生児へ移行し、肝臓、脂肪組織、生殖器に高濃度で分布することが明かとなった。

^3H -TCDD の 30 ng/kg を妊娠動物に単回皮下投与した場合、母動物における臓器・組織内濃度（臓器・組織／母体血漿中濃度比）は乳腺、胎盤、脂肪、肝臓、臍帯血及び母体血液の順に高く、胎児臓器・組織では肝臓、血液、脂肪、精巣及び血漿の順に高かった。300 ng/kg 群における母動物臓器・組織では胎盤、脂肪、肝臓、乳腺、母体血液、臍帯血及び臍帯血漿順であり、胎児臓器・組織では肝臓、脂肪、卵巣、血液及び血漿の順であった。

(1) 胎児移行性データ(妊娠140日目)

(2,3,7,8-TCDD 換算値)

30ng/kg 投与

母動物

乳腺 26.655pg/g 胎盤 18.447pg/g
脂肪 16.699pg/g 肝臓 8.504pg/kg
血液 1.413pg/ml 臍帯 2.084pg/ml

胎児

肝臓 14.320pg/g 血液 3.227pg/g
脂肪 2.619pg/g 卵巣 検出限界
以下 精巣 1.453pg/g

300ng/kg 投与

母動物

乳腺 50.022 pg/g 胎盤 199.022
pg/g 脂肪 16.699pg/g 肝臓
121.094 pg/kg 血液 5.705 pg/ml
臍帯血 5.033 pg/ml

胎児(雌)

肝臓 351.403 pg/g 血液 5.464
pg/g 脂肪 146.539 pg/g 卵巣
60.642 pg/g 血漿 1.843 pg/ml

(2) 乳汁移行性(分娩後30日)

30ng/kg 投与

乳汁中 8.846 pg/ml

血漿中 0.545pg/ml

母動物臓器

脂肪 77.669 pg/g 肝臓 45.313
pg/g 乳腺 21.891 pg/g 血液
4.878 pg/ml 血漿 0.545 pg/ml

新生児臓器

脂肪 55.120 pg/g 肝臓 24.004
pg/g 卵巣 10.849 pg/g 血液
3.073 pg/ml 血漿 0.181 pg/ml

精巣 7.733 pg/g

300ng/kg 投与

乳汁中 73.258 pg/ml 血漿中
4.679 pg/ml

母動物臓器

脂肪 383.081 pg/g 肝臓 204.948
pg/g 乳腺 100.266 pg/g 血液
9.075 pg/ml 血漿 4.679 pg/ml

新生児臓器

脂肪 271.608 pg/g 肝臓 134.981
pg/g 卵巣 116.784 pg/g 血液
13.255 pg/ml 血漿 3.842 pg/ml
精巣 39.008 pg/g

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-0.1pg/g湿重量の範囲)にあった。別表に示す。

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。本研究で使用了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は悪くないが、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局限していた。一部血性の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)

本研究で見い出された新規の腎臓病変と厚生労働科学研究の安田班の研究成果である TCDD による歯の発生異常との関連性を解析したところ、表に示すように、密接な関連性があることが判明した。

3. 腎弓状動脈・葉間動脈への影響
生育途中に死亡した児サルを解剖し、TCDD 低投与量群と高投与量群のうち腎臓の組織切片標本から腎弓状動脈あるいは葉間動脈の内腔面積と内弾性板内面積を比較し、内膜の肥厚程度を評価した。その結果、TCDD 高投与量群の腎弓状動脈あるいは葉間動脈の内膜は肥厚していることが示唆された。内膜肥厚の程度には個体間のばらつきが大きいことも判明し、高度に内膜が肥厚している例もあったが、ほとんど内膜肥厚を示さない例も認められた。低投与量群の内膜面積は、対照群のそれと比較して有意差は認められなかった。また、高投与量群においても、腎弓状静脈あるいは葉間静脈に

は内膜肥厚は認められなかった。

TCDD 高投与量群に認められた腎弓状動脈あるいは葉間動脈の内膜肥厚は TCDD の影響と考えられたが、その機構については今後の検討が必要である。(詳細は隅田分担報告書参照)

4. ウェスタンブロット法による TCDD 投与後長期(3年一)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関与する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関与する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)

5. 遺伝子解析

網羅的サル遺伝子クローニングによりサルとヒト遺伝子とのホモロジーが96%であることを明らかにした。この結果は、TCDDのヒトへの影響を、げっ歯類ではなく、サル

を用いて行った本研究の妥当性を支持した。さらに、TCDDにより変動する遺伝子を解析し、8つのパターンに分類することができた(詳細は浅岡分担報告書を参照)。

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)の腎臓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)の腎臓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)

6. 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)

7. 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)

8. 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
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。(詳細は浅岡分担研究報告書参照)

9. 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。(写真を参照)

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。

10. 子宮内膜症への影響

CA125 測定結果

血清 CA125 の測定値を表に示す。

平均値は、control 群: 17.3±12.3 U/ml, 30ng/kg 群: 12.3±2.8 U/ml, 300ng/kg 群: 15.5±9.5 U/ml, 300ng/kg 追加群: 11.5±1.6 U/ml TCDD 投与により有意な増加は見られず、子宮内膜症への関与は示唆されなかった。

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 の生後 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。

肝臓の altered cell foci は、1 例のみ見られたが、発癌にいたる過程はさらに時間のかかる可能性もあり、この結果のみで発癌性はないとは結論できない。発癌性に関して、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ト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から、TCDD による肝臓病変、特に F0 の癌化との関連性で重要である。また、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、細胞死のみならず、発癌性との関連でも重要である。

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ト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回は中枢神経系に關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ト法による解析結果を考察する。情動に關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。

ヒトの子宮内膜症の 20-30% に血清 CA125 の上昇が見られる。また、ダイオキシン汚染とヒトの子宮内膜症の関連性がいわれている。そこで、血清 CA125 値をサルで測定したが、TCDD 投与群での有意な上昇は見られ