

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 µg-100 µg 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

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、30ng/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 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る。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う。コントロール群と 30ng/kg 群の腎に著変なし。

④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る。

⑤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明らかとなった。

⑥蛋白解析:腎病変部の1型コラーゲンの増加が免疫染色で明らかとなり、ウェスタンブロッティング法で、病変腎におけるAhR蛋白の減少傾向が認められた。

4. 追加実験における仔アカゲザル(第1仔)(F1a)の腎病変

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:1頭(屠殺)

30 ng/kg 群:3頭(屠殺)

300 ng/kg 群:1頭(屠殺)、2頭(流産)

300ng/kgの屠殺例1頭に腎の形成異常が認められた。

5. 腎病変のまとめ

①病変分布が様々:腎被膜直下の少数の糸球体と尿細管からなる小病変から、腎全体に及び腎萎縮・変形を伴う病変までみられる。乳頭萎縮の存在。限局型の存在。しかし、分布には一定の規則性の可能性がある。

②病変の強さが様々:糸球体では未熟なものから硝子化まで、尿細管では萎縮から広範な脱落まで、尿細管の一部の病変から広範な病変まで。

③病変の多彩性(heterogeneity):分布や強さが様々な組合せで出現。

④腎病変の性差は明らかでなかった。

⑤これらの腎病変は形成異常あるいは分化の異常 abnormal renal differentiation として理解可能であった。

6. 網羅的遺伝子解析結果

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。

7. F0サル(計10頭)を行い、TCDDの長期間(3年一)投与による影響を解析する実験を実施した。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。

コントロール群 3頭

サル番号 6, 12, 15

30ng/kgTCDD 投与群 4頭

サル番号 19, 28, 29, 30

300ng/kgTCDD 投与群 3頭

サル番号 34, 40, 57

F0 剖検サルの肝臓の病理組織学的解析

コントロールには変化を認めなかったが、30ng/kg, 300ng/kg 投与サル肝臓に以下の変化を認めた。

(1) 30ng/kg 投与サルでは、小葉内肝臓の核密度の増加

(2) 30ng/kg 投与サルでは、胆管上皮に増殖性病変(MIB1の染色で陽性)

3. 300ng/kg 投与サルでは、小葉内肝臓の不規則な核密度の増加(MIB1の染色で陽性)

F0 サル肝臓電子顕微鏡による解析の所見

300ng/kg 投与群(サル番号 57):

(1) 類洞内皮細胞に変性所見が目立つ。

(2) 類洞内皮細胞(あるいはKupfer細胞)の腫大、細胞膜の不明瞭化、細胞質の不規則な形の拡大・破壊、細胞小器官の破壊が認められる。核は比較的よく保たれている。ライソゾームの増加が認められる。

- (3) 血管内腔が狭くなっている。
- (4) 星細胞（伊東細胞）は軽度腫大が疑われる。
- (5) 肝細胞では、glycogen の分布と SER（滑面小胞体）の分布・配列に異常が認められる。
- (6) 以上の類洞内所見や肝細胞の所見が、肝小葉内あるいは小葉間でも偏在して認められる（部位差がみられる）。

30ng/kg 投与群：
程度はやや軽いが、300ng/kg 投与群と同様に認められる。

コントロール群：（サル番号 15）
正常肝の所見が認められる。

8. F1 38b の剖検および解析
ビリルビン値が上昇していた F1 38b を観察したところ、明瞭な黄疸を認めため、肝炎ウイルスの検査を行い、陰性と判明した。そこで、TCDD による肝障害の可能性を考えて、F138b の剖検を行い、解析したところ、肝炎よりも、toxic な変化と考えられ、TCDD による影響が第 1 に考えられた。

D. 考察

F1a および F1b、さらに追加実験群において、対照群と比べ TCDD 300 ng/kg 投与群で仔アカゲザルの腎病変が多発した。30ng/kg 群ではわずか 1 頭の腎に軽微な腎病変が認められたのみであったことから、この腎病変は 300ng/kg 群で高頻度・高度に起こっていることは明らかである。その腎病変の病理組織所見は TCDD による腎障害としての報告は乏しいものの、これまでヒトや動物、実験動物で報告されている腎の発生異常・形成異常に類似し

ている。しかし、その病理像は広範で多様性に富んでおり、TCDD の影響が腎組織の長い形成期間・分化期間の中で長期間にわたって及んでいたことを示唆している。この腎病変は、生後 3 年余になっても腎組織内に観察され、修復が困難な可能性を示唆していた。また、高度な場合、腎不全をきたしており、死因となる可能性も示していた。しかも、300 ng/kg 投与群の仔アカゲザルで比較的特異的に認められ、用量依存性が明らかであったことは TDI の設定の議論に貴重なデータを提供するものと判断された。

形態計測の結果は通常組織学的観察の結果を裏付けるように糸球体形成の異常を示していた。

網羅的遺伝子解析で多数の遺伝子の発現変動が明らかにされた。網羅的遺伝子解析で使用された DNA チップは約 16,600 種のヒト遺伝子を搭載したものであるが、これまでの研究結果ではアカゲザルとヒトの遺伝子の間に約 96% のホモロジーがあることから、ヒト遺伝子を用いた DNA チップによる解析も意味あるもの解釈され、遺伝子数は少ないがアカゲザルの遺伝子を搭載したマイクロアレイの結果と比較・照合検討を開始・継続している。

E. 結論

本研究においては、より妥当な TDI 値の設定に役立てるためダイオキシン類、特に TCDD のアカゲザルにおける臓器障害性の解析を行った。ヒトに最も近縁の霊長類の 1 種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 を単回投与した本実験では、対照群と比較して TCDD 300 ng/kg 投与群の仔アカゲザ

ルにおいて腎病変が多発した (F1a). 病変の発生に用量依存性が認められた。腎病変は F1a と F1b および追加実験群でも同様に認められ、再現性が明らかであった。以上の結果は、TDI の設定の議論に貴重なデータを提供するものと判断された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mari Ohta, Satoshi Akema, Masami Tsuzuki, Tatsumi Korenaga, Toshio Fukusato, Kazuo Asaoka, Nobuo Murata, Motoyoshi Nomizu, Akihiro Arima, Shunichiro Kubota (2004) Effects of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on signal transduction pathway-related protein expression in liver and cerebrum of rhesus monkey. *Organohalogen Compounds* 66, 3299-3304.
- 2) Korenaga Tatsumi, Shunichiro Kubota, Mari Ohta, Kazuo Asaoka, Nobuo Murata, Motoyoshi Nomizu, Akihiro Arima, Toshio Fukusato (2004) Liver injury in Rhesus monkeys subcutaneously injected with. 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Organohalogen Compounds* 66, 3315-3320
- 3) Mari Ohta, Satoshi Akema, Masami Tsuzuki, Tatsumi Korenaga, Toshio Fukusato, Kazuo Asaoka, Nobuo Murata, Akihiro Arima, Shunichiro Kubota (2005) Long-term

Effects of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on Signal Transduction Pathway-related Protein Expression in Precentral gyrus, Amygdaloid Body and Liver of Rhesus Monkey. *Chemosphere* submitted.

- 4) Tatsumi Korenaga, Toshio Fukusato, Mari Ohta, Kazuo Asaoka, Nobuo Murata, Akihiro Arima, Shunichiro Kubota (2005) Long-term Effects of Subcutaneously Injected 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on the Liver of Rhesus Monkeys. *Chemosphere* submitted.

2. 学会発表

[国際学会]

- 24th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, Berlin, September 6-10, 2004, Mari Ohta, Satoshi Akema, Masami Tsuzuki, Tatsumi Korenaga, Toshio Fukusato, Kazuo Asaoka, Nobuo Murata, Motoyoshi Nomizu, Akihiro Arima, Shunichiro Kubota (2004) Effects of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on signal transduction pathway-related protein expression in liver and cerebrum of rhesus monkey.
- 24th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, Berlin, September 6-10, 2004, Korenaga Tatsumi, Shunichiro Kubota, Mari Ohta, Kazuo Asaoka,

Nobuo Murata , Motoyoshi Nomizu, Akihiro Arima, Toshio Fukusato, (2004) Liver injury in Rhesus monkeys subcutaneously injected with of 2, 3, 7, 8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin.

- 25th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, Toronto, August 21-26, 2005, Toshio Fukusato, Tatsumi Korenaga, Mari Ohta, Kazuo Asaoka, Hiroshi Sumida, Mineo Yasuda, Akihiro Arima, Nobuo Murata, Shunichiro Kubota (2005) In utero and lactational exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces abnormal renal development in rhesus monkeys. (in preparation) [国内学会]
- Toshio Fukusato, Tatsumi Korenaga, Mari Ohta, Kazuo Asaoka, Hiroshi Sumida, Mineo Yasuda, Akihiro Arima, Nobuo Murata, Shunichiro Kubota (2004) Prenatal and lactational exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces renal injury in rhesus monkeys. 日本環境ホルモン学会第7回研究発表会(2004年12月14-15日,名古屋)
- 太田万理, 明間聡史, 都築正実, 是永龍巳, 福里利夫, 浅岡一雄, 村田宣夫, 野水基義, 有馬明宏, 安田峯生, 久保田俊一郎 (2004) 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. 妊娠期に TCDD 曝露を受けたアカゲザルの長期経過後のシグナル伝達系タンパク質の変動, 日本環境ホルモン学会第7回研究発表会 (2004年12月14-15日, 名古屋)

- 是永龍巳, 久保田俊一郎, 太田万理, 浅岡一雄, 樋田壽々子, 村田宣夫, 野水基義, 有馬昭宏, 福里利夫 (2004) Hepatic injury in rhesus monkeys injected with low doses of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin during gestation and lactation. 妊娠および授乳期ダイオキシン暴露による雌親アカゲザルの肝障害, 日本環境ホルモン学会第7回研究発表会 (2004年12月14-15日, 名古屋)
 - 是永龍巳, 久保田俊一郎, 太田万理, 有馬昭宏, 樋田壽々子, 福里利夫 (2005) 妊娠および授乳期ダイオキシン暴露により仔アカゲザルの新規腎障害, 第94回日本病理学会総会 (2005年4月14-16日, 横浜)
 - 是永龍巳, 久保田俊一郎, 太田万理, 有馬昭宏, 樋田壽々子, 福里利夫 (2005) 妊娠および授乳期ダイオキシン暴露により牝親アカゲザルの肝障害, 第94回日本病理学会総会 (2005年4月14-16日, 横浜)
- G. 知的所有権の取得状況
なし

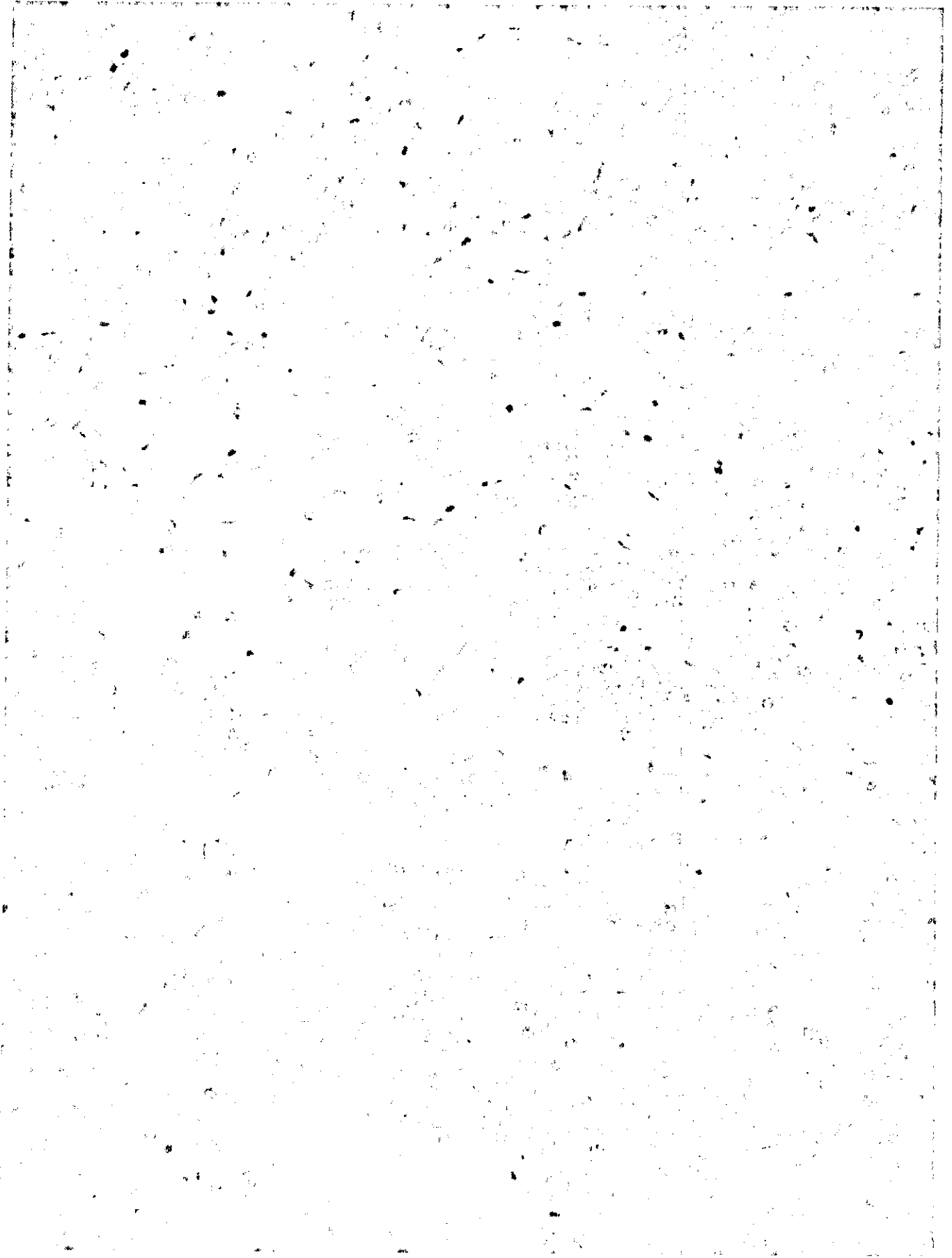
TCDD 長期（3年以上）投与 F0 の病理組織学的解析

Histopathological findings in the liver of F0

	Control	Group A	Group B
Focal fatty change	0/3	2/4	2/3
Fatty change	0/3	1/4	1/3
Peliotic change	0/3	3/4	2/3
Hemorrhage	0/3	1/4	1/3
Infarction	0/3	1/4	1/3
Microthrombi	0/3	2/4	2/3
Small cell hypercellularity	0/3	2/4	3/3
α SMA positive cell hyperplasia	0/3	3/4	3/3



Liver (No.40)



Focal fatty change (No.29)

Peliotic change (No.30)

Infraction (No.30)

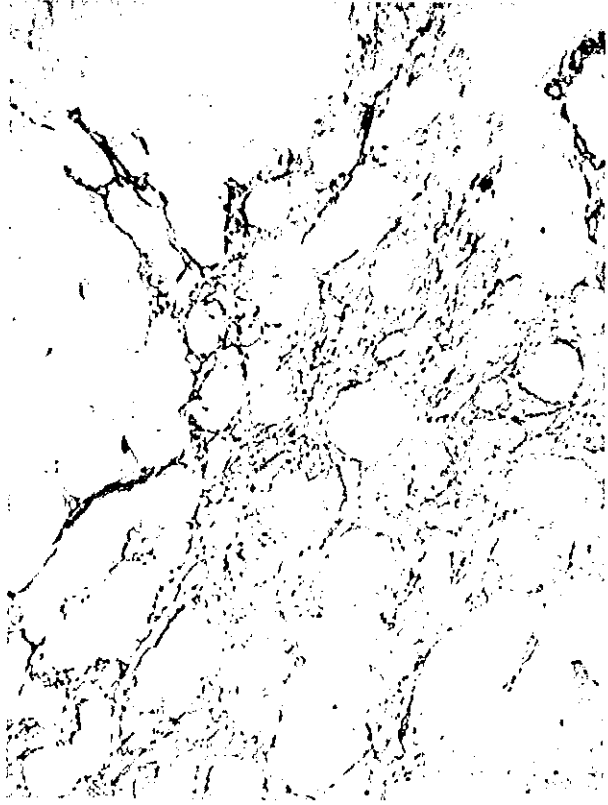
TCDD 投与黄疸例 F1 38b の解析
(300ng/kg)

病理組織学のおよび電子顕微鏡的
解析

肝炎よりも toxic な変化で、TCDD
による影響が最も考えられる

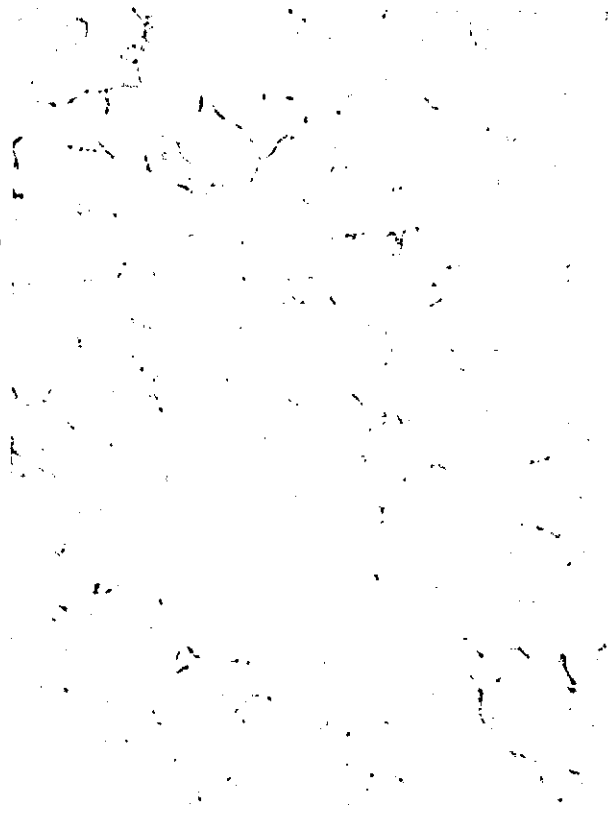
α SMA

非投与



300ng投与の仔黄疽発症例

30ng投与群正常肝



300ng投与群正常肝



Fibrosis and lymphocytic infiltrate (No. 38b)

ダイオキシン投与後のアカゲザルにおける肝組織の電顕的検討

F 0 No.

1 2 ; 対照群

1 5 ; //

2 9 ; 低量投与群 (30 ng/kg)

5 7 ; 高量投与群 (300 ng/kg)

F 1 No. 38 b ; 高量投与群 (300 ng/kg)

(電顕所見)

1) 高量 (No. 57)

- a. 肝細胞の変性巣が巣状に見られる。
- b. 肝細胞の変性のない部分では、対照に比して変化に乏しく、軽度の類洞内皮のリソゾーム増加 (3、E、矢印) や軽度の毛細胆管の拡大 (写真4、B) が見られる。
- c. 変性がある部分では、肝細胞は明るくみえ (写真5、H)、滑面小胞体 (s) は小型化・集積状で、斑状～線状に集積する (写真6、s)。グリコーゲン野はグリコーゲン顆粒 (6、7、矢印) のみで、滑面小胞体は目立たない。(滑面小胞体は通常はグリコーゲン野に同時に見られる。cont, 2、s参照)。粗面小胞体は不規則で、目立たない (6、7、r)。ミトコンドリアの腫大 (edema) (6、7、M) を見る。毛細胆管 (7、B) は絨毛の減少、萎縮があり、軽度に拡大する。
- d. 変性がある部分では、c. と同時に、類洞内皮の変性が目立ち (5、8、9、E)、リソゾームの増加 (8、9、矢印) や胞体の崩壊がある。伊東細胞は比較的变化に乏しい (5、8、I)。クッパー細胞は目立たない。一部の類洞 (5、C) 内に、好中球 (5、矢印) を見る。
- e. グリソン領域の胆管は著変がない。

2) 低量 (No. 29)

- a. 高量と同様の変性巣があり、同部は、高量と類似の所見があるが、毛細胆管の変化はより乏しい。(変性巣の拡がり(量)については電顕像からは、組織が少量のため、高量との量的比較は困難)。

3) F1 No. 38b; (♂、仔)

- a. グリソン鞘 (10, G) 及び肝細胞間に線維の増加が見られる。グリソン鞘の炎症性細胞浸潤は軽度で、著明に貪食したマクロファージの集団～散在 (10、矢印) が見られる。
- b. 小葉周辺帯の肝細胞により多く変性が散在する (10、H)。全体に肝細胞のリソゾームが目立つ (10、12、矢印)。
- c. 類洞は内皮の変性 (リソゾーム) (11、矢印) が目立ち、内皮が消失又は内腔が閉塞している部も見られる。クッパー細胞は変性があり、増加していない。伊東細胞の脂肪滴は著減し、線維芽細胞型に変化し (11、I)、周囲にわずかな膠原線維を見る (12、I、2重矢印)、毛細胆管の軽度の拡大 (12、B) が見られる。

写真説明

写真 1、2 ; Cont (No.15) 。 1 ; x5,000、 2 ; x22,900 。

写真 3～9 ; 高量 (No. 57) 。

変化の乏しい部分 ; 3 ; x4,500、 4 ; x33,200 。

変性のある部分 ; 5 ; x3,000、 6 ; x26,800 、 7 ; x24,300 、 8 ; x3,700

9 ; x4,300。

写真内の記号 H ; 肝細胞、 類洞 ; C、 E ; 内皮細胞、 I ; 伊東細胞
K ; クッパー細胞、 赤血球 ; R、 ミトコンドリア ; M
滑面小胞体 ; s、 粗面小胞体 ; r、 毛細胆管 ; B

写真説明

写真10～12；38b（♂、仔）。10；x2,300、11；x2,300、12；x9,200。

写真内の記号　グリソン鞘；G、　H；肝細胞、　類洞；C、　E；内皮細胞、
I；伊東細胞、　毛細胆管；B

