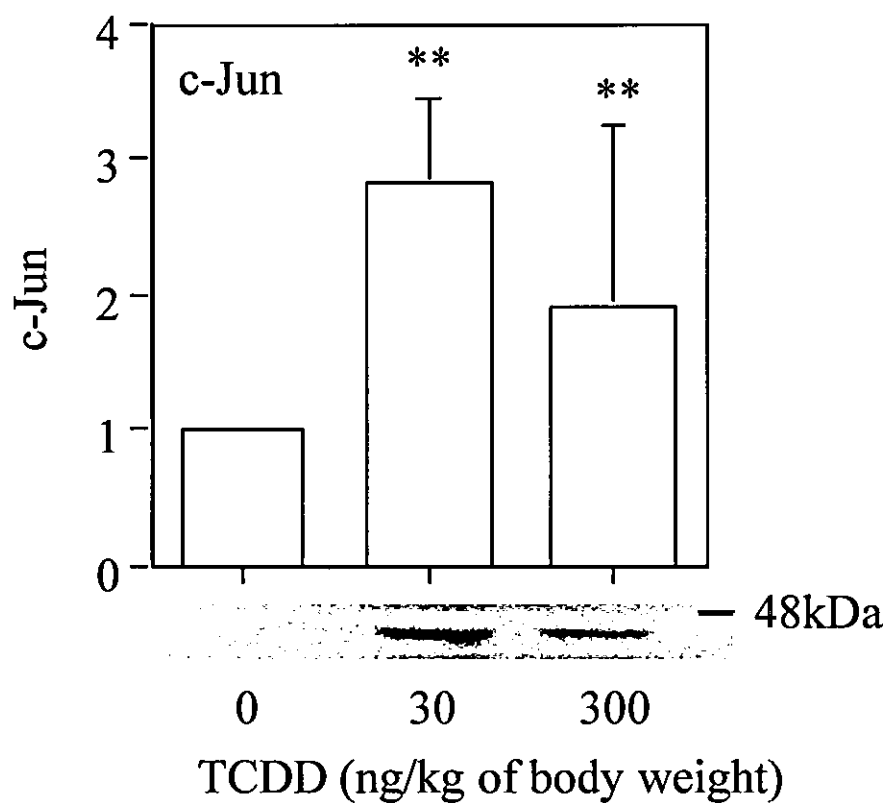


Bar means \pm SD (n=3), * $p < 0.05$

図 3-10. 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
-PI3K-p110-



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 使用抗体一覧 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 ウェ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	-	→
			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				
				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				
				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				
				29	34	0.685	0.594	30-300	0.2620	-	

表3 ウェスタンブロッティング解析結果・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				
				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				
				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 ウェスタンブロット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.

厚生労働科学研究費
総合（平成14年度～16年度）
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的、タンパク質解析を行い検討した。F1の1例のみに、altered foci（癌化）が見出された。さらに、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。また、TCDD投与後長期間経過した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。マクロのレベルでは、発癌性に有意な影響はなかったが、タンパク質レベルでは、細胞増殖や細胞死など発癌性に繋がる可能性のある種々のタンパク質の発現がTCDDにより誘導された。

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解析した。その分担研究(平成14年度～16年度)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、Fla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。

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や細胞死（いずれも発癌性に繋がる可能性がある）に密接に関与するタンパク質の発現を解析して、検討した。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、30ng/kg群、300ng/kg群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。

AhRの発現レベルは、抗AhR抗体を用いて、免疫染色を行った。抗AhR抗体がAhRを認識できるかどうかを、ヒト培養肝臓癌細胞（HepG2）を用いてウエスタンブロット法で行った。肝臓癌固定組織標本を用いて癌部と非癌部の染色性を、強陽性、陽性、弱陽性、軽微、陰性に分類して評価した。

（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払った。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払って回収後保管し、新日本科学株式会社で高温焼却した。

C. 研究結果

1. 病理学的解析結果

F1の1例（サル番号38）のみにaltered foci（癌化）が見いだされた。

2. 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肝臓の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

肝臓の altered cell foci (癌化) は、1 例のみであり、TCDD により

誘導されたかどうかは、判断できないと考えられた。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。この考察の根拠として、発癌に密接な関係のあるタンパク質 (Caspase-8、Bad、EGFR) の発現が誘導されていることが挙げられる。Caspase-8、Bad は細胞死の情報伝達系の重要な因子であり、細胞死に至る情報伝達系が誘導されていることを意味している。細胞死を回避するため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、癌化との密接な関連性があり、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、30ng/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

1 例の肝臓に altered foci が見ら