

る。

2,3,7,8-四塩化ジベンゾパラジオキシン(以下TCDD)は、間質の増殖を引き起こすことが示唆されている。TCDDを胎生期に投与した場合、胎児組織の間質の増殖を引き起こすか否かについては不明であった。TCDDは、マウス母体に投与した時、その胎仔で腎発生において細胞外基質を変化させることが報告されている。しかし、この報告ではフィブロネクチンやIV型コラーゲンなどの細胞外基質は減少すると結論されている。最近、我々は胎生期・授乳期にTCDDを暴露し、TCDDが児に与える影響を調べている。これまで、胎生期・授乳期にTCDD暴露を受けた児のうちで、生後死亡した児に腎病変が確認されている。TCDD暴露群に認められた異形性腎の腎小体は対照群に比べて矮小化していたため、腎機能の低下が見られた。腎小体の数に差はなかったことから、腎の初期発生における尿管芽の分枝は正常に進行し、その後の分化、成長の過程においてTCDDにより腎臓障害を起こしたと考えられた。

TCDDに暴露されたアカゲザル児の腎への影響を考える上で、腎循環動態が変化している可能性を調べる必要がある。そこで今回、血管変化を確認するために、TCDDを授乳期・胎生期に暴露された児の腎弓状動脈あるいは葉間動脈の内膜肥厚の程度を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 実験動物

観察にはアカゲザル児を用いた。アカゲザルを交配させ、妊娠母体を3群に分け、妊娠20日のアカゲザルの母体に、TCDD 30 ng/kg(低投与量群)あるいは300 ng/kg(高投与量群)をそれぞれ皮下投与した(ラット実験から得られた最低毒性体内負荷量の86 ng/kgを

基準とし、この約3分の1と3倍量を投与した)。その後、体内負荷量を維持するために30日毎に初回投与量の5%を維持量とし、対照には溶媒のみを同様に投与した。母へのTCDD投与は自然分娩後90日まで持続した。初産児(F1a)の離乳後、期間において母体を再度交配、妊娠させ、F1a実験での投与によるTCDDの母体蓄積を考慮に入れ、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を投与して第二産児(F1b)を得た。対照にはF1aと同様の処置を行った。その後の調査により、F1a実験投与によるTCDDの母体蓄積は当初予想された数値よりも小さいことが判明したため、厳密に考慮するとTCDDの体内負荷量はF1aとF1bとで異なるが、例数が少ないため今回はF1aとF1b両方の児を使用した。この実験により生まれた児で、生育途中で死亡した児を解剖し、腎臓のパラフィン包埋ヘマトキシリン-エオシン(H.E.)染色組織切片標本を測定材料に、動脈の内膜肥厚の程度を観察し、評価した。一部の標本にはコラーゲン染色であるピクリシウス赤染色を行った。なお、対照群の1例には、死産児の資料も使用した。今回の実験で観察した各群の例数は、対照群右6例、左7例、TCDD低投与量群右5例、左6例、TCDD高投与量群左右共に6例である。また、アカゲザルの個体番号、性別、生存日数を表1に示す。

### 内膜面積測定

腎臓の組織切片は顕微鏡下で観察し、弓状動脈あるいは葉間動脈のうち、切断面の形状が正円に近いものを選択し撮影した。各組織切片標本につき2~5カ所の動脈切断面を撮影した。

動脈の切断面から内皮と内弾性板をそれぞれ

れトレースした(図1)。Scion Imageを使用してトレース内の面積を測定した。内皮トレース面積を内腔面積、内弾性板トレース面積を内弾性板内面積と定義した(図1)。内弾性板内面積は内膜厚が無い状態での内腔面積を表す指標とした。つまり、内弾性板内面積と内腔面積の差を内膜面積とし、内弾性板内面積との比で提示した。

### C. 研究結果

対照群の弓状動脈あるいは葉間動脈は、内弾性板が明瞭で、良く発達した中膜が観察できた。内皮細胞は内弾性板にほぼ密着しており、ごく一部分に内弾性板と内皮の間に線維芽細胞様の細胞を含む疎性組織が認められた。内膜面積は、内弾性板内面積に対して右腎で10%程度、左腎で15%程度であり、右に比較して左腎の弓状動脈あるいは葉間動脈の内膜がわずかに厚かった(図2)。

TCDD 低投与量群では、弓状動脈あるいは葉間動脈の組織像には対照群と比較して顕著な差は認められなかった。内膜面積は、右腎に関しては対照群に比較してやや大きいものの、有意差は認められなかった。左腎に関しては、対照群とほぼ同じ内膜面積であった(図2)。

一方で、TCDD 高投与量群の弓状動脈あるいは葉間動脈の内膜には、組織学的に肥厚が認められた例があった(図3)。内弾性板内面積は対照と比較して同レベルでも、内膜が高度に肥厚している例が認められた。内膜肥厚が著しい例では、一般に内弾性板は不連続かあるいは一部で重複していた。内膜組織は細胞を含み、結合組織様であった。内膜組織内の細胞は線維芽細胞であり、線維様の構造も多少認められた(図4)。これらの線維はピクリシリウス赤に染色された(図5)。炎症細胞の内膜内への浸潤はほとんど認められな

かった。内膜にアテロームの形成は認められず、また、小動脈を含めて動脈壁に硝子変性も認められなかった(図4)。TCDD 高投与量群の弓状動脈あるいは葉間動脈の内膜面積は、対照群のそれと比較して、右腎で3倍程度、左腎で2.5倍程度大きかった。しかし、TCDD 高投与量群の弓状動脈あるいは葉間動脈にも組織学的に肥厚が認められない例もあった。つまり、TCDD 高投与量群に認められた内膜肥厚の程度は、個体差が大きく、内膜面積のばらつきは極めて大きかった。そのため、t検定では対照群との間に有意差を認めなかった。

対照群、TCDD 投与群共に、弓状静脈あるいは葉間静脈に内膜肥厚は認められなかった(図6)。

### D. 考察

本研究において、TCDD 高投与量群に腎弓状動脈あるいは葉間動脈の内膜が肥厚している例が認められた。通常、腎臓の動脈計の内膜肥厚の程度には年齢依存的な側面があり、高血圧によって進行する。したがって、血管系の中で弓状動脈については、小児ではわずかな内膜肥厚が認められることがあるものの、正常小児ではほとんど内膜の肥厚は無いとされる。本研究においても、対照群の腎弓状動脈あるいは葉間動脈の内膜面積は、内弾性板内面積の10~15%程度である。それに対して、TCDD 高投与量群では、内膜面積は内弾性板内面積の30%程度に達していた。TCDD 高投与量群の児の腎に異常が引き起こされることはすでに平成15年度および16年度の報告書で報告している。今までに確認されたもっとも重篤な腎異常は、高度な線維化と腎小体の矮小化(異形性)である。これらの報告を総合して考慮した場合、TCDDは腎形成に悪影響を及ぼすことが強く示唆される。

なお、本研究において弓状動脈あるいは葉間動脈の内膜面積は、左側腎において右側腎より大きかった。これは左側腎のほうが大動脈により近いいため、血圧が高く、また、下大静脈により遠いため、うっ血も起こりやすいためであると考えられる。

TCDD 高投与量群において認められ、先に報告された高度線維化の例は、本研究においては内膜面積の測定は行っていない。この例では、内膜肥厚の程度は著しく、内腔がほとんど閉塞していた弓状動脈も認められた。腎線維化の程度も著しく、腎小体や尿細管がほとんど消失し、線維組織に置換されている部も認められた。また、線維化の程度が軽い部でも、腎小体の異形性は著しかった。線維化そのものは腎柱部に強く認められ、葉間血管周囲の結合組織が特に増殖していた。また、本研究において、腎臓の線維化が認められていない例でも弓状動脈あるいは葉間動脈の内膜肥厚の程度が著しい例があった。つまり、今回観察された弓状動脈あるいは葉間動脈の内膜肥厚は、腎の線維化に伴う二次的な変化ではないと考えられる。

TCDD 投与群の腎病変において、血管病変がまず一次的に引き起こされた場合、児の年齢から、さらに腎の細動脈に関してはその壁にフィブリノイド壊死が認められないことから、血圧異常が血管病変の因子になったとは考えにくい。TCDD が結合組織増殖に積極的に作用する可能性は否定できないが、肝小葉間動脈や心冠状動脈など腎臓の動脈以外の動脈系には内膜肥厚や硬化をきたしていると思われる所見は得られていない。また、腎血管に関しても、内膜肥厚が認められるのは動脈系のみで、静脈には内膜肥厚は認められていない。このように選択的な部に影響を与えることから、TCDD が結合組織増殖に単純に関わっているとは考えにくい。

本研究において、TCDD 低投与量群には、対照と比較して内膜の肥厚は認められなかった。今後、例数の蓄積が必要であると思われるが、今回の結果からは、TCDD の腎組織に与える影響を指標としたときに、現在設定されている TDI は妥当であると考えられた。

## E. 結論

胎生・授乳期のアカゲザルに、TCDD をラット実験から得られている最小毒性量で 3 倍量(体内負荷量換算)暴露したところ、児の腎弓状動脈あるいは葉間動脈に内膜肥厚が認められた例があった。TCDD は妊娠および授乳期母体へのこの暴露量において、児の腎形成に悪影響をおよぼす可能性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文

なし

### 2. 学会発表

- 1) 隅田寛、安田峯生、山下敬介、角崎英志、有馬宏明  
2,3,7,8-四塩化ジベンゾパラジオキシン(TCDD)の胎生・授乳期暴露を受けたアカゲザル腎弓状動脈の内膜肥厚。第44回日本先天異常学会学術集会抄録集 86(抄録)、2004(第44回日本先天異常学会学術集会、2004年7月15-17日、佐賀)
- 2) 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. 日本内分泌攪乱化学物質学会第7回研

究発表会要旨集 114(抄録)、2004 (日本内分泌攪乱化学物質学会第7回研究発表会、2004年12月14-15日、名古屋)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他

表 1

	動物番号	性別	生存日数	右腎	左腎
対照群	3a	♀	453	○	○
	9a	♀	435	○	○
	15a	♀	723	○	○
	49a	♂	死産	○	○
	61a	♂	1297	○	○
	1b	♂	365		○
	3b	♀	615	○	○
低投与量群	16a	♂	1044	○	○
	21b	♂	595	○	○
	23b	♀	616		○
	24b	♂	583	○	○
	27b	♂	614	○	○
	65b	♂	593	○	○
高投与量群	38a	♀	425	○	○
	45a	♀	422	○	○
	51a	♂	406	○	○
	68a	♂	361	○	○
	31b	♂	536	○	○
	38b	♂	631	○	○

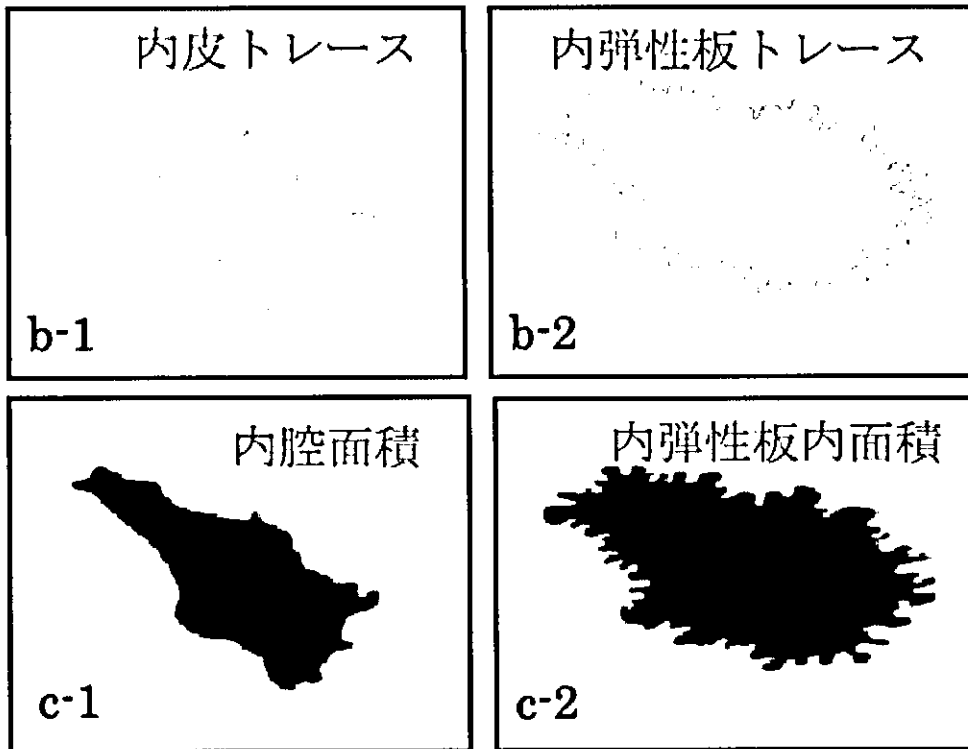
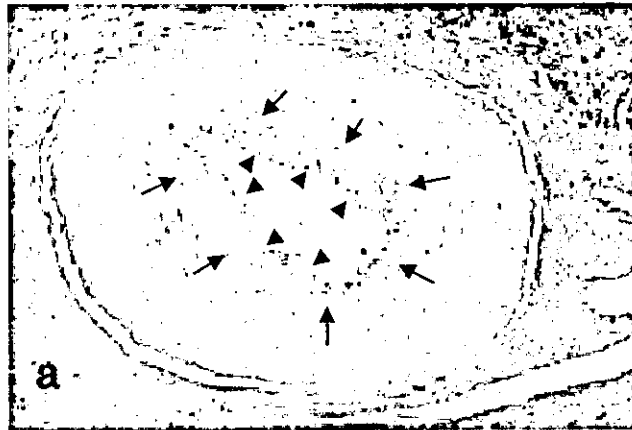


図1 内膜面積測定方法

弓状動脈あるいは葉間動脈の組織断面写真(a)より内皮(矢頭)と内弾性板(矢印)をトレースした。それぞれのトレース図(b-1、b-2)から面積を測定し、内腔面積(c-1)、内弾性板内面積(c-2)とした。

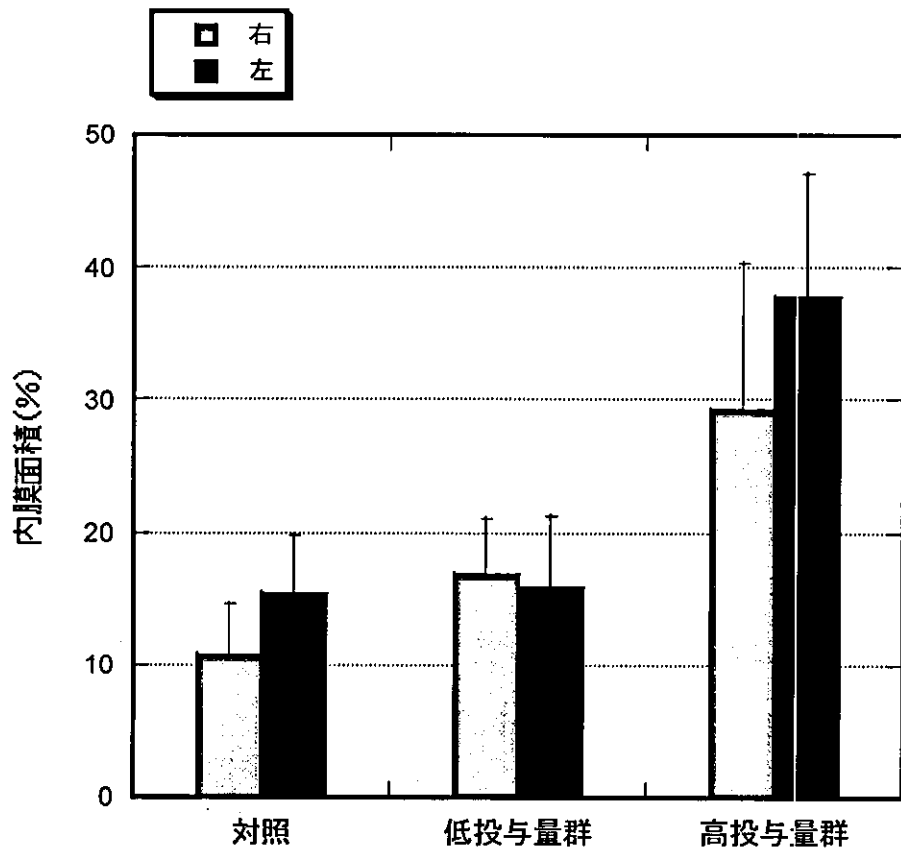


图2 内膜面积

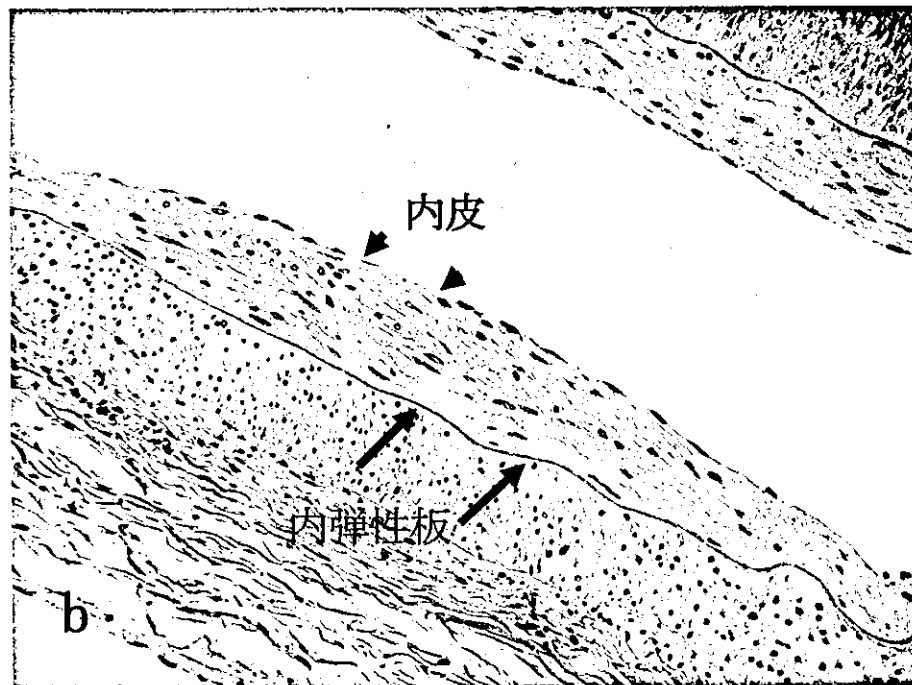
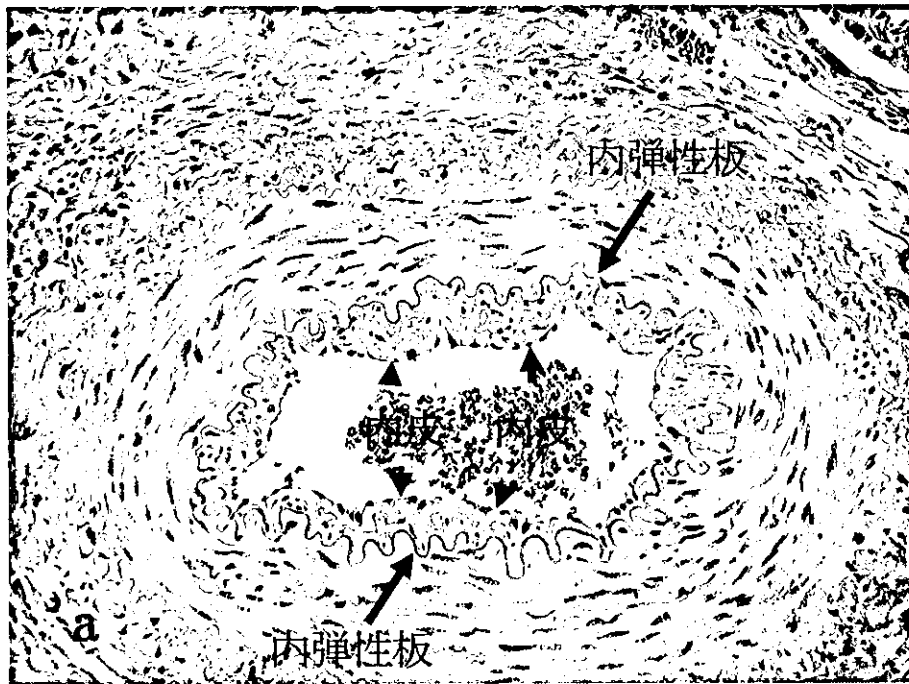


図3 弓状動脈あるいは葉間動脈の内膜肥厚例  
 a: 動脈の横断面、b: 動脈の縦断面



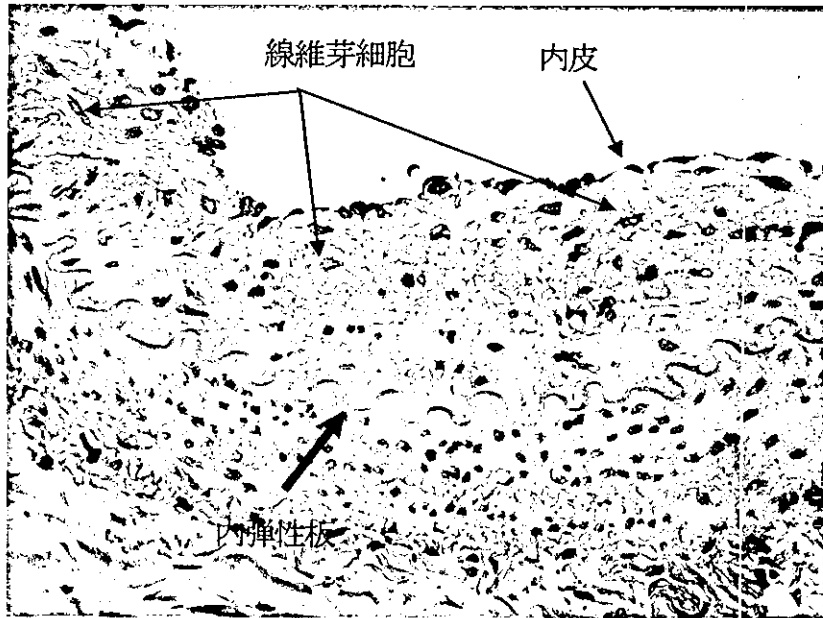


図4 弓状動脈あるいは葉間動脈内膜の強拡大

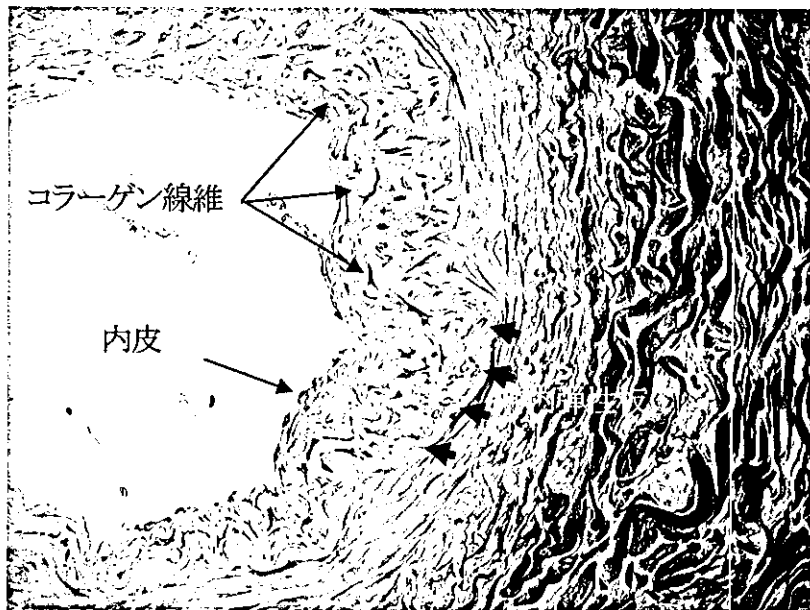


図5 弓状動脈あるいは葉間動脈壁のピクリシリウス赤染色



図6 弓状静脈あるいは葉間静脈

# 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 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 京都大学霊長類研究所 助手

## 研究要旨

文明社会生活において非意図的に生じてくるダイオキシンは曝露をうけた人々の健康へ影響を及ぼすことが懸念されている。ダイオキシン曝露の影響を調べる研究は主にラットなどのげっ歯類を用いて研究が行われている。しかしげっ歯類とヒトとの種属の違いを考慮するとヒトに最も近い実験動物の研究からの外挿が望まれるためサルを用いて、I 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 II 胎児期サルへの曝露における四肢形成影響の検討 の 2 つの研究を行った。

### I. ダイオキシン曝露後長期経過したアカゲザル臓器の遺伝子発現性障害性の解析

ダイオキシンを曝露した後に無曝露で 3 年から 5 年を経過したアカゲザルの臓器への影響を遺伝子発現性から解析した。TCDD を負荷したのちに 3 年-5 年間の長期間に無曝露で経過した母体と児の肝臓における CYP1A1 遺伝子発現量を調べた。母体への 0 (溶媒)、30 または 300 ng/kg 投与の 3 群の計 40 個体、児への投与 3 群の計 26 個体からなる総計 66 体について CYP1A1 遺伝子の発現量を解析したところ、母児ともに TCDD 曝露 30 または 300 ng/kg 投与群はいずれも 0 ng/kg (溶媒) 投与群と比較して発現量の変動は検出されなかった。

[方法] 交配で受胎を確認したアカゲザルを約 20 匹毎に 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 (以下 TCDD) を 0 (溶媒)、30 または 300 ng/kg を皮下投与し、後の 30 日毎に初回投与量の 5% 量を維持量として追加投与した。母体への TCDD 投与は分娩後 90 日まで続け、胎児期から乳児期まで曝露したアカゲザル母児を用意した。出産は自然分娩させ、曝露母体の授乳により児を哺育させた。分娩 90 日以降は無曝露で飼育し TCDD 曝露から約 5 年経過した母体と児の影響を研究した。一部の母体については再度交配し、TCDD 負荷を同様にした母体と児を得て、TCDD 曝露から約 3 年経過し

た母体と児の影響を研究した。TCDD 曝露における臓器影響は遺伝子の発現量から解析した。これまでのアカゲザル母体への曝露の短期影響の結果について簡略に記述する。30ng-300ng/kg 体重で TCDD を単回投与したアカゲザルの投与後 49 日目の臓器において CYP1A1 遺伝子の発現変動が乳腺、皮膚、腎臓、脾臓、肝臓、および脳において検出されている。このため従前と同様の RT-PCR 法を用いて長期影響の研究を行った。TCDD を負荷した母体と児の得られた総ての試料について肝臓から mRNA を得て CYP1A1 遺伝子の発現量を解析した。[結果] TCDD を負荷したのちに 3 年-5 年間の長期間に無曝露で経過

した母体と児の肝臓における CYP1A1 遺伝子発現量を調べた。母体への 0 (溶媒)、30 または 300 ng/kg 投与の 3 群の計 40 個体、児への投与 3 群の計 26 個体からなる総計 66 個体について CYP1A1 遺伝子の発現量を解析したところ、母児ともに TCDD 曝露 30 または 300 ng/kg 投与群はいずれも 0 ng/kg (溶媒) 投与群と比較して発現量の変動は検出されなかった (表 1)。

[考察] TCDD 曝露後長期経過したアカゲザル臓器の遺伝子発現性障害性はみいだされなかった。これまでのアカゲザルで得られたデータから TCDD 曝露後 49 日目の短期間の影響は遺伝子発現性が 30 および 300 ng/kg 投与群の母体臓器においては生じていた。TCDD 曝露後に無曝露で 3 年以上の長期間を経過した母体および児の臓器では遺伝子発現性はコントロールレベ

ルに回復したものと言える。短期間の曝露下の胎児あるいは乳児への遺伝子発現性への影響は予算の関係で計画されなかったが、アイソトープ付加 TCDD を 30ng および 300ng/kg 体重で妊娠マカクサルに単回投与した投与後 7 日目の研究においては両曝露量ともに TCDD が胎児に移行していたこと (総合研究報告書参照)、300ng/kg 群において出産児および死産児の歯の形成異常 (安田班、厚生労働科学研究費報告書参照)、肝臓の形成異常 (福里、厚生労働科学研究費総合分担報告書参照) や腎臓の形成異常 (福里、厚生労働科学研究費総合分担報告書参照) が生じていたこと、などから胎児あるいは乳児への投与後の短期間においても TCDD は遺伝子発現性に影響を与え、臓器形成に異常性を与えるものと推定される。

## II. ダイオキシン曝露における胎児期サルの四肢形成影響の検討

### 研究要旨

日本においてはアカゲザルと同じマカク属に属するニホンザルが自然生息している。ニホンザルからは四肢奇形をもつ児が生まれる自然現象があり現在もみられている。この原因として四肢奇形の遺伝性は否定されていることから、環境由来の汚染物質 (ダイオキシンなど) の胎生期曝露による影響が懸念される。このため TCDD 曝露におけるアカゲザルにおける四肢形成の異常について検討するとともに自然群で産まれた四肢奇形サルの血液からダイオキシン類を分析し汚染物質と四肢奇形性の関連を検討した。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 TEQ 変化をプロットすると奇形個体の TEQ は正常個体の TEQ 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。

[方法] TCDD 曝露のアカゲザルの用意は上記と同じである。すなわち、妊娠アカゲザルを約 20 匹毎に 3 群に分け、妊娠 20 日から TCDD を 0 (溶媒)、30 または 300 ng/kg を皮下投与した。児の四肢形態については生後に肉眼により観察した。また、サルのダイオキシン類

汚染量の疫学調査を京都府嵐山野生群の四肢奇形を含むサルの捕獲調査および愛知県犬山の飼育群の 2 地点について行った。調査地点において 2003 年に各 4 頭のサルから血液を得て分析を行った。血液試料からのダイオキシン汚染量については厚生省ダイオキシン測定

暫定マニュアル2000年版によって分析した。[結果] TCDDを胎児期一離乳期に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(表2)。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(表3)。誕生年毎のTEG変化をプロットすると奇形個体のTEQは正常個体のTEG変化の範囲内であり差異はみられなかった(図1)。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。[考察] TCDDが検出された2頭においては四肢奇形性との関連はみられなかった。TEQにおいて野生群および飼育群の間および四肢奇形と正常四肢の個体間の差異はいずれも見られなかった。また、胎児期一離乳期にTCDD曝露を受けた児において四肢奇形個体は見られていない。ヒトにおいて四肢奇形性は胎児期12ステージで生じることが知られている。アカゲザルやニホンザルなどのマカク属サルには四肢奇形が生じ、この感受期は妊娠24日以後と報告されている。我々の実験計画は曝露を妊娠20日目から始めていることからTCDDの四肢形成影響を検討することに合理性がある。以上を合わせて考慮すると、ダイオキシン類から換算されたTCDDまたは曝露されたTCDDは少なくとも単独では四肢奇形形成に関連しないと推定された。

### III. 総合考察

これまでの研究において、TCDDの遺伝子発現性に及ぼす曝露影響は投与後49日目の短期間曝露の母体臓器において生じているものの、曝露後に3年以上の長期間を経過した母体および児の臓器では遺伝子発現性はコントロールレベルに回復することが明らかとなった。また、TCDDは少なくとも単独では四肢奇形に関連しないと推定された。TCDD曝露影響を広く考察すると、歯、肝臓、腎臓などの器官臓器形成にTCDDは影響を与えていたことから、TCDDは曝露された妊娠6月間および乳児期3月間のあと3年から5年間に無曝露で経過しても一度生じた器官臓器の障害は回復しないことを示している。TCDDにおいては曝露から短期間における遺伝子発現量の変化が後に続く器官臓器の形成に異常性を与えていると言える。従って、今回計画になかったTCDD曝露から短期間の試料について遺伝子発現性を研究すると形態異常までは生じない器官臓器への障害性が解析できるため更に研究する必要がある。これまで予備的データが得られたTCDDの低曝露群30 ng/kgにおいても胎児への移行がみられること、低曝露群30 ng/kgにおいても母体の乳腺に多くの遺伝子に発現の変動が見られたこと、TCDD曝露によりサルに発現の変動がみられた遺伝子群についてヒト乳部癌mRNAの一部に共通した陽性ハイブリダイズが認められること、などの厚生労働科学研究費報告に予報した結果についても今後注意を払うことが望まれる。本研究班においてサルを用いて研究された生体障害性からヒトへの障害性を外挿することについては

94-96%の類似度で生じる可能性が高いと推定された。すなわち、生物の生体機能は生体分子の構造で担われていることを考慮すると生体において発現している分子の構造を比較すると生物間の類似度を推定できる。実際にマカクザルのメッセンジャーからcDNAにして調べた塩基配列はヒトの配列と比較した場合94-96%の類似度であった。これはヒトへのTCDD影響を外挿するためにサルを用いた本班の研究課題の重要性を示している。

#### I. 論文発表

Asaoka, K., Iida, H., Watanabe, K., Miyaji, K., Goda, H., Ihara, T., Yasuda, M., Kubota, S. Contamination of dioxins in free ranging and breeding monkeys in Japan and relationship analysis between limb malformations and administration with 2, 3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on macaque monkeys. (submitted to Chemosphere)

Ohta, M., Akema, S., Tsuzuki, M., Korenaga, T., Fukusato, T., Asaoka, K., Murata, N., Nomizu, M., Arima, A., Kubota, S. 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-, 2004

Korenaga, T., Kubota, S., Ohta, M., Asaoka, K., Murata, N., Nomizu, M., Arima, A., Fukusato, T. Liver injury in Rhesus monkeys subcutaneously injected with

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Organohalogen Compounds 66: 3315-, 2004

Yasuda, I., Yasuda, M., Sumida, H., Arima, A., Ihara, T., Kubota, S., Asaoka, K., Takasuga, T., Tsuga, K., Akagawa, Y. In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) affects tooth development in rhesus monkeys. Organohalogen Compounds 66: 3321-3326, 2004

Asaoka, K., Iida, H., Watanabe, K., Goda, H., Ihara, T., Nagata, R., Yasuda, M., Kubota, S. No Effects of dioxin singly on limb malformations in macaque monkeys through epidemiological and treated studies. Organohalogen Compounds 66: 3421-3426, 2004

#### II. 国際学会発表

Asaoka, K., Iida, H., Watanabe, K., Goda, H., Ihara, T., Nagata, R., Yasuda, M., Kubota, S. No Effects of dioxin singly on limb malformations in macaque monkeys through epidemiological and treated studies. Dioxin 2003 Conference. The 24<sup>th</sup> International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants (PoPs) (September 6-10, 2004. Berlin, Germany)

#### III. 国内学会発表

浅岡一雄, 飯田景子, 釜中慶朗, 渡辺邦夫, 鈴木樹理, 脇田真清,

森千里, 久保田俊一郎 サルの胎児に発現する遺伝子群の網羅的解析. 日本薬学会第125年会 (2005年3月29日-31日、東京都)

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.

Asaoka, K., Iida, H., Watanabe, K., Miyaji, K., Goda, H., Ihara, T., Yasuda, M., Kubota, S. Contamination of dioxin in monkey in Japan and the investigation of dioxin effect on limb malformations of 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 p238

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., 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

浅岡一雄、飯田景子、森千里、久保田俊一郎 マカクサルの胎生初期に発現している遺伝子群の網羅的解析. 第27回日本分子生物学会年会 (2004年12月8日-11日, 神戸市)

Asaoka, K., Iida, H., Kamanaka, Y., Suzuki, J., Wakita, M., Watanabe, K., Mori, C., Inouye, M., Kubota, S. Phylogenetic characteristics of genes expressed in macaque monkeys and the Application for ecotoxicogenomics of dioxin disorder. 第77回日本生化学会大会 (2004年10月13日-16日, 横浜市)

浅岡一雄、飯田景子、釜中慶朗、鈴木樹理、西村剛、脇田真清、渡辺邦夫 ニホンザルの胎生初期に高頻度で発現している遺伝子群の網羅的解析. 第20回日本霊長類学会年会 (2004年7月2日-4日, 犬山市) 講演要旨集 p43

表 1 TCDD 曝露のアカゲザル母体と児の長期経過後の影響

TCDD を負荷したのちに 3 年-5 年間の長期間経過した母体と児の肝臓における CYP1A1 遺伝子発現量を調べた。

Monkeys	Years after TCDD exposure	Heads analysed	Increasing of CYP1A1 expression
F0 Control	ca. 5	13	NI
F0 30ng/kg	ca. 5	9	NI
F0 300ng/kg	ca. 5	18	NI
F1 Control	ca. 3-5	12	NI
F1 30ng/kg	ca. 3-5	5	NI
F1 300ng/kg	ca. 3-5	9	NI

F0: 母体; F1: 児; NI: No increasing of CYP1A1 expression.



表2 ニホンサルのダイオキシン類異性体汚染量の疫学調査

疫学調査を京都府嵐山野生群の四肢奇形を含むサルの捕獲調査および愛知県犬山の飼育群の2地点について2003年に行った。調査したサルの性別、誕生年、四肢形状、体重、血液中のダイオキシン類量をpg/g 脂肪として表記した。血液試料からのダイオキシン汚染量については厚生省ダイオキシン測定暫定マニュアル2000年版によって分析した。

Monkey	Place	Arashiyama				Inuyama				AVERAGE	STDEV	TEF	
	living	free ranging				breeding							
	ID	1	2	3	4	5	6	7	8				
	Sex	male	female	male	female	female	male	male	female				
	Birth year	1988	1989	1989	1992	1989	1989	1999	1999				
	Limb	normal	abnormal	abnormal	normal	normal	normal	normal	normal				
	Body weight (Kg)	8.3	7.5	10	5.5	8	10.2	4.5	5.4				
polychlorodibenzo-p-dioxin	2,3,7,8-TeCDD	3.6	ND	ND	ND	ND	ND	1.6	ND	2.6	1.4	×1	
	1,2,3,7,8-PeCDD	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	×1	
	1,2,3,4,7,8-HxCDD	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	×0.1	
	1,2,3,6,7,8-HxCDD	2.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2.5	ND	×0.1	
	1,2,3,7,8,9-HxCDD	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	×0.1	
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	ND	3	1.3	5.2	11	3.5	7.5	ND	5.3	3.5	×0.01	
	OCDD	26	79	21	24	49	31	43	58	41.4	20	×0.0001	
	Total PCDDs	32	82	22	29	61	35	52	58	46.4	20.3		
dibenzofuran	2,3,7,8-TeCDF	5.7	11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	8.4	3.7	×0.1	
	1,2,3,7,8-PeCDF	ND	9.3	ND	ND	ND	ND	3.6	2.1	5	3.8	×0.05	
	2,3,4,7,8-PeCDF	27	16	ND	ND	11	9.7	4.7	3.4	12	8.7	×0.5	
	1,2,3,4,7,8-HxCDF	11	8.9	ND	8.2	8	6	7.1	ND	8.2	1.7	×0.1	
	1,2,3,6,7,8-HxCDF	10	8.8	ND	6.4	9.2	5.1	6	ND	7.6	2	×0.1	
	2,3,4,6,7,8-HxCDF	12	9.6	4.1	ND	ND	7.6	ND	ND	8.3	3.3	×0.1	
	1,2,3,7,8,9-HxCDF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	×0.1	
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	ND	ND	ND	3.7	12	ND	3.5	ND	6.4	4.9	×0.01	
polychlorinated	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	ND	ND	ND	ND	7.1	ND	5	ND	6.1	1.5	×0.01	
	OCDF	ND	ND	ND	ND	10	ND	3.2	ND	6.6	4.8	×0.0001	
	Total PCDFs	67	63	4.1	18	57	28	33	5.6	34.5	25.2		
	coplanar polychlorobiphenyl	3,3',4,4'-TeCB #77	100	67	98	39	38	2100	2600	67	638.6	1064.9	×0.0001
		3,4,4',5'-TeCB #81	17	9.3	11	4.9	ND	280	270	ND	98.7	136.7	×0.0001
		3,3',4,4',5'-PeCB #126	110	42	43	19	7	110	130	21	60.3	48.6	×0.1
		3,3',4,4',5,5'-HxCB #16	30	8.4	17	3.4	ND	15	37	6.5	16.8	12.5	×0.01
		2,3,3',4,4'-PeCB #105	930	420	940	150	200	8100	6600	680	2252.5	3185.5	×0.0001
2,3,4,4',5'-PeCB #114		110	40	110	20	23	850	730	75	244.8	339.9	×0.0005	
2,3',4,4',5'-PeCB #118		2500	860	2900	400	580	17000	16000	2400	5330	6963	×0.0001	
2',3,4,4',5'-PeCB #12		71	32	67	10	14	600	500	50	168	238.3	×0.0001	
2,3,3',4,4',5'-HxCB #15		480	140	340	85	46	870	1200	190	418.9	414.8	×0.0005	
2,3,3',4,4',5'-HxCB #15		150	46	100	24	16	240	260	61	112.1	95.5	×0.0005	
2,3',4,4',5,5'-HxCB #16		260	68	180	45	29	480	670	140	234	229.4	×0.00001	
2,3,3',4,4',5,5'-HpCB #1		140	30	82	25	8.7	110	230	ND	89.4	78.5	×0.0001	
Total Coplanar PCBs	4900	1800	4900	830	970	31000	29000	3700	9637.5	12680.3			

TEF used the WHO-TEF (WHO,1998). Isomers that were detected at levels below the lower limit of determination were assigned ND and concentrations below the lower limit of determination were converted to TEQ values equivalent to zero values.

表3 ニホンサルの TEQ 換算ダイオキシン類汚染量

調査したサルについては表1を参照。調査は2003年に行った。血液中のTEQ換算ダイオキシン類量をTEQ換算 pg/g 脂肪として表記した。

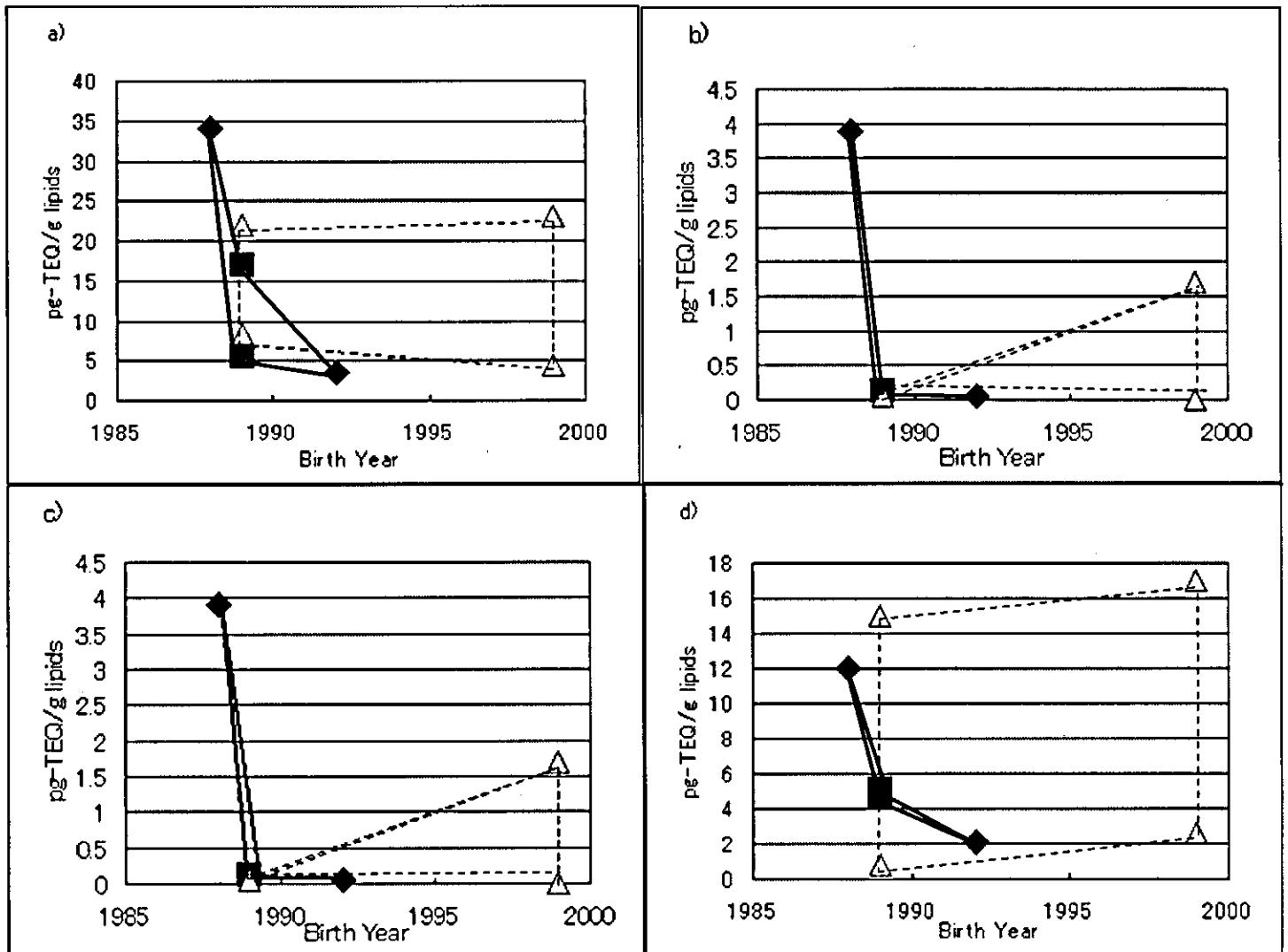
Place living	Arashiyama				Inuyama				AVERAGE	STDEV
	free ranging				breeding					
ID	1	2	3	4	5	6	7	8		
TEQ of total PCDDs	3.9	0.038	0.015	0.055	0.12	0.039	1.7	0.0058	0.7	1.4
TEQ of total PCDFs	18	12	0.41	1.5	7.4	6.7	4	1.8	6.5	6
TEQ of total Coplanar PCBs	12	4.6	5.1	2.1	0.83	15	17	2.6	7.4	6.3
TEQ of total PCDDs+ PCDFs+Coplanar PCBs	34	17	5.5	3.6	8.3	22	23	4.4	14.7	11.1

TEF used the WHO-TEF (WHO,1998). Isomers that were detected at levels below the lower limit of determination were assigned ND and concentrations below the lower limit of determination were converted to TEQ values equivalent to zero values.

図1 ニホンサル血液中のTEQ換算ダイオキシン量における誕生年間の変化。

調査したサルについては表1を参照。血液中のTEQ換算ダイオキシン類量をTEQ換算pg/g脂肪として表記した。

a) TEQ of total PCDDs+PCDFs+Coplanar PCBs, (b) TEQ of total PCDDs, (c) TEQ of total PCDDs, (d) TEQ of total Coplanar PCBs. Square: wild monkeys with abnormal limbs on 1989; diamond: wild monkeys with normal limbs, open triangle: breeding monkeys with normal limbs: solid line: TEQ's area detected in the wild monkeys; and dashed line: TEQ's area detected in the breeding monkeys.



厚生労働科学研究費  
総合 分担研究報告書

ダイオキシン暴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 山口大学医学部 助手

研究要旨

ダイオキシン類は暴露された生体の免疫系臓器・細胞に影響を与えることが知られている。本研究では、妊娠・授乳中にダイオキシン (TCDD) 投与を受けたアカゲザル (F0) およびその児 (F1) の採血を行い、白血球数とその分画の数を調べた。また、リンパ球については T 細胞 (CD3、4、8)・B 細胞 (CD20) の割合をフローサイトメーターで解析した。また F0 および F1 の一部の胸腺について組織像を検討した。その結果、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(胎盤・授乳を介した影響)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、経胎盤および授乳によって児にも影響を与える可能性があることが示唆された。

A. 研究目的

ダイオキシン類の投与はリンパ球数の減少や胸腺を萎縮させるなど、免疫系に影響を与えることが知られている。本研究では、妊娠アカゲザル (F0) に TCDD を皮下投与したときのダイオキシンの長期的影響、雌雄出生児 (F1) への経胎盤・授乳を介した影響について調べる。この研究により、妥当性のある TDI 設定について、免疫系の観点から見た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. 血液採取

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・授乳させた。母体への TCDD 投与は分娩後 90 日まで続けた。初産児 (F1a) の離乳後、期間をおいて母体を再度交配・妊娠させ、同様に TCDD を投与して第二産児 (F1b) を得た。F0 については、最終投与から約 1300 日後 (初産児のみ出産した F0) もしくは最終投与の