

使用する動物の屠殺に当たっては、麻酔薬の使用や頸椎脱臼法など苦痛の少ない方法を用いるといった、本研究所の実験動物取り扱い倫理規定に準拠した対応を行っている。ダイオキシン類の実験に際しては、当研究所の専用特殊実験施設内で、その運用規則に従い実施しており、暴露・漏洩を防止する対策については万全を期して実施している。

### C. 研究結果

12.5日の妊娠マウスにTCDDを単回経口投与し、13.5、14.5、15.5日齢の胎児口蓋のマイクロアレイ解析を行った結果、3倍以上に有意に増加した遺伝子（0.5コピー以上発現しているもの）は、13.5日齢胎児で約700遺伝子、14.5日齢胎児で約140遺伝子、15.5日齢胎児で約330遺伝子であった。一方、3倍以下に有意に減少した遺伝子（減少前に0.5コピー以上発現しているもの）は13.5日齢胎児で0遺伝子、14.5日齢胎児で約60遺伝子、15.5日齢胎児で約20遺伝子であった。それらの中で、Cyp1a1、Ahrr、Cyp1b1、TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase (Tiparp)等のTCDDにより誘導されることが知られている遺伝子が対照群に比較して顕著に増加し、胎児口蓋がTCDDの標的部位であることが形態のみならず、遺伝子レベルでも確認された。その他、数多くの遺伝子の発現量の変化が確認された。その中には、CDK inhibitorの増加も確認された。さらに、Gig1遺伝子（仮名）が、13.5、14.5、15.5日ともcyp1a1と同程度に顕著に増加し、この遺伝子がTCDDの新たな標的分子であることが示唆された。

### D. 考察

本研究では、TCDDによる口蓋裂の機序解明のため、12.5日の妊娠マウスにTCDDを投与し、13.5、14.5、15.5日齢の胎児口蓋のマイクロアレイ解析を行った。その結果、TCDDの標的分子として知られている遺伝子を含む多くの遺伝子の変化を検出することが出来た。これらの遺伝子の中で、口蓋裂に関連する変化として細胞増殖の抑制に関与する遺伝子の増加が見られたことから、今後、その発現部位を含め、口蓋裂との関連について検討する予定である。また、新たにTCDDの標的分子候補としてgig1 (glucocorticoid induced gene-1)が見いだした。本遺伝子の機能については現時点では不明であるが、口蓋裂を誘導することが知られているglucocorticoidで誘導されることから、TCDDとglucocorticoidの共通の標的分子であることが想定された。以上、今回の実験で、マウス口蓋でTCDDにより変化する多くの遺伝子を同定することが出来、今後、さらにそれらの変化と口蓋裂との関連性について解析を進めていく予定である。

### E. 結論

TCDD投与マウス胎児のマイクロアレイ解析を実施した結果、新たなTCDDの標的遺伝子及び口蓋裂誘導の候補遺伝子を得た。

### F. 健康危惧情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文

Ema M, Kimura E, Matsumoto M, Hirose A,

Kamata E. Reproductive and developmental toxicity screening test of basic rubber accelerator, 1,3-di-*o*-tolylguanidine, in rats. *Reprod Toxicol*, 22, 30-36, 2006

Ema M, Fukunishi K, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. Evaluation of Developmental Toxicity of Ultraviolet Absorber 2-(3',5'-Di-*tert*-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole in Rat. *Drug Chem Toxicol* (in press)

Takahashi M, Hirata-Koizumi M, Nishimura N, Ito Y, Sunaga M, Fujii S, Kamata E, Hasegawa R, Ema M. Susceptibility of newborn rats to 3-ethylphenol and 4-ethylphenol compared with that in young rats. *Congenit Anom Kyoto*, 46, 26-33, 2006.

高橋美加、松本真理子、川原和三、菅野誠一郎、菅谷芳雄、広瀬明彦、鎌田栄一、江馬 眞、OECD 化学物質対策の動向（第8報）－第16回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議（2003年パリ）、化学生物総合管理学会誌

松本真理子、高橋美加、平田睦子、広瀬明彦、鎌田栄一、長谷川隆一、江馬 眞、OECD 高生産量化学物質点検プログラム：第18回初期評価会議までの概要、化学生物総合管理学会誌

Ema M, Hirose A. Reproductive and developmental toxicity of organotin compounds. Golub MS, Ed. *Metals*,

Fertility, and Reproductive Toxicity, CRC Press, Boca Raton, 2006, pp. 23-64.

Hayashi M, Kamata E, Hirose A, Takahashi M, Morita T, Ema M. In silico assessment of chemical mutagenesis in comparison with results of Salmonella microsome assay on 909 chemicals. *Mutat Res*, 588, 129-135, 2005.

Hirata-Koizumi, M., Hamamura M, Furukawa H, Fukuda N, Ito Y, Wako Y, Yamashita K, Takahashi M, Kamata E, Ema M, Hasegawa R. Elevated susceptibility of newborn as compared with young rats to 2-*tert*-butylphenol and 2,4-di-*tert*-butylphenol toxicity. *Congenit Anom Kyoto*, 45, 146-153, 2005.

Hasegawa R, Hirata-Koizumi, M., Takahashi M, Kamata E, Ema M. Comparative susceptibility of newborn and young rats to six industrial chemicals. *Congenit Anom Kyoto*, 45, 137-145, 2005.

松本真理子、鈴木理子、川原和三、菅谷芳雄、江馬 眞、OECD 高生産量化学物質点検プログラム：第20回初期評価会議概要、化学生物総合管理学会誌 1, 445-453, 2005.

高橋美加、平田睦子、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、長谷川隆一、江馬 眞、OECD 化学物質対策の動向（第7報）－第15回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議（2002年ボストン）、衛研報告、123, 46-52, 2005.

松本真理子、田中里依、川原和三、菅谷芳雄、江馬 眞、OECD 高生産量化学物質点検プログラム：第19回初期評価会議概要、化学生物総合管理学会誌 1, 280-288, 2005.

Hirata-Koizumi, M., Nishimura, N., Enami, T., Wada, H., Ogata, H., Yamamoto, Y., Ito, Y., Kamata, E., Ema, M. and Hasegawa, R. Susceptibility of new born rats to the hepatotoxicity of 1,3-dibromopropane and 1,1,2,2-tetrabromoethane, compared with young rats. J. Toxicol. Sci., 30, 29-42, 2005.

Ema M., Hara H, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. Evaluation of developmental toxicity of 1-butanol given to rats in drinking water throughout pregnancy. Food Chem Toxicol, 43, 325-331, 2005.

高橋美加、平田睦子、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、長谷川隆一、江馬 眞、OECD 化学物質対策の動向（第6報）－第14回OECD 高生産量化学物質初期評価会議（2002年パリ）、化学生物総合管理学会誌、1, 46-55, 2005.

高橋美加、平田睦子、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、長谷川隆一、江馬 眞、OECD 化学物質対策の動向（第5報）衛研報告、122, 37-42, 2004.

広瀬明彦、江馬 眞、生殖発生毒性を指標としたダイオキシンの耐容1日摂取量

（TDI）算定の考え方について、衛研報告、122, 56-61, 2004.

Hirose A, Hasegawa R, Nishikawa A, Takahashi M, Ema M. Revision and establishment of Japanese drinking water quality guidelines for di(2-ethylhexyl) phthalate, toluene and vinyl chloride- Differences from the latest WHO guideline drafts- J Toxicol Sci, 29, 535-539, 2004.

Takahashi M, Ogata H, Izumi H, Yamashita K, Takechi M, Hirata-Koizumi M, Kamata E, Hasegawa R, Ema M. Comparative toxicity study of 2,4,6-trinitrophenol (picric acid) in newborn and young rats. Congenit Anom Kyoto, 44, 204-214, 2004.

Fukui Y, Ema M., Fujiwara M, Higuchi H, Inouye M, Iwase T, Kihara T, Nishimura T, Oi A, Ooshima Y, Otani H, Shinomiya M, Sugioka K, Yamano T, Yamashita KH, Tanimura T. Comments from the Behavioral Teratology Committee of the Japanese Teratology Society on OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Proposal for a New Guideline 426, Developmental Neurotoxicity Study, Draft Document (September 2003).

Congenit Anom Kyoto, 44, 172-177, 2004.

Fukuda N, Ito Y, Yamaguchi M, Mitsumori K, Koizumi M, Hasegawa R, Kamata E, Ema M. Unexpected nephrotoxicity induced by tetrabromobisphenol A in newborn rats.

Toxicol Lett, 150, 145-150, 2004.

Ema M, Hrazono A, Fujii S, Kawashima K. Evaluation of developmental toxicity of -thuyaplicin (hinokitiol) following oral administration during organogenesis in rats. Food Chem Toxicol, 42, 465-470, 2004.

Ema M, Miyawaki E, Hirose A, Kamata E. Decreased anogenital distance and increased incidence of undescended testes in fetuses of rats given monobenzyl phthalate, a major metabolite of butyl benzyl phthalate. Reprod Toxicol, 17, 407-412, 2003.

広瀬明彦、江馬 眞、鎌田栄一、小泉睦子、長谷川隆一、ビスフェノール A の内分泌かく乱作用のヒトへの影響評価、日本食品化学会誌, 10, 1-12, 2003.

Ema M, Harazono A, Hirose A and Kamata E: Protective effects of progesterone on implantation failure induced by dibutyltin dichloride in rats. Toxicol Lett, 143: 233-238, 2003.

Koizumi M, Noda A, Ito Y, Furukawa M, Fujii S, Kamata E, Ema M, Hasegawa R. Higher susceptibility of newborn than young rats to 3-methylphenol. J Toxicol Sci, 28, 59-70, 2003.

Harazono A, Ema M. Suppression of decidual cell response induced by

dibutyltin in pseudopregnant rats as a cause of early embryonic loss. Reprod Toxicol, 17: 393-399, 2003.

## 2. 学会発表

江馬 眞、OECD 発生神経毒性試験ガイドラインについて、第 17 回神経行動毒性研究会、2005.

江馬 眞、藤井咲子、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、有機スズ化合物の生殖発生毒性：ジブチルスズのマウスにおける胚致死作用、第 7 回環境ホルモン学会研究会、2005.

Ema M, Kimura E, Hirose A, Kamata E. Reproductive and developmental toxicity screening test of 1,3-di-o-tolylguanidine in rats. EUROTOX 2005.

Hasegawa R, Hirata-Koizumi M, Takahashi M, Kamata E, Ema M. Susceptibility of newborn rats to six chemicals, compared with young rats. EUROTOX 2005

Hirose A, Aisaki H, Hara H, Takahashi M, Igarashi K, Kanno J, Ema M. DNA microarray analysis of gene expressions in mice uterus exposed to dibutyltin dichloride during implantatio. The 25<sup>th</sup> International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (DIOXIN 2005).

江馬 眞、福西克弘、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、紫外線吸収剤 2-(3,5-di-tert-butyl -2-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole のラットにおける発

生毒性、第 32 回日本トキシコロジー学会  
学術年会、2005.

平田睦子、楠岡 修、西村信雄、和田 肇、  
緒方英博、福田苗美、伊藤義彦、鎌田栄一、  
江馬 眞、長谷川隆一、化学物質に対する  
新生児の感受性に関する研究：1,3-ジプロ  
モプロパン及び 1,1,2,2-テトラプロモエ  
タン、第 32 回日本トキシコロジー学会学  
術年会、2005.

江馬 眞、原 洋明、松本真理子、広瀬明  
彦、鎌田栄一、ブタノールのラットにおけ  
る発生毒性の検討、第 45 回日本先天異常  
学会学術集会、2005.

江馬 眞、OECD 神経発生毒性試験ガイド  
ライン 426 (ドラフト) の進捗状況、第 45  
回日本先天異常学会学術集会 BT シンポジ  
ウム、2005.

Ema M, Hara H, Matsumoto M, Hirose A,  
Kamata E. Developmental toxicity of 1-  
butanol given to rats in drinking water  
throughout pregnancy. The 44th Annual  
Meeting of the Society of Toxicology,  
2005.

Tahara M, Kubota R, Nakazawa H, Hirose A,  
Ema M, Tokunaga H, Nishimura T.  
Evaluation for the additive toxic  
influence of organophosphorus  
pesticides The 44th Annual Meeting of the  
Society of Toxicology, 2005.

Ema M, Fukunishi K, Nagata R, Matsumoto  
M, Hirose A, Kamato E. Developmental

toxicity study of ultra violet light  
absorber 2-(3,5-di-tert-butyl-2-  
hydroxyphenyl)-5-chloro-2H-  
benzotiazole in rats. The 25<sup>th</sup> Annual  
Meeting of the American College of  
Toxicology, 2004.

広瀬明彦、鎌田栄一、高橋美加、江馬 眞、  
有機スズの水生動物と実験動物における生  
殖発生毒性、環境ホルモン学会第 7 回研  
究発表会、2004

Hirose A, Takagi A, Nishimura T, Kanno J,  
Ema M. Review of reproductive and  
developmental toxicity induced by  
organotins in aquatic and experimental  
animals. The 24<sup>th</sup> International Symposium  
on Halogenated Environmental Organic  
Pollutants and POPs (DIOXIN 2004).

Ema M, Harazono A, Fujii S, Kawashima  
K. Developmental toxicity of -  
thujaplicin (TP) in rats. The 43th  
Annual Meeting of the Society of  
Toxicology, 2004.

Hirata-Koizumu M, Fukuda N, Ito Y,  
Yamaguchi M, Mitsumori K, Hasegawa R,  
Kamata E, Ema M. Unzpected  
nephrotoxicity induced by  
tetrabromobisphenol A in newborn rats.  
10<sup>th</sup> International Congress of Toxicology,  
2004.

Hirose A, Takahashi M, Kamata E, Ema M,  
Hayashi M. Development of genotoxicity

prediction QSAR system for resistered and existing industrial chemicals in Japan. 10<sup>th</sup> International Congress of Toxicology, 2004.

Yamaguchi Y, Nishimura N, Yahara M, Edamoto H, Ikezaki S, Kasahara K, Tamura K, Kamata E, Hasegawa R, Ema M. Renal damage in newborn rats treated with p-Cumylphenol. International Federation of Societies of Toxicologic Pathology, 2004.

江馬 眞、原園 景、藤井咲子、川島邦夫、ヒノキチオールのラットにおける発生毒性の検討、第 44 回日本先天異常学会学術集会、2004.

Ema M. Decreased anogenital distance and increased incidence of undescended testes in fetuses of rats given monobenzyl phthalate, a major metabolite of butyl benzyl phthalate. Congress of the 5<sup>th</sup> Royan International Research Award, 2004.

江馬 眞、可塑剤フタル酸エステルのラット次世代の発生に及ぼす影響、第 5 回生殖・発生毒性東京セミナー、2003.

江馬 眞、宮脇英美子、広瀬明彦、鎌田栄一、モノブチルフタレートによるラット雄胎児における肛門生殖突起間距離の短縮及び精巣下降不全、第 43 回日本先天異常学会学術年会 2003.

江馬 眞、原園 景、広瀬明彦、鎌田栄一、ジブチルスズによるラットにおける着床阻害に対するプロゲステロンの効果、第 30 回日本トキシコロジー学会学術年会、2003.

原園 景、江馬 眞、ラット妊娠初期に投与した塩化トリブチルスズの着床阻害作用、第 30 回日本トキシコロジー学会学術年会、2003.

広瀬明彦、江馬 眞、鎌田栄一、小泉睦子、長谷川隆一、ビスフェノールAによる内分泌かく乱作用のリスクアセスメント、第 30 回日本トキシコロジー学会学術年会、2003.

本田久美子、緒方英博、古川浩美、和泉宏幸、小泉睦子、鎌田栄一、江馬 眞、長谷川隆一、2-クロロフェノールの新生児および若齢ラットにおける発現毒性と無毒性量の比較検討、第 30 回日本トキシコロジー学会学術年会 2003.

西村信雄、池谷政道、石田 茂、小泉睦子、鎌田栄一、江馬 眞、長谷川隆一、3-エチルフェノールの新生児反復投与毒性および若齢動物毒性試験との比較、第 30 回日本トキシコロジー学会学術年会 2003.

Takagi A., Hirose A, Hirabayashi Y, Kaneko T, Ema M, Kannno J. Assessment of the cleft palate induction by seven PCDD/F congeners in the mouse fetus. 23<sup>rd</sup> International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (DIOXIN 2003).

Sekizawa J, Miyairi S, Ema M. Possible modification of dioxin risk in the presence of endogenous ligands for arylhydrocarbone receptor. 23<sup>rd</sup> International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (DIOXIN 2003).

Ema M, Miyawaki E. Decreased anogenital distance (AGD) and undescended testes in fetuses of rats given monobutyl phthalate (MBEP) during pregnancy. Society of Toxicology, 42<sup>th</sup> Annual Meeting, 2003.

Koizumi M, Nishida N, Enami T, Sunaga M, Horikawa H, Kamata E, Ema M, Hasegawa R. Comparative toxicity study of 3-aminophenol in newborn and young rats. Society of Toxicology, 42<sup>th</sup> Annual Meeting, 2003.

Hasegawa R, Koizumi M, Noda A, Ito Y, Furukawa M, Fujii S, Kamata E, Ema M. Higher susceptibility of newborn rats to 3-methylphenol than young. Society of Toxicology, 42<sup>th</sup> Annual Meeting, 2003.

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
    該当なし
2. 実用新案登録  
    該当なし

## 2-1. 胎生期・授乳期ダイオキシン暴露のアカゲザル歯形成・発育に及ぼす影響に関する研究

分担研究者 隅田 寛  
研究協力者 安田 峯生

広島国際大学保健医療学部 教授  
広島国際大学保健医療学部 顧問

### 研究要旨

妊娠 20 日から生後 90 日まで、母体に 2, 3, 7, 8-四塩化ジベンゾパラジオキシン (TCDD) 0 (対照)、30 または 300 ng/kg の体内負荷をかけたアカゲザル母体の児について、生後約 5 年まで発育を観察したところ、300 ng/kg 群で 8 例中少なくとも 2 例に第 3 大臼歯の欠如が発見され、これに加えて他の 2 例でも欠如の可能性が示唆された。30 ng/kg 群および対照群では異常は認められなかった。第 3 大臼歯欠如の自然発生率を知るために、実験に用いた母体 60 例 (観察時推定年齢 7~14 歳) の上・下顎を精査したが、全例で第 3 大臼歯は認められ、今回発見された第 3 大臼歯欠如は TCDD 暴露の影響と考えられる。

### A. 研究目的

PCB やダイオキシンの胎生期暴露がヒトの歯の形成、発育に悪影響を及ぼしているとの疫学調査報告がある。本研究は、胎生期・授乳期にダイオキシン暴露を受けたアカゲザル児の歯の形成と発育を調べ、ヒトでの影響評価に資することを目的とする。

### B. 研究方法

アカゲザルを交配し、約 70 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 (以下 TCDD) 0 (溶媒のみ、以下対照)、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。母体への TCDD 投与は分娩後 90 日まで続けた。児は母体に哺育させ、約 1 年後に離乳した。生後約 200 日から 5 歳まで、軽麻酔下で児の歯を口腔内デジタルカメラおよび X 線により観察した。また、第 3 大臼歯欠如の自然発生率を知るために、実験に用いた母体 60 例 (推定年齢 7~14 歳) の頭部を解剖して、上下顎の歯を肉眼的に精査した。

(倫理面への配慮)

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

### C. 研究結果

前年度に報告した異常に加えて、今年度は約 5 歳児の口腔 X 線観察で、300 ng/kg

負荷群の 8 例中少なくとも 2 例に第 3 大臼歯の欠如が発見された (図 1)。1 例では上顎左側、下顎両側で明らかに欠如していたが、上顎右側での欠如の有無は確認できなかった。他の 1 例では下顎右側での欠如と上顎左側での存在が確認できた。この他にも 2 例で欠如の可能性が示唆されたが、確定はできていない。第 3 大臼歯欠如の自然発生率を知るために、実験に用いた母体 (観察時推定年齢 7~14 歳) 対照群 14 例、30 ng/kg 群 19 例、300 ng/kg 群 27 例 60 例の上下顎を精査したが、全例で上・下顎とも第 3 大臼歯は認められた。

### D. 考察

アカゲザル 5 歳児での第 3 大臼歯部 X 線観察は容易ではなく、今後の観察で異常例が増加する可能性がある。対照群および 30 ng/kg 負荷群では明らかな第 3 大臼歯欠如は発見されず、また、剖検された 60 母体の観察でも、全例で上・下顎とも第 3 大臼歯は認められているので、今回発見された第 3 大臼歯欠如は TCDD 暴露の影響と考えられる。ヒトでは第 3 大臼歯 (智歯、いわゆる親知らず) は退化の傾向にあり、自然欠如もかなりの頻度で見られるが、アカゲザルでは自然欠如はきわめて稀なものであることが確認された。



## E. 結論

TCDD の胎生期・授乳期暴露は児の第 3 大臼歯の形成を阻害する。

## F. 健康危惧情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yasuda I, Yasuda M, Sumida H, Tsusaki H, Arima A, Ihara T, Kubota S, Asaoka K, Tsuga K, Akagawa Y: *In utero* and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin (TCDD) affects tooth development in rhesus monkeys. *Reprod Toxicol*, 20, 21-30, 2005.
- 2) S. Kubota, T. Fukusato, H. Sumida, K. Asaoka, N. Murata, A. Arima, M. Yasuda: Effects of TCDD in utero on reproductive development of rhesus monkey offspring. *Organohalogen Compounds* 67: 2362-2365, 2005.
- 3) H. Sumida, M. Yasuda, A. Arima, T. Fukusato, S. Kubota: Testes of rhesus monkeys exposed in utero and lactational period to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Organohalogen Compounds* 67: 2537-2539, 2005.
- 4) T. Fukusato, T. Korenaga, M. Ohta, K. Asaoka, H. Sumida, M. Yasuda, A. Arima, S. Toida, N. Murata, S. Kubota: Prenatal and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) impairs renal development in offspring of rhesus monkeys. *Organohalogen Compounds* 67: 2540-2542, 2005.
- 5) M. Yasuda, I. Yasuda, H. Sumida, A. Arima, S. Kubota: Defects of the

third molar teeth in rhesus monkeys prenatally and lactationally exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Organohalogen Compounds* 67: 2543-2545, 2005.

### 2. 学会発表

- 1) 徳田信子 (共同)  
ダイオキシン胎生期・授乳期暴露のアカゲザル母児胸腺とリンパ球への影響。解剖学雑誌 80 巻 181、2005。  
(第 110 回日本解剖学会全国学術集会 2005 年 3 月 29-31 日 富山)
- 2) 安田峯生、安田以久、隅田寛、有馬昭宏、久保田俊一郎: TCDD の胎児・授乳期暴露を受けたアカゲザル児にみられた第 3 大臼歯欠如。第 45 回日本先天異常学会全国学術集会要旨集、115、2005。(第 45 回日本先天異常学会学術集会、2005 年 7 月 14-16 日、東京)
- 3) 隅田 寛、安田峯生、有馬昭宏、福里利夫、久保田俊一郎: TCDD の胎児・授乳期暴露を受けたアカゲザル児精巣の変化。第 45 回日本先天異常学会全国学術集会要旨集、132。  
(第 45 回日本先天異常学会全国学術集会 2005 年 7 月 14-16 日、東京)
- 4) N. Tokuda, Y. Arudchelvan, T. Sawada, Y. Adachi, T. Fukumoto, M. Yasuda, H. Sumida, S. Shioda, T. Fukuda, A. Arima, S. Kubota: PACAP receptor (PAC1-R) expression in rat and rhesus monkey thymus. *Regulatory Peptides* 130, 177-178, 2005. (Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides, September 11-14, 2005, Rouen, France)
- 5) T. Fukusato, T. Korenaga, S. Toida, H. Sumida, M. Yasuda, K. Asaoka, A.

- Arima, S. Kubota: Abnormal renal development induced in offspring of rhesus monkeys by gestational and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). 第8回日本内分泌錯乱化学物質学会要旨集、62. (第8回日本内分泌攪乱化学物質学会 2005年9月27-29、東京)
- 6) 久保田俊一郎、福里利夫、隅田寛、浅岡一雄、有馬昭宏、安田峯生: Reproductive development of offspring of rhesus monkeys exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) during gestational and lactational periods. 第8回日本内分泌錯乱化学物質学会要旨集、229. (第8回日本内分泌攪乱化学物質学会 2005年9月27-29、東京)
- 7) S. Kubota, T. Fukusato, H. Sumida, K. Asaoka, N. Murata, A. Arima, M. Yasuda: Effects of TCDD in utero on reproductive development of rhesus monkey offspring. Organohalogen Compounds, 67, 2362-2365, (short paper), 2005. (25th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, August 21-26, 2005, Toronto, Canada)
- 8) H. Sumida, M. Yasuda, A. Arima, T. Fukusato, S. Kubota: Testes of rhesus monkeys exposed in utero and lactational period to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. Organohalogen Compounds, 67, 2537-2539, (short paper), 2005. (25th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, August 21-26, 2005, Toronto, Canada)
- 9) T. Fukusato, T. Korenaga, M. Ohta, K. Asaoka, H. Sumida, M. Yasuda, A. Arima, S. Toida, N. Murata, S. Kubota: Prenatal and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) impairs renal development in offspring of rhesus monkeys. Organohalogen Compounds, 67, 2540-2542, (short paper), 2005. (25th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, August 21-26, 2005, Toronto, Canada)
- 10) M. Yasuda, I. Yasuda, H. Sumida, A. Arima, S. Kubota: Defects of the third molar teeth in rhesus monkeys prenatally and lactationally exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). Organohalogen Compounds, 67, 2543-2545, (short paper), 2005. (25th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, August 21-26, 2005, Toronto, Canada)
- H. 財産所有権の出願、登録状況  
なし

## 2-2. 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および精巣上体の変化

分担研究者

隅田 寛 広島国際大学保健医療学部 教授

### 研究要旨

ダイオキシン類の耐容1日摂取量(TDI)は、本邦では4 pg/kg/日と定められている。この値はおもにラット実験による最小毒性量を基本にして定められた。この最小毒性量投与によりラット雌仔の生殖器形態異常あるいは雄仔の精子数減少が認められている。そこで、2,3,7,8-四塩化ジベンゾパラジオキシン(以下TCDD)が霊長類の児精巣に与える影響を検討する目的で、アカゲザルに妊娠期から授乳期にかけてTCDDを体内負荷量換算で最小毒性量の1/3量(低暴露量群)または3倍量(高暴露量群)になるように負荷した。また、第一産児(F1a)が親離れした後、再度妊娠(F1b)させ、TCDDをF1a児の場合と同様に負荷した。今回はF1b児を生後約850日程度で剖検し、精巣および精巣上体について組織学的に検討した。その結果、TCDD暴露群の精巣には浮腫傾向が認められた。TCDD暴露群の精巣組織単位面積当たりのセルトリ細胞数と精母細胞数は対照群のそれより低下していた。セルトリ細胞1個あたりの精母細胞数は低暴露量群で非常に低下していた。TCDD暴露群の精巣上体管では、上皮細胞の細胞死の増加や空胞化などの変化が示唆された。精巣組織の変化に明確なTCDD暴露量依存性は認められなかったが、今回の結果から、霊長類においてもTCDDの母体負荷によってその児の精子形成や精子成熟に影響が及ぶ可能性が示された。

### A. 研究目的

近年、男性の精子数が減少しているのではないかとの懸念が広がっており、ダイオキシン類を含む内分泌攪乱物質汚染との関連が指摘されている。今までに多くの動物実験により、ダイオキシン類の毒性に対する感受性は胎生期に極めて高いことが明らかになってきた。平成11年に日本でダイオキシン類の耐容一日摂取量(TDI)を定めた際には、胎生期に2,3,7,8-四塩化ジベンゾパラジオキシン(TCDD)の暴露を受けたラットの雌児の生殖器系異常を調べた実験データが大ききよりどころとなった。その実験において、ラット妊娠15日にTCDDを投与し、体内負荷量を測定したところ97 ng/kgであり、妊娠21日の体内負荷量は76 ng/kgであったと報告されている。その中間をとって、最小毒性量での妊娠中の母体の体内負荷量はおおよそ86 ng/kgであると算定され

た。ラット母体へのこの体内負荷量のTCDD暴露で雄児の精子数が減少するとの実験結果も報告されている。しかし、ラットのような小動物の体内負荷量と同じ量を大型の動物に負荷した場合に、ダイオキシン類が生殖器の発生に同様な影響を示すか否かを検討した実験はない。そこで今回は、妊娠アカゲザルにTCDDを投与し、その児の精巣と精巣上体に与える影響を調べた。

### B. 研究方法

#### 1. 実験動物

実験にはアカゲザルを用いた。アカゲザルを交配させ、妊娠20日のアカゲザルの母体に、TCDD 0 ng/kg(溶媒のみ、以下対照)、30 ng/kg あるいは300 ng/kgをそれぞれ皮下投与した。これらの投与量は、ラット実験から得られた最小毒性体内負荷量の86 ng/kg を基準とし、それぞれこの約1/3と

3倍量に相当する。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%を維持量として投与した。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、期間を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(低暴露量群)または200 ng/kg(高暴露量群)を皮下投与した。その後はF1a実験と同様に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。今回はF1bを生後約850日で剖検し、精巣と精巣上体の組織所見を中心にTCDDの影響を検討した。剖検した動物番号を表1に示す。

(倫理面への配慮)

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

## 2. 細胞計測

精巣のヘマトキシリン-エオジン染色組織切片を各切片あたり複数の部を顕微鏡下で撮影し、単位面積(60,000  $\mu\text{m}^2$ )あたりのセルトリ細胞数と精母細胞数を計測した。左右については区別していない。

## C. 研究結果

### 1. 精巣

F1b児の精巣は、低暴露量群、高暴露量群ともに水腫傾向が認められた(図1b、c)。特に低暴露量群の1例は水腫傾向が著しかった。また、高暴露量群の1例は出血性的水腫を示した(図1c)。ただし、対照群の精巣中隔の結合組織にもわずかではあるが水腫傾向が認められた。対照群、TCDD暴露群ともに精子形成は認められなかったが、対照群の精巣では精子形成細胞の成熟度は良く、精母細胞は数多く認められた。TCDD暴露群の精巣では、精細管そのものの発達は悪くなかったが、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象に比較して少ない個体も認められた。

そこで、精巣組織単位面積あたりのセルトリ細胞数を定量したところ、TCDD暴露

群のセルトリ細胞数は対象に比較して低下していた(図2)。ただし、セルトリ細胞数は対照群との間に有意差は認められなかったが、TCDD暴露群の精母細胞数は対照群のそれと比較して有意に小さかった( $P < 0.05$ )。

さらに、セルトリ細胞1個あたりの精母細胞数を計算したところ、TCDD低暴露量群の精母細胞数は対照に比較して有意に低下していることがわかった(図3)。しかし一方で、高暴露量群では、精巣の成熟度に関して個体差が非常に大きかったため、対照に比較してセルトリ細胞1個あたりの精母細胞数には差が認められなかった。

### 2. 精巣上体

今回観察した年齢では、精巣内での精子形成は行われていないので、当然精巣上体管内に精子は認められていない。精巣上体管上皮は多列上皮に分化しているが、背は低く、この時期では、上皮の形態のみからは輸出小管との区別は困難であった。基底膜はよく発達しており、内腔の不動毛も認められた(図4a)。TCDD暴露群の精巣上体管には、対照群のそれと比較して顕著な差は認められなかった。しかし、基底部上皮細胞の細胞死が増加している可能性がある(図4b)。このことについては確定ではなく、現在定量的に解析中である。また、TCDD高暴露量群では、空胞化した上皮細胞が認められた(図4c)。これらの変化から、TCDD暴露群では上皮の配列が乱れる傾向にあり、内腔が円状を示さない精巣上体管が目立つ精巣上体が認められた(図4b、d)。

## D. 考察

TCDD暴露群の精巣は水腫傾向が認められたが、水腫の程度とTCDD投与量との間に相関が認められていない。このため、今のところ本研究の例数では授乳期・胎生期でのTCDD曝露が児の精巣水腫を引き起こすとは結論できない。しかし、ラットによる実験で得られているTCDDの最小毒性は、生殖器に与える影響であり、その中には精子数の減少も含まれている。したがっ

て、本研究結果は、霊長類において TCDD が精巣に与えるリスクを示唆する結果になり得る。

TCDD 投与量群の精巣組織単位面積あたりのセルトリ細胞数と精母細胞数が対照に比較して低下していたことは、水腫により単位面積あたりの精細管面積が低下していることに起因していると考えられる（平成 16 年度厚生労働省久保田班研究実績報告書参照）。また、セルトリ細胞 1 個あたりの精母細胞数が TCDD 低暴露量群で低下していたことは、精子形成細胞の成熟度の低下を示していると思われる。しかし、TCDD 高暴露量群では、精子形成細胞成熟度の個体差が非常に大きく、本研究での例数では、TCDD による精子形成細胞の成熟障害の可能性について TCDD 暴露量依存性は証明し得ていない。以後の年齢における精巣機能の検討が必要である。

精巣に比較して、TCDD 暴露群の精巣上体の変化は劇的ではなかった。しかし、TCDD 暴露群の精巣上体管の上皮に変化が生じていることをうかがわせる所見も認められた。特に、基底上皮細胞の細胞死の増加の可能性については、精巣上体管上皮の成長に影響を与えると考えられるので、今後の定量的な検討が必要とされる。同様に TCDD 暴露群の精巣上体管の上皮配列の変化が機能上の変化を伴うか否かについては、以後の年齢についての検討が必要である。

## 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の 1/3 量と 3 倍量（体内負荷量換算）を暴露したところ、児の精巣と精巣上体に変化が認められた。TCDD は妊娠および授乳期母体への暴露において、霊長類においても児の精子形成および精子成熟に影響をおよぼす可能性が示唆された。

F. 健康危惧情報 なし

## G. 研究発表

### 1. 論文

- 1) S. Kubota, T. Fukusato, H. Sumida, K. Asaoka, N. Murata, A. Arima, M. Yasuda: Effects of TCDD in utero on reproductive development of rhesus monkey offspring. *Organohalogen Compounds* 67: 2362-2365, 2005.
- 2) H. Sumida, M. Yasuda, A. Arima, T. Fukusato, S. Kubota: Testes of rhesus monkeys exposed in utero and lactational period to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Organohalogen Compounds* 67: 2537-2539, 2005.
- 3) T. Fukusato, T. Korenaga, M. Ohta, K. Asaoka, H. Sumida, M. Yasuda, A. Arima, S. Toida, N. Murata, S. Kubota: Prenatal and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) impairs renal development in offspring of rhesus monkeys. *Organohalogen Compounds* 67: 2540-2542, 2005.
- 4) M. Yasuda, I. Yasuda, H. Sumida, A. Arima, S. Kubota: Defects of the third molar teeth in rhesus monkeys prenatally and lactationally exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Organohalogen Compounds* 67: 2543-2545, 2005.

### 2. 学会発表

- 1) 徳田信子（共同）  
ダイオキシン胎生期・授乳期暴露のアカゲザル母児胸腺とリンパ球への影響. 解剖学雑誌 80 巻 181、2005。  
（第 110 回日本解剖学会全国学術集会 2005 年 3 月 29-31 日 富山）
- 2) 安田峯生、安田以久、隅田寛、有馬昭宏、久保田俊一郎：TCDD の胎児・授乳期暴露を受けたアカゲザル児に

- みられた第3大臼齒欠如。第45回日本先天異常学会全国学術集要旨集、115、2005。(第45回日本先天異常学会学術集会、2005年7月14-16日、東京)
- 3) 隅田 寛、安田峯生、有馬昭宏、福里利夫、久保田俊一郎: TCDDの胎児・授乳期暴露を受けたアカゲザル児精巣の変化。第45回日本先天異常学会全国学術集要旨集、132、2005。(第45回日本先天異常学会全国学術集会 2005年7月14-16日、東京)
- 4) N. Tokuda, Y. Arudchelvan, T. Sawada, Y. Adachi, T. Fukumoto, M. Yasuda, H. Sumida, S. Shioda, T. Fukuda, A. Arima, S. Kubota: PACAP receptor (PAC1-R) expression in rat and rhesus monkey thymus. *Regulatory Peptides* 130, 177-178, 2005. (Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides, September 11-14, 2005, Rouen, France)
- 5) T. Fukusato, T. Korenaga, S. Toida, H. Sumida, M. Yasuda, K. Asaoka, A. Arima, S. Kubota: Abnormal renal development induced in offspring of rhesus monkeys by gestational and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). 第8回日本内分泌錯乱化学物質学会要旨集、62、2005。(第8回日本内分泌攪乱化学物質学会 2005年9月27-29、東京)
- 6) 久保田俊一郎、福里利夫、隅田寛、浅岡一雄、有馬昭宏、安田峯生: Reproductive development of offspring of rhesus monkeys exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) during gestational and lactational periods. 第8回日本内分泌錯乱化学物質学会要旨集、229、2005。(第8回日本内分泌攪乱化学物質学会 2005年9月27-29、東京)
- 7) S. Kubota, T. Fukusato, H. Sumida, K. Asaoka, N. Murata, A. Arima, M. Yasuda: Effects of TCDD in utero on reproductive development of rhesus monkey offspring. *Organohalogen Compounds*, 67, 2362-2365, (short paper), 2005. (25th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, August 21-26, 2005, Toronto, Canada)
- 8) H. Sumida, M. Yasuda, A. Arima, T. Fukusato, S. Kubota: Testes of rhesus monkeys exposed in utero and lactational period to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Organohalogen Compounds*, 67, 2537-2539, (short paper), 2005. (25th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, August 21-26, 2005, Toronto, Canada)
- 9) T. Fukusato, T. Korenaga, M. Ohta, K. Asaoka, H. Sumida, M. Yasuda, A. Arima, S. Toida, N. Murata, S. Kubota: Prenatal and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) impairs renal development in offspring of rhesus monkeys. *Organohalogen Compounds*, 67, 2540-2542, (short paper), 2005. (25th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, August 21-26, 2005, Toronto, Canada)
- 10) M. Yasuda, I. Yasuda, H. Sumida, A. Arima, S. Kubota: Defects of the third molar teeth in rhesus monkeys prenatally and

lactationally exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Organohalogen Compounds, 67, 2543-2545, (short paper), 2005. (25th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, August 21-26,

2005, Toronto, Canada)

H. 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 剖検 F1b 児動物番号

	動物番号	出生年月日	剖検年月日
対照群	4b	2002/8/8	2004/11/22
	11b	2002/6/13	2004/11/22
TCDD 低投与量群	25b	2002/7/7	2004/11/22
	47b	2002/7/13	2004/11/22
TCDD 高投与量群	42b	2002/5/5	2004/11/22
	44b	2002/6/24	2004/11/22
	45b	2002/6/6	2004/11/22

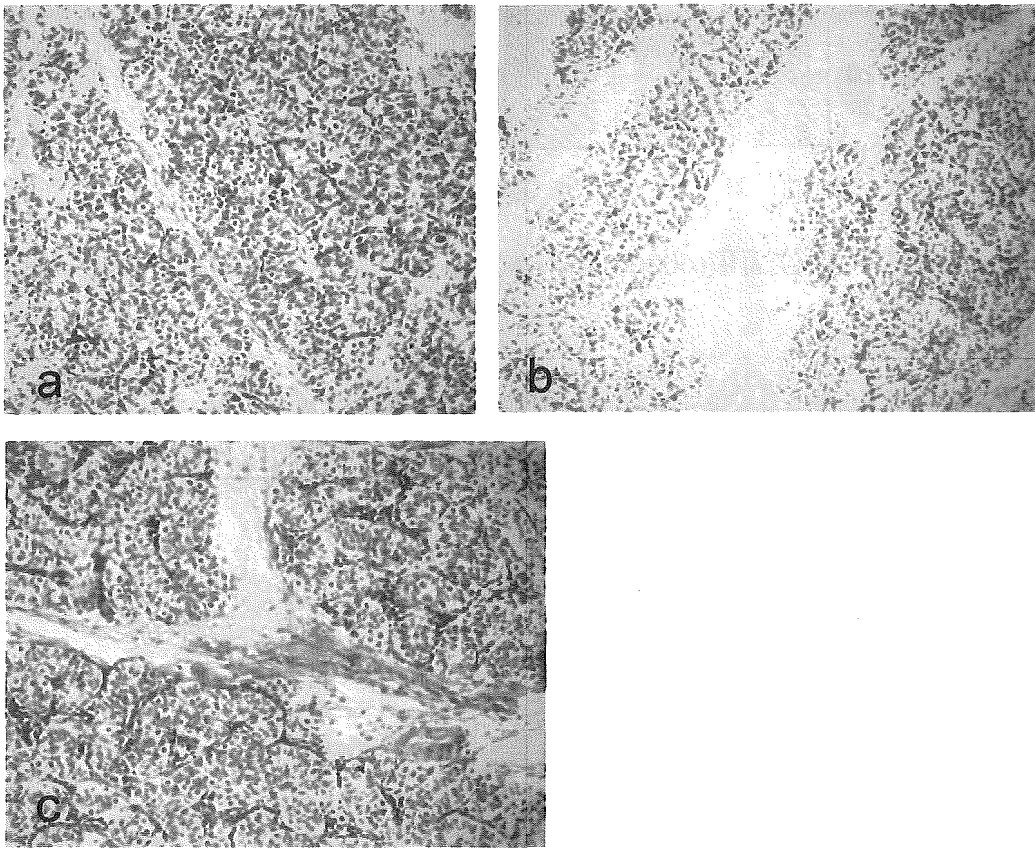


図1 精巣の組織所見

a : 対照 4b、 b : 低暴露量群 47b、 c : 高暴露量群 45b



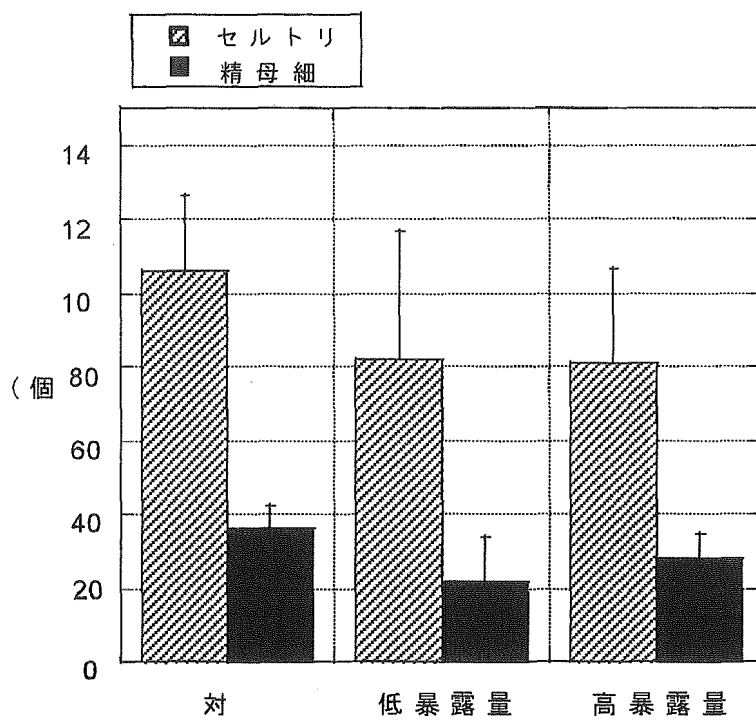


図2 単位面積(60000  $\mu\text{m}^2$ )あたりのセルトリ細胞数と精母細胞数

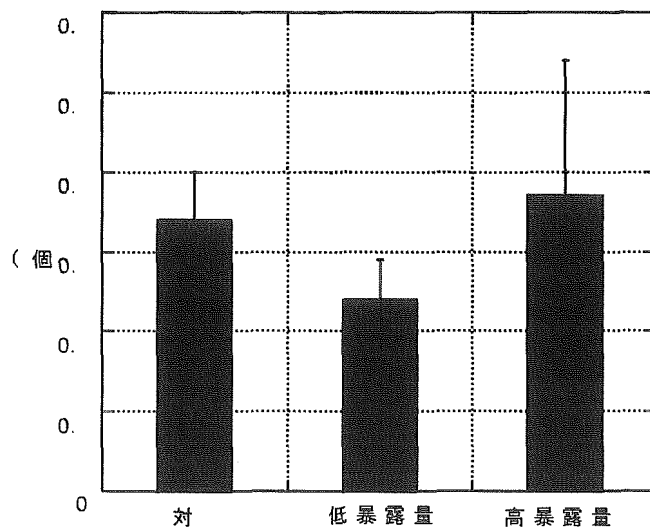


図3 セルトリ細胞 1 個あたりの精母細胞数

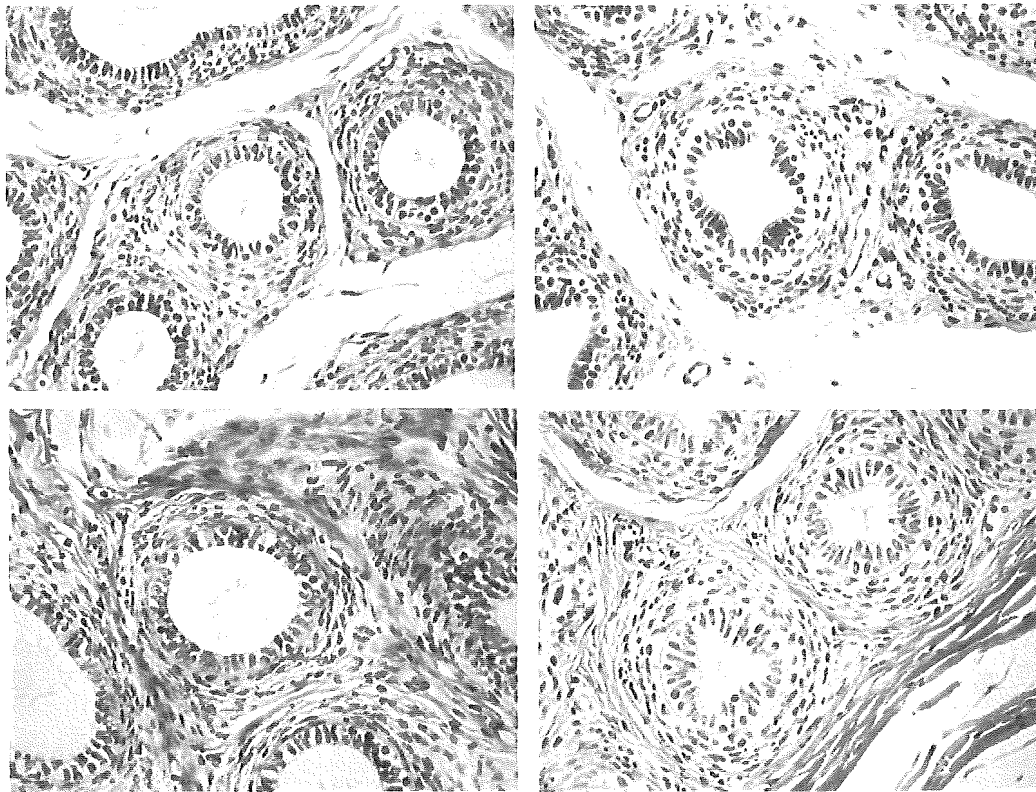


図4 精巣上体の組織所見

a : 対照 4b、 b:低暴露量群 25b、 矢印：細胞死、 c : 高暴露量群 42b、  
矢印：空胞化、 d : 高暴露量群 45b

### 3. 胚幹細胞 (ES 細胞) に対する受容体シグナルを介する化学物質の胎児毒性モデルとしての有用性の検討

高木篤也 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

#### 研究要旨

ES 細胞は胚盤胞の内部細胞塊に由来し、全分化能を有する細胞である。本年度は胎児毒性予測モデルとしての ES 細胞培養系の有用性を遺伝子レベルで検討するため、ES 細胞と ES 細胞を白血球阻害因子 (LIF) を除いた培地で浮遊培養することにより形成される胚様体 (EB) を対象としたマイクロアレイによる解析法を確立し、ダイオキシンの受容体である AhR 及び関連遺伝子の Arnt を含む種々の遺伝子の経時的な発現パターンを明らかにした。

#### A. 研究目的

ES 細胞は胚盤胞の内部細胞塊に由来し、全分化能を有する細胞である。また、ES 細胞から形成される胚様体 (Embryoid body : EB と略す) は胎児の卵筒胚 (egg cylinder, マウスで 5~7 日胚) に似ており、主に発生学の分野で発生初期胎児に発現する遺伝子の解析等に利用されている。そこで、ダイオキシン類の発生初期への影響を調べる試験系として ES 細胞の有用性を検討することを目的に下記の実験を行った。

#### B. 研究方法

TCDD の ES 細胞及びその浮遊培養により形成される胚様体 (EB) の分化への影響を遺伝子レベルで解析するため、本年度はダイオキシンの受容体である Aryl-hydrocarbon receptor (AhR)、Arnt を含む ES 細胞及び EB の分化過程で変動する各種遺伝子の正常な発現パターンについ

てマイクロアレイを用いて、経時的に解析を行った。フィーダー細胞上で培養したマウス ES 細胞 (TT2) をトリプシン処理し、細胞培養用 dish 上でさらに 2 時間培養した。この操作によりフィーダー細胞を除去した ES 細胞を LIF を除いた ES 培地で、最初の 2 日間は hanging drop 法 (ES 細胞 800 個/20  $\mu$ l) で、次の 5 日間は浮遊培養法で、計 7 日間培養した。その間に形成される EB の培養開始 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7 日後と 0.5 日ごとに EB を採取してプールし、サンプルとした。また、0 日のサンプルとしては上記フィーダー細胞除去後の ES 細胞 ( $1 \times 10^6$  個) を用いた。RNA はキアゲン社の RNeasy にて抽出、40000 以上の遺伝子発現の解析が可能なアフィメトリクス社の Gene Chip Mouse Genome 430 2.0 Array を用いて遺伝子発現解析を行った。また、その解析には定量的比較を正確に行うために、我々の開発した

Percellome 手法（細胞 1 個当たりの mRNA 絶対量を得る遺伝子発現解析手法）を用いた

（倫理面への配慮）

ダイオキシン類の実験に際しては、当研究所の専用特殊実験施設内で、その運用規則に従い実施しており、暴露・漏洩を防止する対策については万全を期して実施している。

### C. 研究結果

ES 細胞および EB の分化過程で発現する遺伝子を経時的にマイクロアレイにより解析した。その結果、多くの遺伝子発現の変動が見られた。その中で、ダイオキシンの受容体として知られている AhR を始め、関連する遺伝子として、AhRR、Arnt、Arnt2、Arnt11、Arnt12、ER（エストロゲン受容体） $\alpha$ 、 $\beta$ 、Cyp1a1、Cyp1b1 遺伝子の発現パターンについて解析した。その結果、ES 細胞において AhR 遺伝子の発現が認められ、分化の開始によりその発現は増加し、分化開始後、2 日目に発現はピークとなり、その後減少するパターンを示すことが明らかとなった。また、AhR とヘテロダイマーを構成し、ダイオキシンの毒性発現に関与することが知られている Arnt 遺伝子は AhR 遺伝子と同様に ES 細胞に発現し、分化開始後、1-2 日でピークに達した後、減少するという AhR 遺伝子に良く似た発現パターンを示すことが明らかとなった。その他の AhRR、Arnt2、Arnt11、Arnt12、ER- $\alpha$ 、 $\beta$ 、Cyp1a1、Cyp1b1 の AhR 関連遺伝子においても、AhR に似た発現パターンが見られた。さらに AhR の発現パターンを、EB の分化

マーカーとして知られている遺伝子である内胚葉のマーカーの AFP (alpha feto protein)、TT (transthyretin)、心臓のマーカーである NKX2.5、cardiac actin、中胚葉マーカーである brachyury、BMP4、神経系のマーカーである MAP2 等と比較したところ、神経系の MAP2 の発現パターンと近似していることが明らかとなった。

### D. 考察

ES 細胞および EB の分化過程で発現する遺伝子を経時的にマイクロアレイにより解析するための技術基盤を確立し、AhR を始め、関連遺伝子の発現パターンを明らかにした。その結果、ES 細胞及び EB とも各期を通して AhR 及び関連遺伝子の発現が見られたが、そのパターンは EB の分化初期に強く見られた。分化マーカーの解析から、AhR の発現パターンは神経分化パターンと近似していることが判明した。その発現の類似性の生物学的意義については現時点では明らかではないが、AhR は脳にも発現することが知られていることから、神経分化と関連する可能性も考えられた。今後、これらの結果を基に ES 及び EB の分化に及ぼす TCDD の影響について検索する。

### E. 結論

ES 細胞および EB のマイクロアレイによる解析法を確立し、AhR、Arnt を含む種々の発現遺伝子の変動パターンを明らかにした。

### F. 健康危惧情報

なし