

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

ダイオキシン胎生期暴露のアカゲザルの発育、
生殖への影響に関する研究

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 安田 峯生

平成 16 (2004) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書

ダイオキシン胎生期暴露のアカゲザルの発育、生殖への影響に関する研究	1
安田 峯生	

II. 分担研究報告

1. 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 暴露のアカゲザル歯形成への影響に関する研究	7
津賀 一弘、安田 峯生	

2. ダイオキシン暴露によるアカゲザル肝酵素類への影響に関する研究	19
杉原 数美	

3. ダイオキシン暴露によるアカゲザル免疫系への影響に関する研究	23
隅田 寛、浅岡 一雄	

4. 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 暴露による腎線維化に関する研究	27
隅田 寛、山下 敬介	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	35
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	37
-----------------	----

ダイオキシン胎生期暴露のアカゲザルの発育、生殖への影響に関する研究

主任研究者 安田 峯生

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一日摂取量（TDI）の妥当性を検討する目的で、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）30 ng/kg または 300 ng/kg の体内負荷をかけたアカゲザル母体と児について、歯の形成、肝臓の酵素、免疫系、腎臓への影響を検索した。300 ng/kg 負荷群の児には高頻度に歯の異常が観察された。母体肝臓の酵素活性には各群間に有意な差は観察されなかった。母体血の白血球分画とリンパ球表面抗原の解析、胸腺の組織学的検索では、ダイオキシンの影響を示唆する所見が得られた。300 ng/kg 負荷群生後死亡児の腎臓の組織学的観察で、線維化と血管内膜の肥厚がみられた。これらの結果から、胎生期、授乳期を通じての TCDD の暴露は、30 ng/kg の体内負荷量では次世代に明らかな障害を起こさないが、300 ng/kg の負荷では児の発生、発達に有害な作用を及ぼすものと判断される。現時点で得られている本研究の成果からは、現在の 4 pg/kg/日の TDI は妥当なものといえる。

分担研究者

隅田 寛 広島国際大学保健医療学部教授
山下 敬介 広島大学大学院医歯薬学総合研究科助教授
津賀 一弘 広島大学大学院医歯薬学総合研究科助教授
浅岡 一雄 京都大学霊長類研究所助手
杉原 数美 広島大学医学部総合薬学科教務員

較的微量の TCDD を投与し、その後も胎生期・授乳期を通じて体内負荷量を一定に保つように維持量の投与を続け、児の胎生期・生後発育と生殖への影響を調べることにより、妥当な TDI 決定のための基礎的なデータを得ることである。

A. 研究目的

ダイオキシン類は暴露された世代のみならず、次世代にも悪影響を及ぼすことが懸念されている。平成 11 年にわが国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）暴露を受けたラットの生殖器系の異常を述べたデータがよりどころとなった。現在の 4 pg/kg の TDI は再検討中であるが、ラットなど小動物のデータをヒトに外挿することには疑問がある。本研究の目的は、よりヒトに近いと考えられるアカゲザルを用い、妊娠サルに 30 または 300 ng/kg という比

B. 研究方法

アカゲザルを交配し、約 60 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）、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。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、初回は妊娠 20 日に TCDD 0、20 または 200 ng/kg、その後は F1a と同様に TCDD を投与して第二産児（F1b）を得た。TCDD 暴露開始から約 4 年後に一部の母体を屠殺・剖検した。これらの児および母体について以下の観察を行った。

- （1）児の歯の観察：死産児については高分解能コンピュータ断層装置（CT）で

上・下顎を三次元的に観察した。生存児については単純X線像で乳歯、永久歯の形成状態を観察した。また、妊娠80日に採血した母体血漿中のTCDD濃度を高分解能ガスクロマトグラフィー・高分解能質量分析法で分析し、歯異常との関連を検索した。

- (2) 剖検母体の肝臓の一部を液体窒素で凍結保存し、解凍後薬物代謝酵素ethoxyresorufin-O-dealkylase (EROD) および methoxyresorufin-O-dealkylase (EROD) を蛍光光度計で測定した。またキサンチン酸化酵素(XO)活性を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で測定した。
- (3) TCDDの最終投与後約600日に母体から末梢血を採取し、白血球数、白血球分画数を計測した。リンパ球については表面抗原(CD3、4、8、20)陽性細胞の割合をフローサイトメーターで解析した。一部の剖検母体の胸腺については組織学的に検索した。
- (4) 300 ng/kg 群で生後406日と422日に死亡した児の腎臓の組織切片を作製し、コラーゲン線維の特異的染色であるピクシリウス赤染色を施し、線維化の程度を検討した。

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

平成14年度末におけるアカゲザルの交配、分娩、母体の剖検、母児の生存状況をF1aについては表1-1、F1bについては表1-2に示す。F1a児の多くは生後約1400日に達している。F1b児は生後約600日である。300 ng/kg 群ではF1a児の生後死亡が多く、本研究の最終目的である児の生殖能力の検定を行うには例数が少な過ぎると考えられたので、9妊娠母体をこの群に追加したが、この追加群では流死産が多発した。15年度末に生存している児はF1aとF1bを合わせて対照群オス6匹、メス13匹、30 ng/kg 群オス6匹、メス8匹、300 ng/kg 群オス10匹、メス6匹である。また、飼育経費節減と、中間的な暴露母体の所見をとる目的で、15年度後半に対照群3匹、30 ng/kg 群4匹、300 ng/kg 群4匹の母体を屠殺、剖検した。

観察結果の概要を以下にまとめた。詳細については分担研究報告書に記述する。

1) 歯形成への影響

死産、生後死亡児の上・下顎を高分解能CT装置で観察したところ、平成15年度に単純X線観察で確認された300 ng/kg 群での3例の歯欠損が確認されたほか、歯切端の偏位など、軽微な変化も観察された。また、三次元画像から石灰化と受精後日齢の関係を解析したところ、歯の石灰化体積が日齢増加に伴い直線的に増加することが認められた。しかし、歯異常をもつ3例では日齢の割に歯の石灰化が遅れていることが判明した。

生存F1の単純線観察では、300 ng/kg F1aの50%の児に乳歯・永久歯の異常が見出された。異常は上顎永久側切歯の欠損が大半を占めた。F1bには異常は認められなかった。

妊娠80日に採血された血漿中TCDD濃度を測定したところ、300 ng/kg 群では1.1～8.7 pg/g 湿重量と、かなりのばらつきが認められたが、児の歯の異常頻度は母体の血漿中TCDD濃度の上昇に伴って増加し、4.1 pg/g以上の母体4例の児では全例に異常があった。

2) 母体肝酵素類への影響

対照群3匹、30 ng/kg 投与群4匹、300 ng/kg 投与群3匹での肝ミクロソームのEROD、MROD活性および肝サイトソールのXO活性を測定したところ。各活性とも、個体間でのばらつきが多少認められたが、各群での有意な差は認められなかった。

3) 母体免疫系への影響

対照群10例、30 ng/kg 群10例、300 ng/kg 群12例について血液を解析した。対照群に比べてTCDD暴露群では白血球数とくにリンパ球数が少ない傾向が見られたが、差は有意ではなく、用量反応関係も認められなかった。各群のリンパ球サブセット数に関しては、TCDD暴露群ではCD3⁺CD4⁺細胞(CD4⁺T細胞)数やCD20⁺細胞(B細胞)数が、対照群と比較して減少している傾向が見られた。一部のF0については剖検し、胸腺を組織学的に観察したが皮質と髄質の境界が不明瞭になっているなどの異常所見を示すものがあった。

4) 死亡児腎臓線維化

300 ng/kg 群の2例に両側性の腎臓形成異

常が認められた。正常腎臓はピクシリウス赤染色でほとんど染色されないが、これらの異形成腎臓はピクシリウス赤に強く染色された。異形成腎臓では腎小体と尿細管の低形成が認められた。また、血管周囲あるいは血管外膜の結合組織が増殖していた。血管内膜の肥厚、腎線維皮膜の肥厚も認められた。

D. 考察

本研究の300 ng/kg 群F1a 児にTCDDの影響によると思われる歯の異常と腎臓の異常が見出された。

げっ歯類ではTCDDへの胎生期、授乳期暴露による歯形成異常が報告されている。ヒトの疫学調査でもダイオキシン類への暴露と歯の異常の関連を示唆する報告がなされている。本研究での投与期間は乳歯原基形成前から少なくとも永久歯胚形成期に及んでおり、歯の異常が300 ng/kg のみに発現し、対照群と30 ng/kg では見られなかったこと、300ng/kg 群でも妊娠80日の母体血漿中TCDD濃度の高かった例に多かったことなどから、TCDD暴露と児の歯の異常との間に関係があることには疑う余地はない。永久歯未萌出のF1b生存児では歯の異常は認められていないが、今後追跡の必要がある。

TCDDによる腎発生障害としては、マウスでの水腎症誘発がよく知られている。水腎症の腎臓ではIV型コラーゲンの減少が報告されているが、TCDD暴露サル児ではコラーゲンは増加していた。この差はTCDD暴露期間の差による可能性がある。TCDDの腎臓でのコラーゲン増殖促進にはTGF- β 1が関与しているかもしれない。TGF- β 1は種々の器官で線維化を促進することが知られている。TCDD暴露を受けたマーモセットでは心筋の線維化が起こると報告されている。TCDD暴露とTGF- β 1などの成長因子の増加あるいは活性化との関連についての解明が次の課題と思われる。

肝薬物代謝酵素の誘導はTCDDによるAhRを介する作用としてよく知られている。本研究では、約5年前にTCDD投与されたサル肝の薬物代謝酵素活性を調べたが、対照群とTCDD投与群の間に有意な差が認められず、現時点でのTCDDによる誘導作用は検出限界以下であった。これは、TCDDが僅かずつだが代謝排泄され、体内濃度が低下していることを示していると考えられる。

母体の免疫系に関しては、予備的な少数例の観察ではあるが、TCDD暴露を受けた一部の母体の胸腺組織像に異常が認められたことは、TCDDが成体胸腺組織に不可逆的な影響を及ぼした可能性を示唆している。TCDD暴露群でT細胞サブセットの一部について細胞数が対照群より少ない傾向にあったが、これも胸腺への影響の結果によるものかも知れない。このサブセットの減少が母ザルの妊娠の維持に影響を与えるという考え方もある。妊娠サルにTCDDを投与すると流産が多発したとの報告があるが、このようなメカニズムがはたらいたのかもしれない。今回の予備的な実験で、F1児についても血液を材料に免疫系の検索を行う目処がついたので、平成16年度にはさらに研究を展開する予定である。

E. 結論

現在のわが国でのTDIの設定根拠となったラットでの最小毒性体内負荷量86 ng/kgは、対数目盛で30 ng/kgと300 ng/kgのほぼ中間に相当する。TCDD30または300 ng/kgの母体体内負荷に妊娠20日から生後90日まで暴露されたアカゲザル児を生後およそ1400日まで観察した結果、胎生期、授乳期を通じてのTCDDの暴露は、30 ng/kgの体内負荷量では次世代に明らかな障害を起こさないが、300 ng/kgの負荷では児の歯や腎臓の形成、発達に有害な作用を及ぼすものと判断される。今後の児の成長を待つて精査すべき評価項目も多いが、現時点で得られている本研究の成果からは、現在の4 pg/kg/日のTDIは妥当なものといえる。

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, Inouye M, Tsuga K, Akagawa Y: Effect of *in utero* and lactational exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on tooth development in rhesus monkeys. *Organohalogen Compounds*, 64, 431-434, 2003.
- 2) Sumida H, Tsusaki H, Inouye M, Yasuda M: Renal fibrosis induced by *in utero*

and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in rhesus monkeys. Organohalogen Compounds, 64, 453-456, 2003.

- 3) Sugihara K, Kitamura S, Ohta S, Okamura S, Yamashita K, Yasuda M, Matsui S, Matsuda T: Metabolism of indirubin and indigo, endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand candidates, and competitive effect with respect to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). Organohalogen Compounds, 65, 134-137, 2003.

2. 学会発表

- 1) Yasuda I, Yasuda M, Sumida H, Tsusaki H, Inouye M, Tsuga K, Akagawa Y: Effect of *in utero* and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on tooth development in rhesus monkeys. (23rd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, August 24-29, 2003, Boston, USA)
- 2) Sumida H, Tsusaki H, Inouye M, Yasuda M: Renal fibrosis induced by *in utero* and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in rhesus monkeys. (23rd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, August 24-29, 2003, Boston, USA)
- 3) Sugihara K, Kitamura S, Ohta S, Okamura S, Yamashita K, Yasuda M, Matsui S, Matsuda T: Metabolism of indirubin and indigo, endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand candidates, and competitive effect with respect to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). (23rd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, August 24-29, 2003, Boston, USA)
- 4) 安田以久, 安田峯生, 隅田寛, 角崎英志, 井上稔, 津賀一弘, 赤川安正: ダイオキシン胎生期暴露のアカゲザル歯形成への影響. 第43回日本先天異常学会学術集会

要旨集, 118 (抄録), 2003. (第43回日本先天異常学会学術集会, 2003年7月2-4日, 大阪)

- 5) 安田峯生, 安田以久, 隅田寛, 角崎英志, 井上稔, 津賀一弘, 赤川安正: ダイオキシン胎生期暴露のアカゲザル口蓋ヒダ形成への影響. 第43回日本先天異常学会学術集会要旨集, 119 (抄録), 2003. (第43回日本先天異常学会学術集会, 2003年7月2-4日, 大阪)
- 6) 隅田寛, 上塚翼, 安田峯生, 山下敬介, 角崎英志, 井上稔: 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肝細胞の形態解析. 環境ホルモン学会第6回研究発表会要旨集, 325 (抄録), 2003. (環境ホルモン学会第6回研究発表会, 2003年12月2-3日, 仙台)

H. 知的財産所有権の出願、登録状況 なし。

表1-1 アカゲザルの交配、分娩、生存状況 (F1a)

群	動物	交配日 (GD0)	分娩(流産)日	GD	性別	備考	F1死亡日	LD	2004/3/31日齢	備考
対照	1	1999/11/30	2000/5/9	161	♀				1422	
	2	1999/12/3	2000/5/18	167	♀				1413	
	3	1999/12/11	2000/5/30	171	♀		2001/8/26	453		F1死亡
	4	1999/12/11	2000/5/23	164	♂				1408	
	5	1999/12/14	2000/2/12	60		胎児死亡				
	6	1999/12/15	2000/6/3	171	♀				1397	
	7	1999/12/15	2000/5/7	144	♀				1424	
	8	1999/12/16	2000/1/25	40		胎児死亡				
	9	1999/12/17	2000/6/3	169	♀		2001/8/12	435		F1死亡
	10	1999/12/18	2000/5/12	146	♂	死産				
	11	1999/12/19	2000/5/21	154	♀				1410	
	12	1999/12/19	2000/5/31	164	♀				1400	
	13	1999/12/23	2000/5/27	156	♀	死産				
	15	1999/12/28	2000/6/10	165	♀		2002/6/3	723		F1死亡
	46	1999/12/31	2000/6/10	162	♀				1390	
	49	2000/1/1	2000/5/27	147	♂	死産				
	58	2000/1/11	2000/6/26	167	♀		2000/9/28	94		F1死亡
	61	2000/1/16	2000/6/17	153	♂		2004/1/5	1297		F1死亡
	62	2000/1/17	2000/7/6	171	♂				1364	
	63	2000/1/24	2000/7/6	164	♀				1364	
対照'	64	2000/1/29	2000/7/2	155	♂				1368	
	13'	1999/12/23	2000/5/21	150	♂				1410	
	49'	2000/1/29	2000/7/8	161	♀		2001/8/7	395		F1死亡
	30 ng/kg	1999/11/28	2000/5/15	169	♂		2003/3/25	1044		F1死亡
	17	1999/12/6	2000/5/4	150	♂	死産				
	18	1999/12/8	2000/5/26	170	♀				1405	
	19	1999/12/9	2000/5/13	156	♂				1418	
	20	1999/12/11	2000/5/22	163	♀	死産				
	21	1999/12/15	2000/5/22	159	♀				1409	
	22	1999/12/18	2000/5/30	164	♂				1401	
	23	1999/12/19	2000/6/3	167	♀				1397	
	24	1999/12/20	2000/5/26	158	♂		2000/11/1	159		F1死亡
	25	1999/12/22	2000/5/25	155	♂				1406	
	26	1999/12/22	2000/6/10	171	♀		2002/8/25	806		F1死亡
	27	1999/12/25	2000/6/17	175	♂				1383	
	28	1999/12/26	2000/6/1	158	♀	死産				
	29	1999/12/26	2000/5/31	157	♀	脱臍/死産				
	30	1999/12/28	2000/6/7	162	♀				1393	
	47	1999/12/31	2000/6/10	162	♂				1390	
	50	2000/1/2	2000/6/22	172	♀	死産				
	53	2000/1/4	2000/6/18	166	♂				1382	
	59	2000/1/11	2000/6/18	159	♀				1382	
	65	2000/3/3	2000/8/14	164	♀				1325	
	300 ng/kg	1999/11/28	2000/5/17	171	♀				1414	
	32	1999/11/30	2000/5/16	168	♂		2001/8/26	467		F1死亡
	33	1999/12/1	2000/4/29	150	♂				1432	
	34	1999/12/6	2000/4/12	128	♂	流産				
	35	1999/12/12	2000/5/22	162	♀				1409	
	37	1999/12/14	2000/5/26	164	♂	死産				
	38	1999/12/15	2000/5/27	164	♀		2001/7/26	425		F1死亡
	39	1999/12/18	2000/6/6	171	♂				1394	
	40	1999/12/19	2000/5/24	157	♀		2000/6/19	26		F1死亡
	41	1999/12/19	2000/5/10	143	♀		2001/7/6	422		F1死亡
	42	1999/12/20	2000/6/1	164	♀				1399	
	43	1999/12/23	2000/6/16	176	♂	死産				
	44	1999/12/25	2000/6/1	159	♂				1399	
	45	1999/12/27	2000/6/11	167	♀		2001/8/7	422		F1死亡
	51	2000/1/2	2000/6/22	172	♂		2001/8/2	406		F1死亡
	57	2000/1/9	2000/7/12	185	♂		2000/7/13	1		F1死亡
	60	2000/1/14	2000/6/26	164	♂				1374	
	66	2000/2/25	2000/8/15	172	♂				1324	
	67	2000/2/28	2000/4/8	40		流産				
	68	2000/3/1	2000/8/17	169	♂		2001/8/13	361		F1死亡
	101	2001/11/21	2001/12/18	27		流産				
	102	2001/11/27	2002/5/8	162	♂		2003/5/5	362		F1死亡
	103	2001/12/9	2002/5/31	173	♀	死産				母体切迫
	104	2001/12/11	2002/1/18	38		流産				
	105	2001/12/13	2002/1/12	30		流産				
	106	2001/12/15	2002/5/29	165	♀				672	
	107	2001/12/18	2002/1/14	27		流産				
	108	2001/12/20	2002/1/29	40		胎児死亡				
	109	2001/12/21	2002/6/7	168	♂				663	

2004/1/23

表1-2 アカゲザルの交配、分娩、生存状況 (F1b)

群	動物	交配日 (GD0)	分娩(流産)日	GD	性別	備考	F1死亡日	LD	2004/3/31日齢	備考	
対照	1b	2002/3/4	2002/8/17	166	♂		2003/8/17	365		F1死亡 母体死亡	2002/12/16
	2b	2002/2/5	2002/7/22	167	♀				618		
	3b	2001/11/29	2002/5/10	162	♀		2004/1/15	615		F1死亡	
	4b	2002/3/3	2002/8/18	168	♂				591		
	5b	2002/1/13	2002/2/13	31		流産					2004/1/10
	6b	不妊								母体剖検	
	7b	2001/12/8	2002/5/6	149	♂	死産					
	8b	不妊									
	9b	2002/1/31	2002/7/17	167	♀				623		2003/3/25 2004/2/25 2004/2/25
	10b	不妊									
	11b	2001/12/27	2002/6/13	168	♂				657	母体死亡	
	12b	不妊								母体剖検	
	15b	不妊								母体剖検	2003/11/21
	46b	2001/12/11	2002/5/24	164	♀				677		
	58b	不妊									
	61b	2002/1/25	2002/7/5	161	♀				635		
	62b	不妊									2002/1/5 2004/1/10
	63b	2002/2/2	2002/7/16	164	♀				624		
	64b	2002/2/4	2002/7/15	161	♀				625		
	13b	2001/12/5	2002/1/1	27		流産				母体死亡	
対照'	49b	2001/12/14	2002/6/2	170	♀		2003/9/16	471		F1死亡	2002/1/5 2004/1/10
30 ng/kg	16b	2001/12/23	2002/5/20	148	♀	死産					
	17b	不妊									
	18b	2001/12/11	2002/1/5	25						母体死亡	
	19b	不妊								母体剖検	2004/2/25 2004/2/25 2004/2/25
	20b	2001/12/12	2002/5/29	168	♀				672		
	21b	2002/1/21	2002/7/7	167	♂		2004/2/22	595		F1死亡	
	22b	2001/12/10	2002/1/4	25		流産					
	23b	2001/12/7	2002/5/18	162	♀		2004/1/24	616		F1切迫	2002/12/31
	24b	2001/12/31	2002/6/3	154	♂		2004/1/7	583		F1死亡	
	25b	2002/1/23	2002/7/7	165	♂				633		
	26b	2001/12/6	2002/5/23	168	♀				678		
	27b	2002/1/22	2002/7/12	171	♂		2004/3/17	614		F1死亡	2004/1/11
	28b	不妊								母体剖検	
	29b	不妊								母体剖検	
	30b	不妊								母体剖検	
	47b	2002/2/9	2002/7/13	154	♂				627		2004/1/10
	50b	2002/1/6	2002/6/23	168	♀				647		
	53b	2001/12/18	2002/5/27	160	♂	死産					
	59b	2002/1/4	2002/6/12	159	♀	死産				母体死亡	
	65b	2001/12/17	2002/6/3	168	♂		2004/1/17	593		F1死亡	2004/1/11
300 ng/kg	31b	2002/2/4	2002/7/15	161	♂		2004/1/2	536		F1死亡	
	32b	2001/12/13	2002/5/24	162	♂	死産				母体切迫	
	33b	2002/1/3	2002/6/6	154	♀				664		
	34b	不妊								母体剖検	2004/2/25
	35b	2002/1/25	2002/6/21	147	♀				649		
	37b	2001/12/3	2002/1/18	46		流産					
	38b	2002/1/19	2002/6/11	143	♂		2004/3/3	631		黄疸Bil↑, F1切迫	
	39b	2001/12/22	2002/6/9	169	♀				661		2004/1/10
	40b	不妊								母体剖検	
	41b	2002/2/21	2002/4/22	60		胎児死亡					
	42b	2001/12/10	2002/5/22	163	♂				679		
	43b	不妊									2004/2/25
	44b	2002/1/11	2002/6/24	164	♂				646		
	45b	2001/12/15	2002/6/2	169	♂				668		
	51b	2001/12/25	2002/6/16	173	♂				654		
	57b	不妊								母体剖検	2004/2/25
	60b	2002/1/16	2002/7/4	169	♂		2002/7/29	25		F1死亡	
	66b	2002/1/22	2002/6/14	143	♀	死産					
	67b	不妊									
	68b	2002/1/27	2002/7/15	169	♂				625		

厚生労働科学研究補助金(化学物質リスク研究事業)

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
アカゲザル歯形成への影響に関する研究

分担研究者 津賀 一弘 広島大学大学院医歯薬学総合研究科助教授
安田 峯生 広島国際大学保健医療学部教授
(研究協力者 安田 以久 広島大学大学院医歯薬学総合研究科学生)

研究要旨 ダイオキシン類への暴露は次世代の歯の形成に悪影響を及ぼすことがげっ歯類での実験やヒトでの疫学調査により明らかにされつつある。昨年度の研究で、胎生期に母体負荷量 300 ng/kg の TCDD に暴露された死産児あるいは生後死亡児の乳歯に異常がみられることが示されたが、本年度は死亡児の頭部を高分解能 X 線断層装置で観察し、異常を確認するとともに、異常児では歯の石灰化が遅延していることを見出した。また生存児の歯を X 線観察したところ、300 ng/kg では 50% の高頻度に永久歯の一部欠損が認められた。妊娠 80 日に採血して保存してあった母体血漿中の TCDD 濃度を測定したところ、濃度の高いものに児の歯異常が誘発されていたことが明らかになった。

A. 研究目的

歯はダイオキシン類の障害作用に感受性の高い器官とされている。形成中の歯に生じた異常は不可逆的な変化であり、暴露から長期間を経ても検出される。本研究の目的は胎生期・授乳期に TCDD 暴露を受けたアカゲザル児の歯を観察することにより、現行の TDI の妥当性を検討することである。

B. 研究方法

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 80 日に母体血約 20 ml を採取し、血漿を凍結保存した。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。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。この間に死産した児、あるいは生後死亡した乳児、対照群 4 例、30ng/kg 群

8 例、300 ng/kg 群 8 例について上下顎を切り出し、高分解能歯顎顔面用コーンビーム X 線コンピュータ断層装置 (CB MercuRay, 日立メディコテクノロジー) にて撮影、得られたデータを三次元像構築用コンピュータ・ソフトウェア (ExaVision LITE, ザイオソフト) で処理し、得られた画像により歯の形態を立体的に観察した。さらに、歯の石灰化を定量するため、データを三次元画像解析ソフトウェア (CBworks1.0, 日立メディコテクノロジー) で解析した。F1a 生存児については、生後約 1000 日、F1b 生存児については生後約 350 日に塩酸ケタミン 10 mg/kg を大腿部筋肉内に投与して軽く麻酔した後、口腔内を観察し、口腔内デジタルカメラ (クリスタル・カム II, GC) で撮影した。その後、携帯用 X 線発生装置 (KX-60, 朝日レントゲン) と電荷結合素子 (CCD) およびパーソナルコンピュータ・ソフトウェア (Gendex Visualix, Dentsply International, USA) を組み合わせて単純 X 線像を得た。母体血漿中の TCDD

は、クリーンアップ処理後、高分解能ガスクロマトグラフィー／高分解能質量分析法で分析した。

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

対照群死産児上顎の代表的な 1 例のコンピュータ断層再構築立体画像を図 1 に示す。再構築立体画像で軟組織をほとんど描出せず、硬組織でも歯を明瞭に示すような閾値を設定すると、図 1A 右下の像が得られる。標本の全体的な観察には MIP (Maximum Intensity Projection, 最強度投影像、図 1B) も有用である。これを自由に回転し、任意の方向から観察した。昨年度の単純 X 線観察で上顎乳中切歯欠損と診断された死産児 300 ng/kg 群 3G37a の所見を図 2 に示す。上顎では乳中切歯の欠損が確認され (図 2A～C)、下顎では左側乳中切歯切端が右側より舌側に偏位しているのが観察された (図 2D)。このような歯軸のわずかな傾斜は単純 X 線像では観察困難である。

三次元画像解析から求められた石灰化体積を各個体について算出し、受精後日齢と石灰化体積の関係を上下顎別に散布図としてまとめた結果を図 3 に示す。受精後日齢の増加とともに石灰化体積は直線的に増加する傾向を示し、回帰直線は 3 群ともほぼ同じであった (図 3A, C)。対照群と 30 ng/kg 群の点は回帰直線に近く分布し (図 3A, C)、確率楕円も細長い形である (図 3B, D)。しかし、300 ng/kg 群では回帰直線から離れた点が多く、特に形態的異常を示す 3 症例の点は上顎ではすべて回帰直線の下方に分

布し、受精後日齢の割に石灰化が進行していないことを示していた (図 3A)。これに伴い、確率楕円も円に近い形である。下顎では症例 37a の点が回帰直線近くに位置し、正常に近い石灰化を示しており、石灰化の遅延していた上顎とは異なっていた。

生存 F1 の単純 X 線観察により診断された歯の異常所見を表 1 に示す。上顎永久側切歯の欠損がほとんどで、その他に下顎永久中切歯の欠損、下顎永久第 2 臼歯の欠損または形成遅延が認められた。また、生後 380 日に観察されたものには上顎乳中切歯の欠損があった。代表的な生存児前歯部の対照および異常 X 線像を図 4 に示す。生後 1000 日余ではまだ乳歯がかなり残っているが、未萌出の永久歯の異常も診断可能である。

死亡児と生存児の歯異常の頻度を表 2 にまとめて示す。異常は F1a の 300 ng/kg 群に限って認められ、生存児では半数が異常であった。

対照群 5 例、30 ng/kg 群 4 例、300 ng/kg 群 14 例の妊娠 80 日における母体血漿中の TCDD 濃度を測定したところ、対照群では TCDD 濃度はいずれも検出限界以下であった。30 ng/kg 群では 0.19～0.21 pg/g とほぼ同じ濃度であったが、300 ng/kg 群では 1.1～8.7 pg/g と濃度にかかなりのばらつきが認められた。TCDD 濃度 2.0 pg/g 以下の母体の児 3 例中に歯の異常を持つ児はなかった。一方、2.1～4.0 pg/g の母体 4 例中歯の異常を持つ児は 1 例であったが、4.1 pg/g 以上の母体 4 例からの児では全例に異常があるなど、母体血漿中の TCDD 濃度依存的に児の歯の異常頻度は上昇していた (図 5)。

D. 考察

本研究の F1 児は乳歯原基形成前か

ら少なくとも永久歯胚形成期まで TCDD に暴露され続けたことになる。従って、本研究で認められた歯の異常が TCDD によるものであるとの推定は、児の発生段階の点からは無理はない。また、歯の異常が 300 ng/kg のみに発現し、対照群と 30 ng/kg では見られなかったこと、300ng/kg 群でも妊娠 80 日の母体血漿中 TCDD 濃度の高かった例に多かったことなどから、TCDD 暴露と児の歯の異常との間に関係があることには疑う余地はない。

げっ歯類では TCDD への胎生期、授乳期暴露による歯形成異常が報告されている。ヒトの疫学調査でもダイオキシン類への暴露と歯の異常の関連を示唆する報告がなされている。サルでも同様の所見が得られたことは、歯がダイオキシンの発生毒性に対して感受性の高い標的であることを示している。永久歯未萌出の F1b 生存児では歯の異常は認められていないが、今後追跡の必要がある。

E. 結論

TCDD の 300 ng/kg 胎生期・授乳期暴露は高率にアカゲザル児の歯形成異常を誘発した。しかし、30 ng/kg 負荷ではこのような影響は認められなかった。現在のわが国での TDI 設定の基礎となったげっ歯類での TCDD の LOAEL 体内負荷量 86 ng/kg はこの中間にあり、本研究結果からは現行 TDI 4 pg/kg は妥当なものと考えられる。

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, Inouye M, Tsuga K, Akagawa Y: Effect of *in utero* and

lactational exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin on tooth development in rhesus monkeys. Organohalogen Compounds, 64, 431-434, 2003.

2. 学会発表

- 1) Yasuda I, Yasuda M, Sumida H, Tsusaki H, Inouye M, Tsuga K, Akagawa Y: Effect of *in utero* and lactational exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin on tooth development in rhesus monkeys. Organohalogen Compounds, 64, 431-434 (Short paper), 2003. (23rd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, August 24-29, 2003, Boston, USA)
- 2) 安田以久, 安田峯生, 隅田寛, 角崎英志, 井上稔, 津賀一弘, 赤川安正: ダイオキシン胎生期暴露のアカゲザル歯形成への影響. 第 43 回日本先天異常学会学術集要旨集, 118 (抄録), 2003. (第 43 回日本先天異常学会学術集会, 2003 年 7 月 2-4 日, 大阪)
- 3) 安田峯生, 安田以久, 隅田寛, 角崎英志, 井上稔, 津賀一弘, 赤川安正: ダイオキシン胎生期暴露のアカゲザル口蓋ヒダ形成への影響. 第 43 回日本先天異常学会学術集要旨集, 119 (抄録), 2003. (第 43 回日本先天異常学会学術集会, 2003 年 7 月 2-4 日, 大阪)

H. 知的財産所有権の出願状況

なし。

表1 生存サル観察個体とその所見

300 ng/kg 群

番号	性別	生後日齢	異常所見	発生率
31a	♀	1122	<u>2</u> <u>2</u> 欠損	5/10
33a	♂	1141		
35a	♀	1117		
39a	♂	1112	<u>2</u> <u>2</u> 欠損	
42a	♀	1107		
44a	♂	1107		
60a	♂	1080	<u>2</u> <u>2</u> 欠損 <u>5</u> <u>5</u> 欠損または形成遅延	
66a	♂	1030	<u>2</u> <u>2</u> <u>1</u> <u>1</u> 欠損	
106a*	♀	380	<u>A</u> <u>A</u> 欠損	
109a*	♂	371		
31b	♂	332		0
33b	♀	372		
35b	♀	357		
38b	♂	367		
39b	♀	369		
42b	♂	387		
44b	♂	354		
45b	♂	376		
51b	♂	362		
68b	♂	332		

* 新規追加

表2 歯形成異常頻度

群	死産と生後死亡児数			生存児数		
	観察児数	歯異常児数	%	観察児数	歯異常児数	%
F1a						
対照群	4	0	0	13	0	0
30 ng/kg	5	0	0	12	0	0
300 ng/kg	8	3	38	8	4	50
300 ng/kg*	2	0	0	2	1	50
F1b						
対照群	2	0	0	11	0	0
30 ng/kg	3	0	0	10	0	0
300 ng/kg	2	0	0	10	0	0

* 新規追加

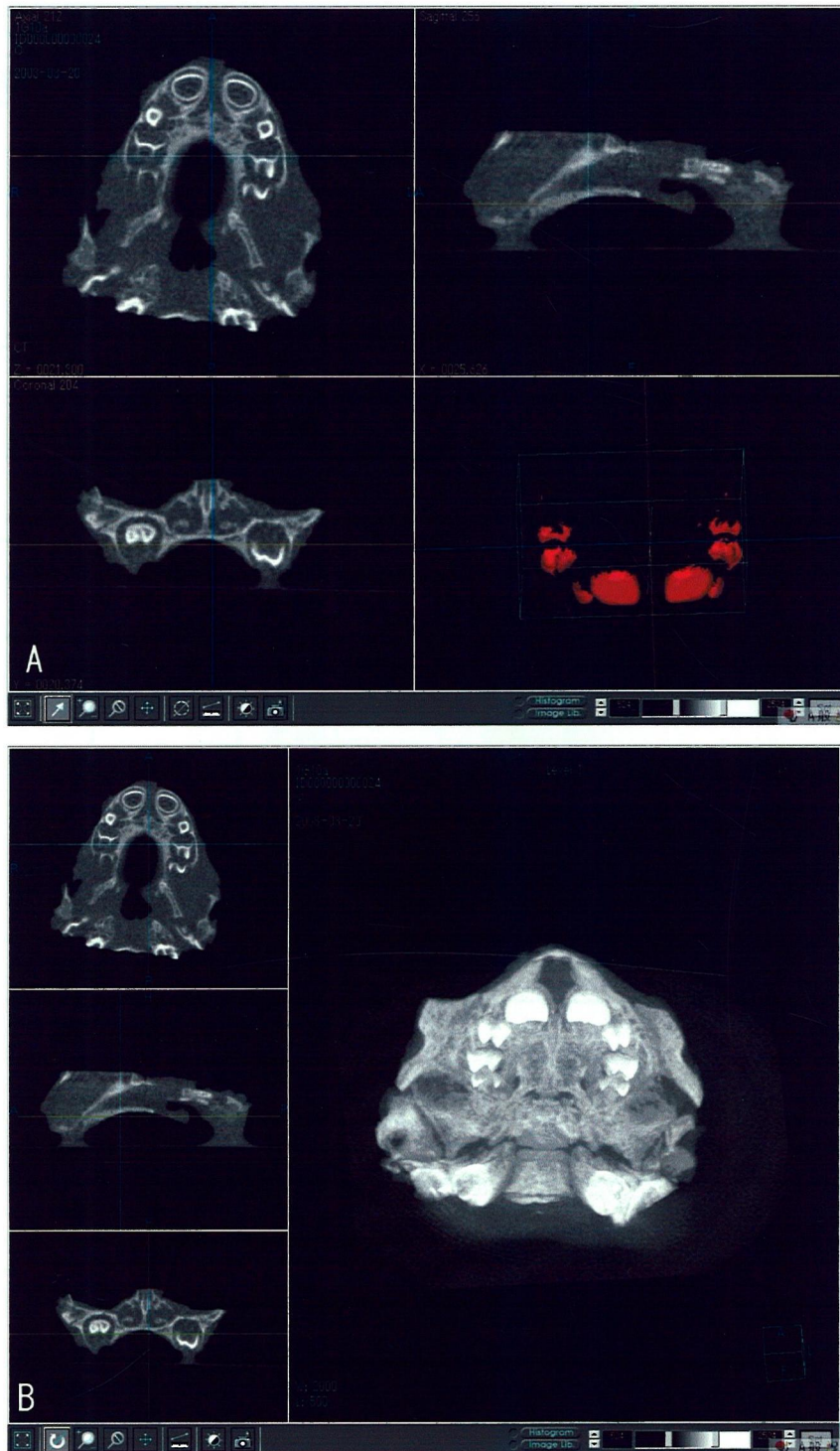
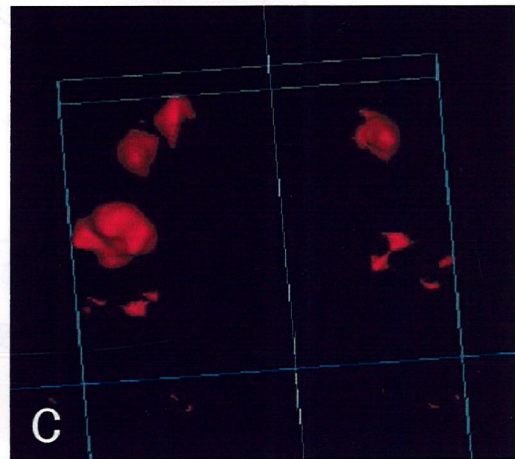
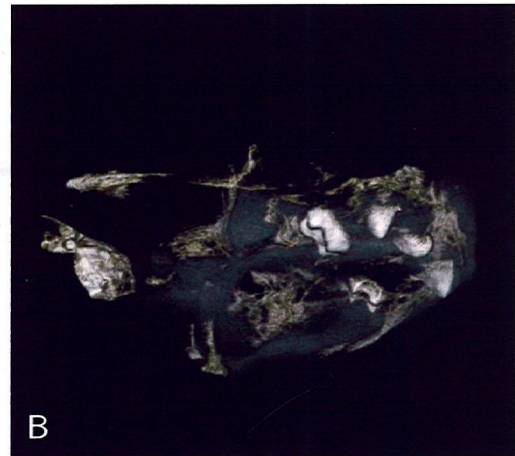
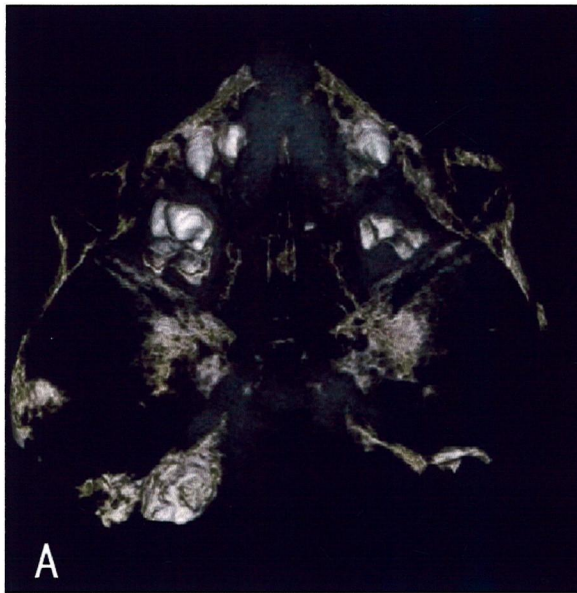


図1 コンピュータ断層造影装置による観察手順

A : 歯の部分のサーフェイス表示

B : 標本全体の MIP

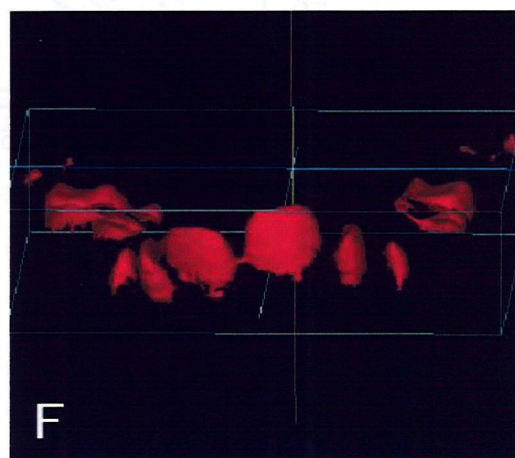


3G37a 300 ng/kg 群, 上顎

A : 下面

B : 右斜下側面

C : 石灰化表面 (surface), 下面



3G37a 300 ng/kg 群, 下顎

D : 上面

E : 右斜上側面

F : 石灰化表面 (surface), 前面

図2 コンピュータ断層再構築画像

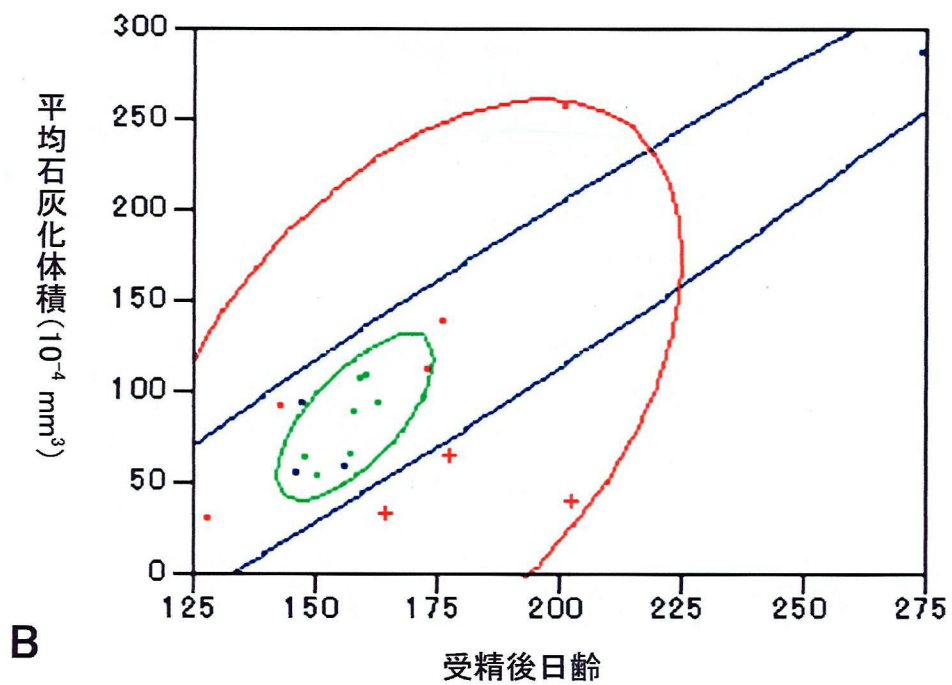
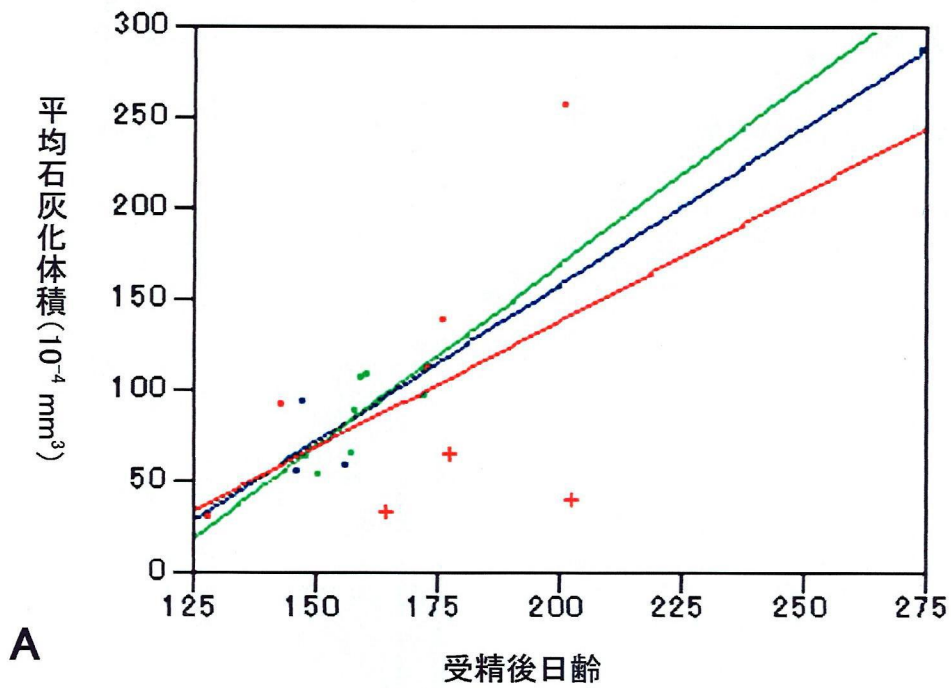


図3 受精後日齢と上顎歯の石灰化体積 (Volume)

A: 回帰直線 B: 90%確率楕円

青: 対照群 緑: 30 ng/kg 群 赤: 300 ng/kg 群 +: 異常例

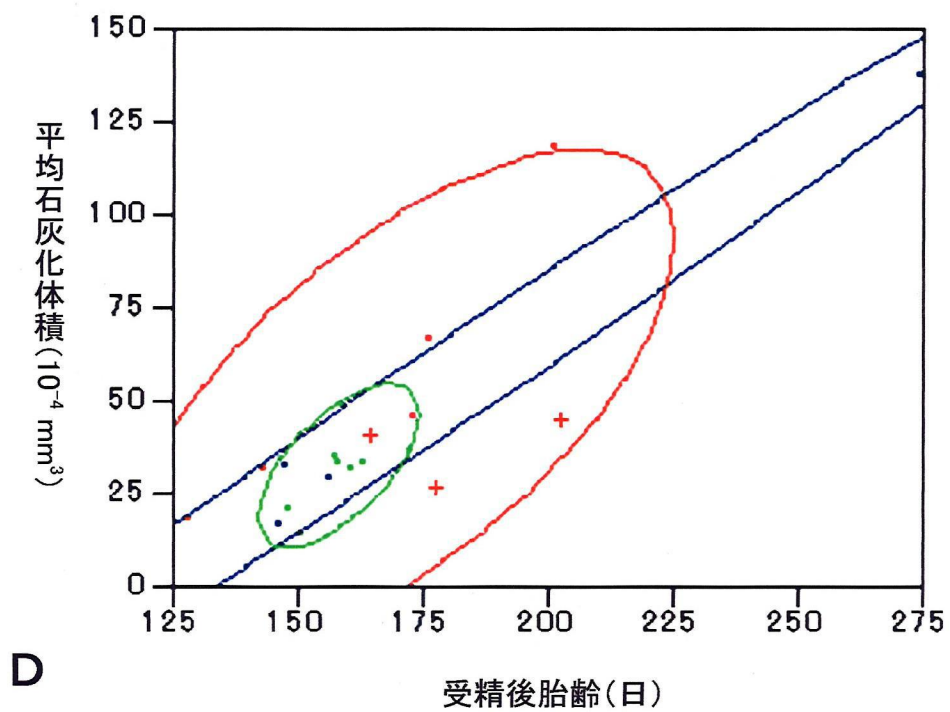
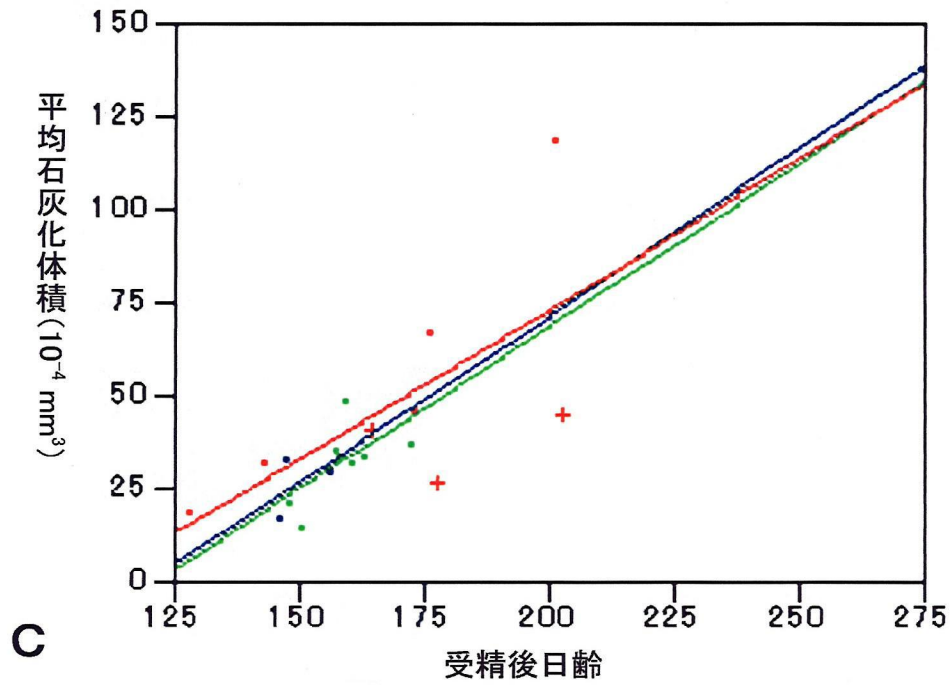


図3 (続き) 受精後日齢と上顎歯の石灰化体積 (Volume)

A : 回帰直線 B : 90%確率楕円

青 : 対照群 緑 : 30 ng/kg 群 赤 : 300 ng/kg 群 + : 異常例



対照群 01a 上顎右側
(1049)



対照群 01a 上顎左側
(1049)

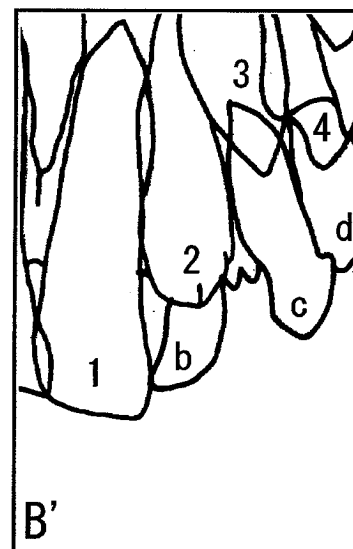
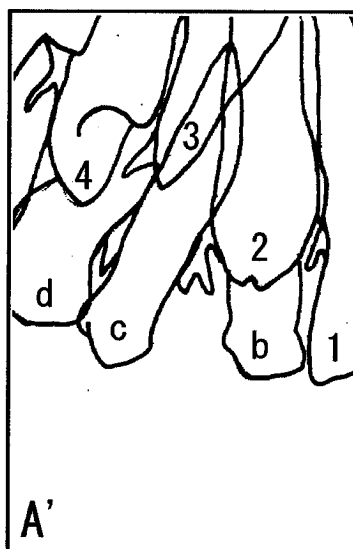


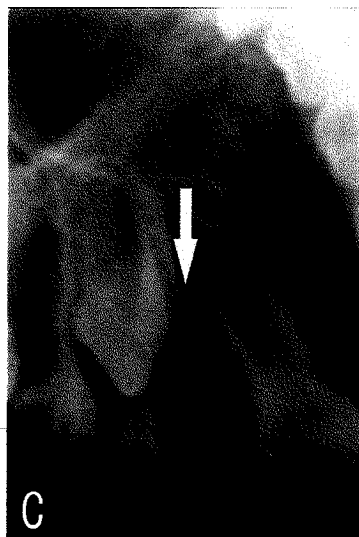
図4 生存児の対照および異常X線所見とその線描

上段：X線像 下段：その線描

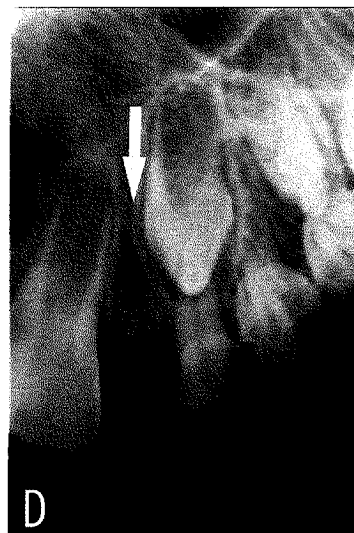
X線像の下に群，個体番号，（ ）内に日齢を記す。矢印は欠損を示す。

線描のアルファベット小文字は乳歯 a：第1乳切歯，b：第2乳切歯，c：乳犬歯，
d：第1乳臼歯，e：第2乳臼歯

アラビア数字は永久歯 1：第1切歯，2：第2切歯，3：犬歯，4：第1小臼歯，
5：第2小臼歯，6：第1大臼歯



300 ng/kg 群 31a 上顎右側
(1041)



300 ng/kg 群 31a 上顎左側
(1041)

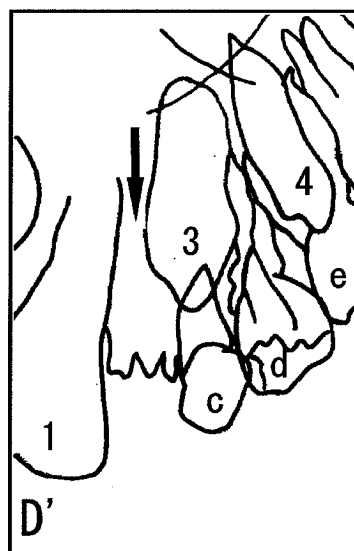
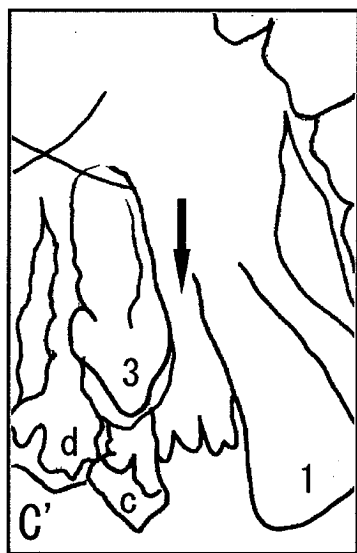


図4 生存児の対照および異常X線所見とその線描（続き）

矢印：上顎第2切歯欠損部

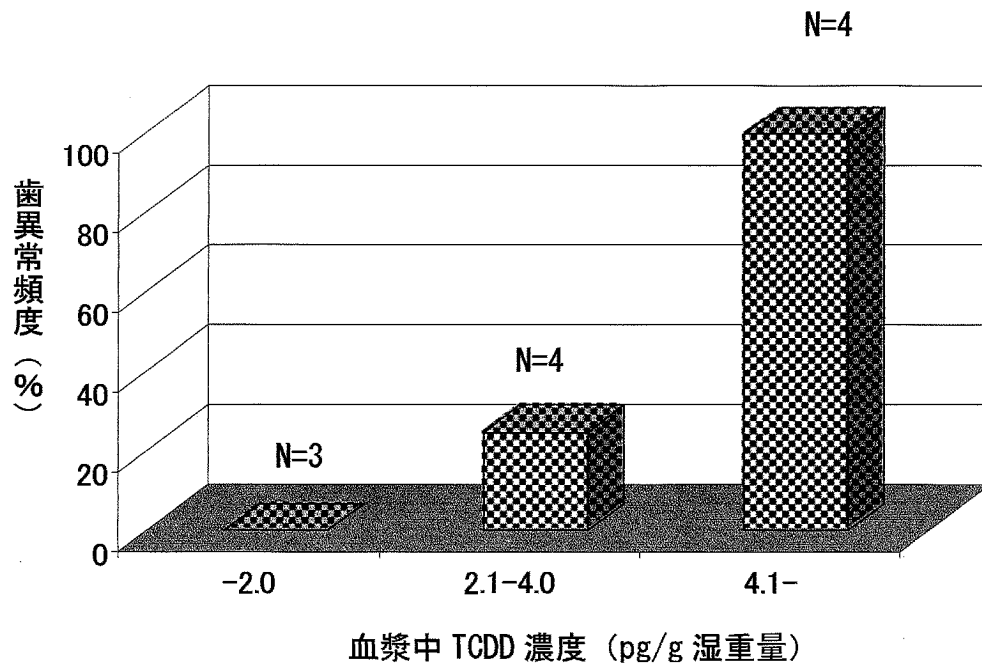


図5 母体血漿中 TCDD 濃度と歯異常の関係

TCDD 濃度 2.0 pg/g 以下の 3 例では歯異常なし，2.1-4.0 pg/g の 4 例では 1 例，4.1 pg/g 以上の 4 例では全例に歯異常と，濃度と反応に関連が認められる。

分担研究者 広島大学医学部総合薬学科 教務員 杉原数美

ダイオキシン(TCDD)は体内で Ah receptor(AhR)と結合して多様な作用を発現するが、中でも肝薬物代謝酵素が著しく誘導されることが知られている。肝薬物代謝酵素のうち CYP1A1/2 誘導は数 pg/kg の TCDD 投与でも観察することが可能なことより、TCDD 暴露の指標とされている。本研究では、妊娠時 TCDD 投与を受けたサル F0 個体で、蓄積 TCDD の影響として CYP1A1/2 活性を調べたが 0, 30 および 300 ng/kg 各投与群で有意な差は観察されなかった。これは投与後 5 年を経過したため、TCDD が代謝排泄され体内濃度が薬物代謝酵素誘導の検出限界以下になっていたためと考えられる。

A. 研究目的

サルを用いた TCDD の生体影響調査として、妊娠時 TCDD 投与を受けた F0 個体での肝薬物代謝酵素活性の比較を行った。げっ歯類を用いた研究では、TCDD による薬物代謝酵素誘導は発現が早く、暴露 1 日後には活性上昇が観察され、誘導能は投与量に相関することが知られている。さらに、TCDD は脂肪組織や肝組織中に長期残存し、誘導も長期間継続するため薬物代謝酵素活性を TCDD 体内残存のおおまかな指標とすることも可能と考えられる。そこで、本研究では TCDD によって著しい酵素誘導を受ける CYP1A1/2 および、研究分担者が TCDD による誘導を見出したキサンチン酸化酵素(XO)活性を測定することにより、妊娠時 TCDD 暴露サルの 5 年経過後の時点での TCDD による生体影響を予測する。

B. 研究方法

1999 年 12 月-1 月に TCDD を 0(vehicle), 30 および 300 ng/kg 皮下投与、その後、妊娠期間中 30 日毎に初回投与量の 5 %を維持量として追加投与された F0 メスアカゲザルの

肝を 2004 年 2 月に採取、液体窒素にて凍結保存。解凍後、肝より常法に従いミクロゾーム(Ms)およびサイトソール(Cs)画分を調製し、薬物代謝酵素活性を測定した。CYP1A1 活性として ethoxyresorufin-O-dealkylase (EROD)、CYP1A2 として methoxyresorufin-O-dealkylase (MROD)を蛍光光度計で測定した。また、キサンチン酸化酵素活性(XO)は 1-methylxanthine を基質として、酸化生成物 1-methyluric acid を HPLC で測定した。

C. 研究結果

Vehicle3 匹、30 ng/kg 投与群 4 匹、300 ng/kg 投与群 3 匹での、肝 Ms の EROD, MROD 活性および肝サイトソールの XO 活性を測定し、各個体での測定値を Table 1 (A)に、各群での平均±S.D. 値を Table 1 (B)に示した。各活性とも、個体間でのばらつきが多少認められたが、各群での有意な差は認められなかった。個体番号 12 は、どの酵素活性も著しく低く、何らかの生体異常があった可能性が考えられる。

D. 考察

肝薬物代謝酵素の誘導は TCDD による AhR を介する作用としてよく知られている。マウスを用いた実験で、この誘導作用は TCDD の投与量に相関して高くなり、長期間誘導が継続し、TCDD の体内濃度を反映することが知られている。本研究では、約5年前に TCDD 投与されたサル肝の薬物代謝酵素活性を調べた。結果、vehicle および各投与群での有意な差が認められず、現時点での TCDD による誘導作用は検出限界以下であった。これは、TCDD が僅かずつだが代謝排泄され、体内濃度が低下していることを示していると考えられる。

E. 結論

サルでの TCDD による肝薬物代謝酵素誘導を暴露5年後の個体で調査したところ、ほとんど観察されなかった。これは TCDD がわずかながらも代謝排泄を受け、体内濃度が低下し、酵素誘導の検出限界以下になったためと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) S. Sanoh, S. Kitamura, K. Sugihara, N. Fujimoto and S. Ohta
Estrogenic Activity of Stilbene Derivatives. *Journal of Health Science*, 49(5), 359-367 (2003).
- 2) S. Kitamura, S. Sanoh, R. Kohta, T. Suzuki, K. Sugihara, N. Fujimoto and S. Ohta
Metabolic activation of proestrogenic diphenyl and related compounds by rat liver microsomes. *Journal of Health Science*, 49(4), 298-310 (2003).
- 3) Fujimoto, S. Kitamura, S. Sanoh, K. Sugihara, S. Yoshihara, N. Fujimoto and S. Ohta
Estrogenic Activity of an Environmental Pollutant, 2-Nitrofluorene, after Metabolic Activation by Rat Liver Microsomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 303, 419-426 (2003)..
- 4) S. Kitamura, M. Ohmegi, S. Sanoh, K. Sugihara, S. Yoshihara, N. Fujimoto and S. Ohta
Estrogenic Activity of Styrene Oligomers after Metabolic Activation by Rat Liver Microsomes. *Environmental Health Perspectives*, 111(3), 329-334 (2003).
- 5) S. Sanoh, S. Kitamura, K. Sugihara and S. Ohta,
Cytochrome P450 1A1/2 Mediated Metabolism of *trans*-Stilbene in Rats and Humans. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25(3), 397-400 (2002).
- 6) S. Kitamura, S. Sanoh, M. Ohmegi, T. Fujimoto, Y. Kohno, K. Sugihara, N. Fujimoto and S. Ohta,
Metabolic Activation of Proestrogens by Rat Liver Microsomes. *Environmental Sciences*, 9(2&3), 98 (2002).
- 7) K. Sugihara, T. Yamada, S. Kitamura, S. Ohta, K. Yamashita, S. Okamura, M. Yasuda, Y. Fujii-Kuriyama, K. Saeki, S. Matsui and T. Matuda,
AhR-mediated Induction of Drug-Metabolizing enzymes by Indirubin and Indigo. *Environmental Sciences*, 9(2&3), 133 (2002).
- 8) S. Sanoh, K. Sugihara, S. Kitamura, S. Yoshihara, N. Fujimoto, H. Watanabe and S. Ohta,
Structure-Activity Relationship and Effects of Estrogenic Stilbenes on Reproductive Organs. *Environmental Sciences*, 9(2&3), 134 (2002).
- 9) T. Fujimoto, S. Kitamura, K. Sugihara, S. Sanoh, S. Yoshihara and S. Ohta,
Metabolic Activation of Proestrogen, 2-Nitrofluorene.

Environmental Sciences, 9(2&3),
135 (2002).

2. 学会発表

- 1) DIOXIN2003 August 24-29. 2003
Boston, USA

©K. Sugihara, S. Kitamura, S.
Ohta,, S. Okamura, K. Yamashita,
M. Yasuda, S. Matsui and T.
Matsuda, Metabolism of
indirubin and indigo, endogenous
aryl hydrocarbon receptor ligand
candidates, and competitive
effect with respect to
2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-di
oxin (TCDD). *Organohalogen
Compounds*, 65, 134-137 (2003)

- 2) 第76回 日本生化学会大会 2003
年10月15-18日

Kazumi Sugihara, Shigeyuki
Kitamura, Takashige Okayama,
Shigeru Ohta, Keisuke Yamashita,
Mineo Yasuda, Ken'ich Saeki,
Saburo Matsui and Tomonari
Matsuda

Aryl Hydrocarbon
Receptor-Mediated Induction of

Microsomal Drug-Metabolizing
Enzyme Activity by Indirubin and
Indigo

- 3) 第18回 日本薬物動態学会 2003
年10月8-10日

AhR 内在性リガンド候補インディル
ビンの in vivo での誘導と代謝
北村 繁幸, 岡山 幸誠, 原田 亜紀
子, 杉原 数美, 太田 茂

- 4) 第6回環境ホルモン学会 2003 年
12月2-3日

Indirubin の生体内代謝と AhR 結合
活性の変動

杉原数美¹⁾、北村繁幸¹⁾、岡山幸剛¹⁾、
太田 茂¹⁾、山下敬介¹⁾、岡村
さおり¹⁾、安田峯生²⁾、佐伯憲一³⁾、
松井三郎⁴⁾、松田知成⁴⁾、関澤 純⁶⁾

1) 広島大・医歯薬、2) 広島国際大・
保健医療、3) 筑波大・先端、4) 名
古屋市大・5) 京都大院・工 6) 徳
島大・総合科学
講演要旨集 p228

Table 1 サルF0個体の肝薬物代謝酵素活性

(A) 各検体のEROD, MRODおよびキサンチン酸化酵素活性

sample No.	TCDD ng/kg	EROD pmol/min/mg protein	MROD pmol/min/mg protein	Xanthine oxidase nmol/min/mg protein
6	0	264.67	175.31	0.87
12	0	103.41	34.03	0.26
15	0	215.36	101.65	1.11
19	30	258.96	111.93	0.54
28	30	320.24	100.58	0.60
29	30	354.40	135.12	0.88
30	30	204.93	77.16	0.60
34	300	202.29	111.22	1.14
40	300	163.32	80.27	1.04
57	300	276.08	123.05	0.93

(B) 各群の平均値±S. D.

TCDD ng/kg	EROD pmol/min/mg protein	MROD pmol/min/mg protein	Xanthine oxidase nmol/min/mg protein
Vehicle	194.5±82.6	103.7±82.6	0.75±0.44
30	284.6±66.2	106.2±24.1	0.65±0.15
300	213.9±57.3	104.8±22.1	1.04±0.10

厚生労働科学研究補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書
ダイオキシン暴露によるアカゲザル免疫系への影響に関する研究

分担研究者 隅田 寛 広島国際大学保健医療学部教授
浅岡 一雄 京都大学霊長類研究所助手
(研究協力者 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に影響を及ぼすことが知られている。本研究では、妊娠中にダイオキシン (TCDD) 投与を受けたサル F0 個体から最終投与後約 600 日に採血して、白血球数とその分画数を調べた。また、リンパ球については表面抗原 (CD3、4、8、20) の陽性細胞の割合をフローサイトメーターで解析した。その結果、TCDD 暴露群では白血球数、CD3⁺CD4⁺細胞 (CD4⁺T 細胞) 数、CD20⁺細胞 (B 細胞) 数が、対照群と比較して減少している傾向が見られた。また、一部の F0 を剖検し、胸腺を組織学的に観察したところ、皮質と髄質の境界が不明瞭になっているなどの異常所見を示すものがあった。

A. 研究目的

ダイオキシン類は胸腺萎縮を誘発するなど、免疫系に悪影響を及ぼすことが知られている。本研究では次年度に胎生期・授乳期に TCDD 暴露を受けた F1 世代の免疫機能を精査する計画であるが、F0 の一部を屠殺し、剖検することとなったので、予備的な実験として、F0 世代の血液と胸腺を検索した。

B. 研究方法

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。TCDD の最終投与後約 600 日に母体から末梢血を採取し、白血球数および白血球のそれぞれの分画数を計測した。また、リンパ球については表面抗原 (CD3、4、8、20) の

陽性細胞の割合をフローサイトメーターで解析した。一部の F0 については剖検時に胸腺を採取し、パラフィン包埋ヘマトキシリン・エオシン染色標本を作り、光学顕微鏡で観察した。

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

対照群 10 例、30 ng/kg 群 10 例、300 ng/kg 群 12 例について血液を解析した。各群の総白血球数および分画白血球数を表 1 に示す。対照群に比べて TCDD 暴露群では白血球数とくにリンパ球数が少ない傾向が見られたが、差は有意ではなく、用量反応関係も認められなかった。各群のリンパ球サブセット数を表 2 に示す。TCDD 暴露群では CD3⁺CD4⁺細胞 (CD4⁺T 細胞) 数や CD20⁺細胞 (B 細胞) 数が、対照群と比較して減少している傾向が見られた。一部の F0 については剖検し、胸腺を組織学的に観察したが皮質と髄質の境界が不明瞭になっているなどの異

常所見を示すものがあった。

D. 考察

今回観察したアカゲザルは、TCDD の最終投与からかなりの時間を経っており、TCDD の成体の免疫系に対する影響が可逆的なものであれば、継続暴露中に受けた影響が観察されなくても不思議はない。しかし、一部の母体の胸腺の組織像に異常が認められたことは、TCDD が成体胸腺組織に不可逆的な影響を及ぼした可能性を示唆している。TCDD 暴露群で T 細胞サブセットの一部について細胞数が対照群より少ない傾向にあったが、これも胸腺への影響の結果によるものかも知れない。妊娠中の母体にとっては本来異物であるはずの胎仔が存在するにも関わらず妊娠が維持されるのは、T 細胞や NK 細胞が免疫反応を調節するからであると言われている。NK 細胞は T 細胞によって制御されており、このサブセットの減少が母ザルの妊娠の維持に影響を与えるという考え方もある。妊娠サルに TCDD を投与すると流産が多発したとの報告があるが、このようなメカニズムがはたらいたのかもしれない。

TCDD を投与された母ザルは B 細胞数や白血球数が対照群より少ない傾向にあった。B 細胞が産生する IgG は胎盤を通過する。また、初乳には分泌型 IgA や白血球が含まれており、免疫力の低い新生児に対してそれを補うものと考えられている。母ザルの B 細胞数や白血球数の減少は、仔の免疫

力の低下、引いては胎仔・新生児期における免疫力の低下を導く可能性がある。母ザルが病気になりやすくなり、育仔が困難になるという状態も考えられる。

母ザルの免疫系に異常があった場合の児への長期的影響については未だ不明な点が多い。母ザルの免疫系だけではなく、児の免疫系について合わせて検討してゆくことは、広く免疫系の疾患に対する研究にも寄与すると考えられる。

今回の予備的な実験で、F1 児についても血液を材料に免疫系の検索を行う目処がついたので、平成 16 年度にはさらに研究を展開する予定である。

E. 結論

妊娠・哺乳アカゲザルに TCDD を負荷し、最終投与から約 600 日後に採血して白血球を調べたところ、TCDD 暴露群では白血球数、T 細胞サブセットの一部の細胞数が対照群より少ない傾向が見られた。この所見の意義については、今後さらに検討する必要がある。

F. 健康危惧情報

なし。

G. 研究発表

なし。

表 1 白血球分画数 (x1,000/ μ l)

0 ng/kg 群	総白血球数	好中球	リンパ球	単球	好酸球	好塩基球	大不染色細胞
平均	9.89	3.44	4.94	0.45	0.85	0.03	0.19
標準偏差	3.31	1.27	1.28	0.14	1.20	0.02	0.18

30 ng/kg 群	総白血球数	好中球	リンパ球	単球	好酸球	好塩基球	大不染色細胞
平均	7.59	2.93	3.77	0.32	0.47	0.02	0.09
標準偏差	2.41	0.89	1.56	0.08	0.73	0.01	0.04

300 ng/kg 群	総白血球数	好中球	リンパ球	単球	好酸球	好塩基球	大不染色細胞
平均	8.45	3.82	3.80	0.34	0.39	0.02	0.09
標準偏差	2.89	1.75	1.64	0.10	0.39	0.01	0.04

表 2 リンパ球サブセット数(血球数は x1,000/ μ l、割合は%)

		CD3+		CD3+CD8+		CD3+CD4+		CD20		CD3-CD8+	
0 ng/kg 群	リンパ球数	割合	細胞数	割合	細胞数	割合	細胞数	割合	細胞数	割合	細胞数
平均	4.94	74.6	3.67	38.7	1.44	52.9	1.92	16	0.81	9.83	0.35
標準偏差	1.28	9.28	1.01	7.51	0.52	7.32	0.56	9.96	0.58	5.79	0.23

		CD3+		CD3+CD8+		CD3+CD4+		CD20		CD3-CD8+	
30 ng/kg 群	リンパ球数	割合	細胞数	割合	細胞数	割合	細胞数	割合	細胞数	割合	細胞数
平均	3.77	72.3	2.75	44.8	1.28	45.7	1.22	14.4	0.58	14	0.32
標準偏差	1.56	10.1	1.19	8	0.64	7.81	0.52	6.97	0.5	9.67	0.2

		CD3+		CD3+CD8+		CD3+CD4+		CD20		CD3-CD8+	
300 ng/kg 群	リンパ球数	割合	細胞数	割合	細胞数	割合	細胞数	割合	細胞数	割合	細胞数
平均	3.8	73.7	2.84	38	1.06	55.1	1.58	12.5	0.49	12	0.27
標準偏差	1.64	11.2	1.48	6.47	0.55	7.43	0.89	6.34	0.35	9.1	0.14

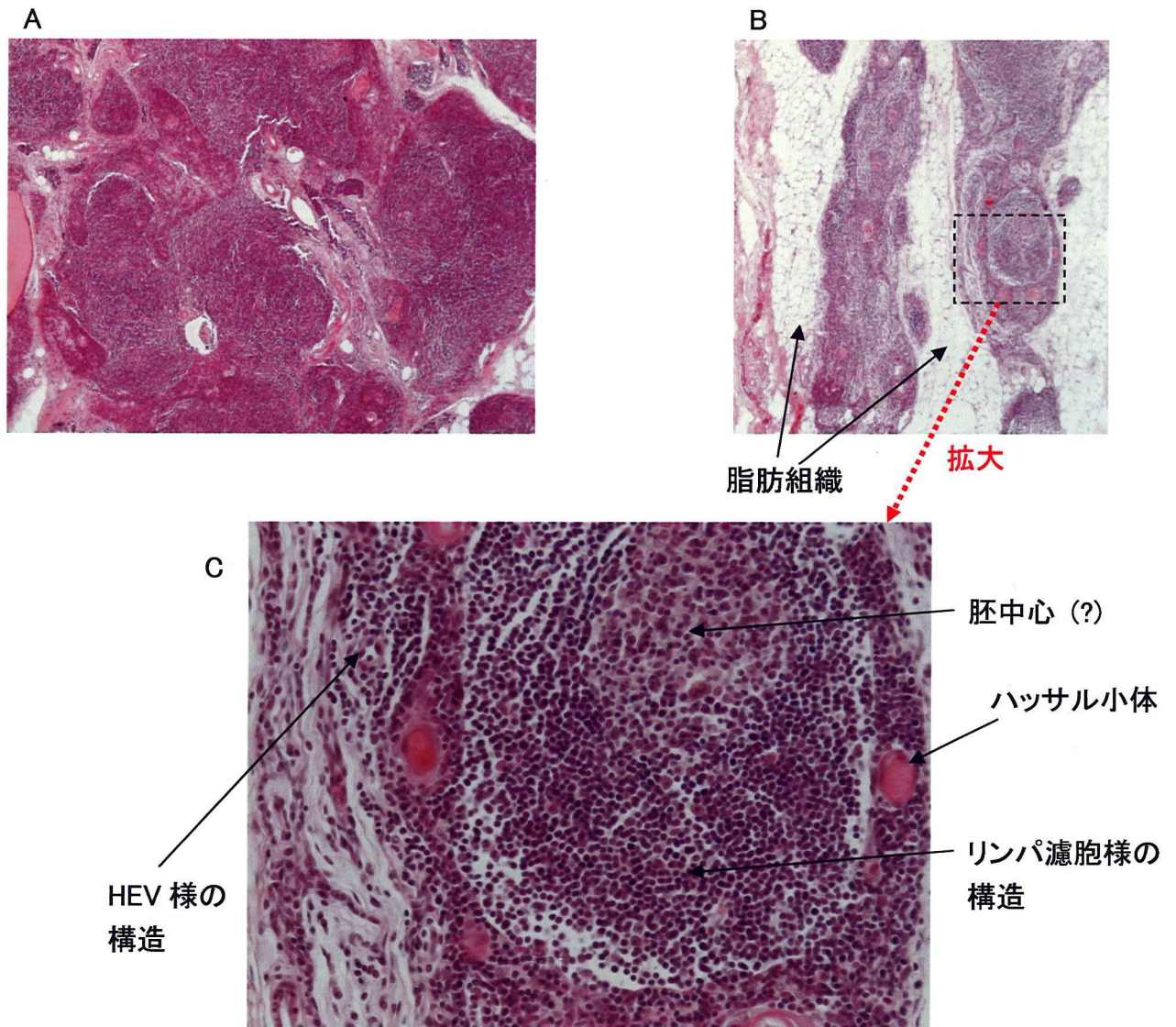


図1 300 ng/kg の1例 (No. 57) の胸腺の組織像

- (1) ハッサル小体は散見されるが(B、C)、皮質・髄質の構築は崩れており、皮髄の境界部は鮮明でない(A、B)。
- (2) 胚中心を持つリンパ濾胞様の構造が見られる(B、C)。
- (3) 高内皮細静脈 HEV と考えられる特殊な血管が見られる(C)。
- (4) 脂肪化(退縮)した部分が見られる(B)。

2,3,7,8-四塩化ジベンゾパラジオキシン (TCDD) の
胎生・授乳期暴露による腎線維化に関する研究

分担研究者 隅田 寛 広島国際大学保健医療学部教授
山下 敬介 広島大学大学院医歯薬総合研究科助教授

研究要旨： 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 を妊娠 20 日のアカゲザルに 300 ng/kg 皮下投与した。対照には溶媒のみを同様に投与した。その後 30 日毎に初回投与量の 5 %を維持量として投与して、その児の腎発生にあたえる影響を調べた。TCDD 暴露を受けた児で生後死亡した 2 例 (死亡日齢生後 406 日) と (死亡日齢生後 425 日) の腎臓について異形成が認められた。異形成腎の組織切片標本についてコラーゲン線維の特異的染色であるピクリシリウス赤染色を行い、線維化の程度を検討した。

その結果、異形成腎はコラーゲン増殖が著しく、線維化をおこしていると考えられた。コラーゲン増殖は尿細管周囲、あるいは血管外膜に顕著であったが、1 例についてはほとんどの腎小体と尿細管が間質に置換されている部が認められた。また、異形成腎では、いくつかの血管の内膜の肥厚が著しく、ほとんど内腔が閉塞している血管も観察された。以上の結果より TCDD 300 ng/kg の母体負荷は児の腎発生に何らかの悪影響を及ぼしていることが示唆された。

A. 研究目的

人体に生殖機能の低下や発ガン等の影響を及ぼすとされるダイオキシン類の毒性発現は一日当りの暴露量より、血中濃度や体内負荷量に依存するといわれる。母親の体内に蓄積されたダイオキシン類は胎児へ移行する。また母乳中に分泌されるので乳汁を通して児に移行する。現在、わが国におけるヒトのダイオキシン類の耐容一日摂取量 (TDI) は 4 pg/kg とされている。この値は胎生期に TCDD の暴露を受けたラットの実験から算定したものである。ところ

が、ダイオキシン類の生体内半減期は、齧歯類とヒトでは大きく異なるものと考えられ、齧歯類のデータを単純にヒトに応用することができるかどうか検討の余地がある。本研究の目的は、長期間、微量のダイオキシン類の暴露を受けた霊長類を使用し、長期的スパンの見地から次世代への影響を調べることである。

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。最近の研究によれば、低投与量の TCDD がマーマセットの

心筋の線維化を引き起こすことが報告された。心筋の線維化は急性的に生じており、線維化した心筋組織では、コラーゲンのみならず、フィブロネクチンやラミニンなどの細胞外基質も増加していたことが合わせて報告された。また、0.15 ng/kg/日の TCDD を雌サルに4年間投与したところ、子宮内膜症を引き起こしたとの報告もある。いくつかの研究において、TCDD は、TGF- β 1 やその受容体を活性化させることにより、細胞外基質の増殖を引き起こしていると考えられている。しかし一方で、TCDD が TGF- β 1 の活性に関連した機構で線維化を促進するならば、TCDD 暴露された胎児の器官にも線維化が生じる可能性があるが、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。この実験で、TCDD を暴露された母体から出生し、生後死亡した児に、腎の異形成例を見出した。この研究では、異形成腎に、コラーゲン増殖が認められるか否かを検索し、TCDD が腎線維化にあたえる影響について検討した。

B. 研究方法

妊娠 20 日のアカゲザルに TCDD 300 ng/kg を皮下投与し、30 日毎に初回投与量の 5%を追加投与することにより体内負荷量を維持する条件で妊娠を継続させ、自然分娩の後 90 日まで投与を続けた。つまり、

母動物の体内負荷量を一定に保つように投与した。この投与量は、耐容一日摂取量の 3 倍量に相当する。溶媒のみの投与群を対照とした。対照については生後 169 日の児の腎を使用した。TCDD 投与群については、生後死亡した 2 例の児（♂、生後 406 日に死亡）（♂、生後 425 日に死亡）の腎について検索した。

ピクリシリウス赤染色

腎臓組織は 10%緩衝ホルマリン液中で固定し、パラフィン包埋した。薄切後、脱パラフィンを施した切片はコラーゲンに特異的な染色である 0.1%ピクリシリウス赤で約 10 分間染色した。

C. 研究結果

TCDD 暴露は 20 母体に対して行われた。その中で、出生は 16 例であった。生後死亡 8 例の中で、顕微鏡的に腎異形成が認められたのは 2 例であった。したがって、腎異形成は生後死亡例の少なくとも 25%に出現した割合となる。その他の 6 例の死亡例については、腎異形成について検索中である。

正常腎組織は、ピクリシリウス赤にほとんど染色されない（図 1A）。対して、異形成腎は線維化をおこしていると考えられ、ピクリシリウス赤に強く染色された（図 1B）。異形成腎では腎小体と尿細管の低形成が認められた。また、血管周囲あるいは血管外膜の結合組織が増殖していた。間質では増殖したコラーゲン線維が認められた。ボウマン囊の肥厚も認められた（図 1B）。

いくつかの血管内腔は内膜の肥厚により閉塞していた。また、腎の線維皮膜の肥厚も同時に認められた（図 1B）。

低倍率の観察では、ピクリシリウス赤に

よる染色は、腎柱部に認められた (図 2A)。腎小体周囲あるいは尿細管周囲はあまり濃染されていなかった。しかし、高倍率での観察では、いくつかの腎小体周囲あるいは尿細管周囲のコラーゲン線維の増殖が認められた (図 2B)。

1 例の腎においては、強度に線維化していた (図 3)。線維化部はコラーゲン線維の増殖が著しく、ほとんどの腎小体と尿細管が消失しており、間質に置換されていた。このような所見は、顕微鏡所見としては水腎症と類似するが、今回検索した 2 例については、肉眼的に水腎症は認められなかった。

D. 考察

本研究結果から、TCDD 暴露群の腎に線維化が生じる可能性があることが判明した。これまでの組織化学的研究では、TCDD を暴露されたマウス母体からの胎仔の腎では、IV 型コラーゲンの減少が報告されていた。しかし、本研究により、一部ではあるが TCDD 投与群での腎でのコラーゲン増殖が明確に確認された。これらの結果の差は、マウスとサルでの TCDD の代謝スパンの差が反映したと思われる。マウスでは、発生期間が約 20 日と短いため、TCDD の短期的な発生毒性が表れただけかも知れない。

いくつかの血管内腔は内膜の肥厚により閉塞を起こしていた。血管閉塞による虚血は、線維化を促進したと思われるが、TCDD が動脈硬化を促進する可能性について、さらなる研究が必要と思われる。

今回得られた顕微鏡所見は、水腎症の所見と類似している。マウス母体に TCDD を投与した場合、その胎仔に高率に水腎症が発症する。TCDD による胎仔の水腎症発症は、ノックアウトマウスを使用した実験か

ら、AhR を介して引き起こされることが確認されており、サルでも水腎症が発症する可能性は大いにあった。しかし、今回検索した 2 例については、肉眼的に水腎症は認められていない。また、その他の生後死亡例 6 例についても水腎症は認められなかった。このことから、所見を総合すると、今回検索した 2 例は、高度の慢性腎盂腎炎であった可能性があるが、基本的に腎硬化症と診断されるものと思われる。

TCDD の腎でのコラーゲン増殖促進について、TGF- β 1 が関与しているかも知れない。TGF- β 1 は種々の器官では線維化を促進することが知られており、腎においても顕著に線維化を引き起こすことが報告されている。また、TCDD 暴露されたマーマーセットでは、心筋の線維化が起こることが報告されている。この研究においては、TCDD 暴露群の心筋内では TGF- β 1 が有意に発現増加していたことが合わせて報告されている。TCDD 暴露と、TGF- β 1 などの成長因子の増加あるいは活性化との関連についての解明が次の課題と思われる。

E. 結論

胎生・授乳期のアカゲザルに TCDD 300 ng/kg 暴露したところ、児の腎形成に腎小体の萎縮を中心とする異形成が認められた。異形成腎についてコラーゲン線維の増殖が認められ、線維化と考えられた。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る。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sumida H, Tsusaki H, Inouye M, and Yasuda M

Renal fibrosis induced by in utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in rhesus monkeys. *Organohalogen Compounds*, 64: 374-377 (2003)

2. 学会発表

1) Sumida H, Tsusaki H, Inouye M, and Yasuda M

Renal fibrosis induced by in utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in rhesus monkeys. (23rd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, August 24-29, Boston, USA)

2) 隅田寛、上塚翼、安田峯生、山下敬介、角崎英志、井上稔

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肝細胞の形態解析。日本内分泌攪乱化学物質学会第6回研究発表会要旨集 325 (抄録)、2003 (日本内分泌攪乱化学物質学会第6回研究発表会、2003年12月2-3日、仙台)

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

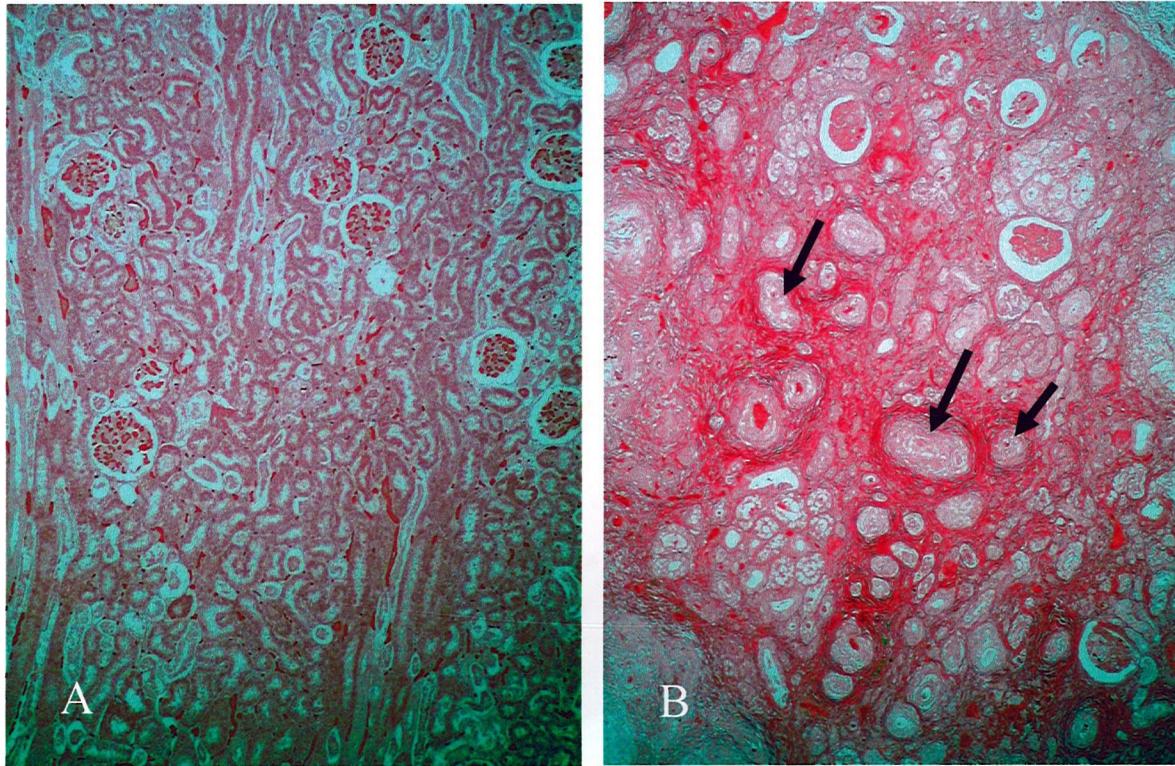


図1 A:対照群の腎。ほとんどの組織はピクリシウス赤染色に陰性である。 B:300 ng/kg 投与群に認められた異形成腎のピクリシウス赤染色像。腎小体および尿細管は高度な低形成を呈している。腎柱部には線維化が認められ、ピクリシウス赤に濃染している。いくつかの血管では、内膜が肥厚して内腔が閉塞している(矢印)。

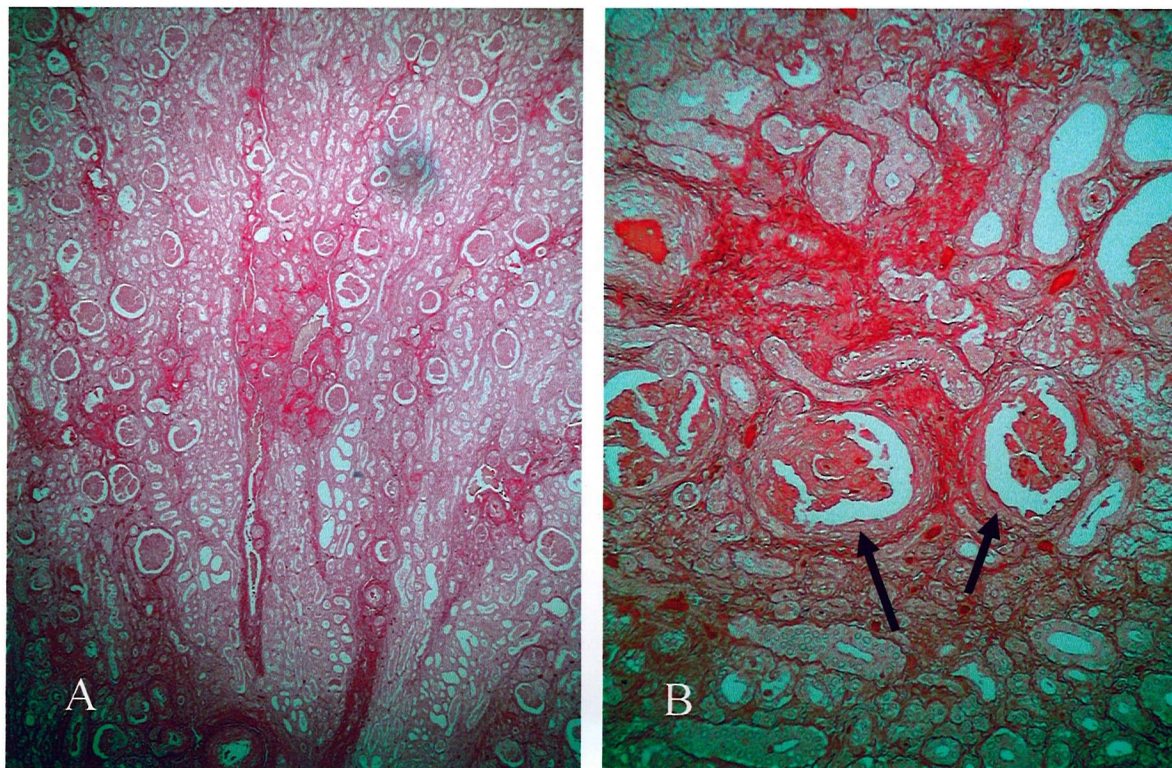


図2 A:線維化腎ピクリシリウス赤染色の低倍率像。腎柱部がピクリシリウス赤に濃染している。ほとんどの腎小体および尿細管はピクリシリウス赤に染色されていない。B:線維化腎ピクリシリウス赤染色の高倍率像。いくつかの尿細管周囲は増殖したコラーゲン線維で囲まれている。ボウマン嚢壁の肥厚が認められる(矢印)。

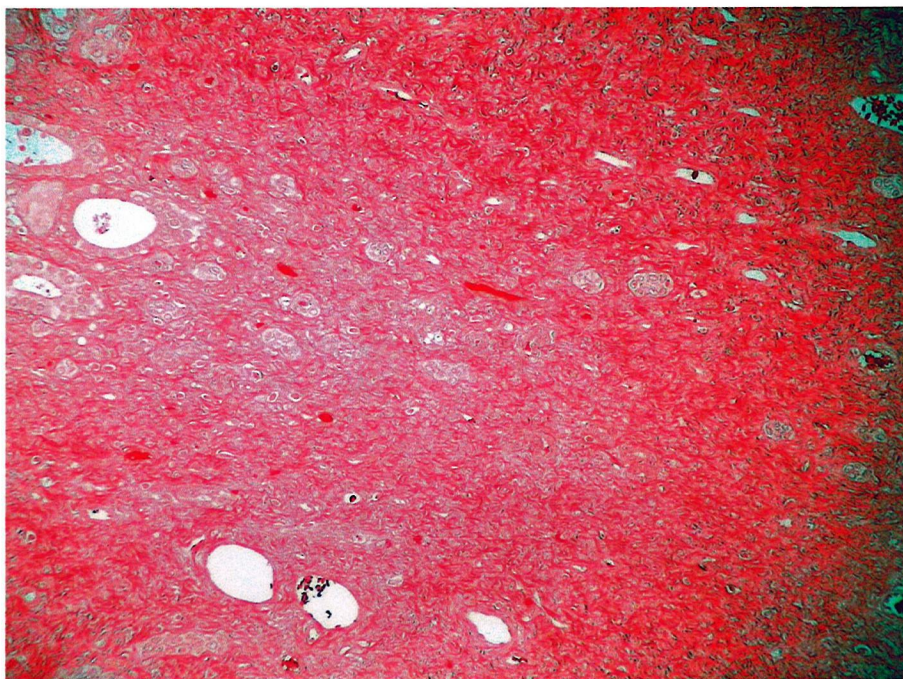


図3 高度に線維化した腎。ほとんどの腎小体と尿細管は消失し、増殖したコラーゲン線維によって置換されている。

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

1. 論文発表

- 1) Yasuda I, Yasuda M, Sumida H, Tsusaki H, Inouye M, Tsuga K, Akagawa Y: Effect of *in utero* and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on tooth development in rhesus monkeys. *Organohalogen Compounds*, 64, 431-434, 2003.
- 2) Sumida H, Tsusaki H, Inouye M, Yasuda M: Renal fibrosis induced by *in utero* and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in rhesus monkeys. *Organohalogen Compounds*, 64, 453-456, 2003.
- 3) Sugihara K, Kitamura S, Ohta S, Okamura S, Yamashita K, Yasuda M, Matsui S, Matsuda T: Metabolism of indirubin and indigo, endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand candidates, and competitive effect with respect to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Organohalogen Compounds*, 65, 134-137, 2003.

2. 学会発表

- 1) 安田以久, 安田峯生, 隅田寛, 角崎英志, 井上稔, 津賀一弘, 赤川安正: ダイオキシン胎生期暴露のアカゲザル歯形成への影響. 第43回日本先天異常学会学術集会要旨集, 118 (抄録), 2003. (第43回日本先天異常学会学術集会, 2003年7月2-4日, 大阪)
- 2) 安田峯生, 安田以久, 隅田寛, 角崎英志, 井上稔, 津賀一弘, 赤川安正: ダイオキシン胎生期暴露のアカゲザル口蓋ヒダ形成への影響. 第43回日本先天異常学会学術集会要旨集, 119 (抄録), 2003. (第43回日本先天異常学会学術集会, 2003年7月2-4日, 大阪)
- 3) 隅田寛, 上塚翼, 安田峯生, 山下敬介, 角崎英志, 井上稔: 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肝細胞の形態解析. 環境ホルモン学会第6回研究発表会要旨集, 325 (抄録), 2003. (環境ホルモン学会第6回研究発表会, 2003年12月2-3日, 仙台)

EFFECT OF *IN UTERO* AND LACTATIONAL EXPOSURE TO 2,3,7,8-TETRACHLORODIBENZO-*P*-DIOXIN ON TOOTH DEVELOPMENT IN RHESUS MONKEYS

Iku Yasuda¹, Mineo Yasuda², Hiroshi Sumida³, Hideshi Tsusaki⁴, Minoru Inouye⁴,
Kazuhiro Tsuga¹ and Yasumasa Akagawa¹

1 Department of Advanced Prosthodontics, Division of Cervico-Gnathostomatology, Programs for Applied Biomedicine, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Hiroshima 734-8553, Japan

2 Department of Clinical Engineering, Faculty of Health Sciences, Hiroshima International University, Hiroshima 724-0695, Japan

3 Department of Clinical Radiology, Faculty of Health Sciences, Hiroshima International University, Hiroshima 724-0695, Japan

4 Safety Research Facility, Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd., Kagoshima 891-1394, Japan

Introduction

The current tolerable daily intake (TDI) of dioxin and dioxin related compounds has been set at 4 pg TEQ/kg/day in Japan¹. This value was calculated from the lowest-observed-adverse-effect level (LOAEL) in experimental animals, mostly rodents. Gray *et al.*² reported that a single oral dose of 200 ng/kg of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) to pregnant rats on day 15 of gestation resulted in abnormalities of reproductive organs in the offspring. The maternal body burden at this dose was measured to be 86 ng/kg. To attain this body burden level, human daily intake was calculated to be 43.6 pg/kg/day. An uncertainty factor of 10 was applied to this value, and the human TDI was established. However, due to great differences in the biological half life of TCDD between human and rodents, the validity of this calculation is questioned. To obtain more reliable LOAEL in the second generation, we initiated a long-term study in rhesus monkeys.

In rodents, teeth are known to be targets of developmental toxicity of dioxin. In utero and lactational TCDD exposure affects rat incisor and molar development^{3,4}. In our monkey experiment, some young were stillborn or died neonatally. These animals provided us with a unique opportunity to study tooth development in primate young exposed to TCDD *in utero* and lactationally. This is a preliminary report of our findings in these young.

Materials and Methods

Animals and treatment. Adult rhesus monkeys were mated, and females with confirmation of pregnancy by ultrasonography were given TCDD subcutaneously on day 20 of gestation at an initial dose level of 30 or 300 ng/kg. Controls received the vehicle. Approximately 20 dams were allotted to each dose group. The lower dose level was set at about one third of the LOAEL body burden in rodents, and the higher one at about three times of the LOAEL. For maintenance of a certain body burden, 5% of the initial dose was given to dams every 30 days during pregnancy and lactation until day 90 after birth. After weaning of the first born young (F1a) the dams were remated to obtain the second born young (F1b), and TCDD was given to maintain the body burden.

Table 1. Observed specimens and their findings

Group	Specimen No*	Status	Age**	Findings***
Control	10a	stillborn	GD146	no abnormalities detected
	13a	stillborn	GD156	no abnormalities detected
	49a	stillborn	GD147	no abnormalities detected
	58a	postnatal death	PND98	no abnormalities detected
30 ng/kg	20a	stillborn	GD163	no abnormalities detected
	28a	stillborn	GD158	no abnormalities detected
	29a	stillborn	GD157	no abnormalities detected
	50a	stillborn	GD172	no abnormalities detected
	16b	stillborn	GD148	no abnormalities detected
	17b	stillborn	GD150	no abnormalities detected
	53b	stillborn	GD160	no abnormalities detected
	59b	stillborn	GD159	no abnormalities detected
300 ng/kg	34a	abortion	GD128	no abnormalities detected
	37a	stillborn	GD164	Up AAD Pr, Dy; Up LeB Mi
	40a	postnatal death	PND26	Up AA Mi; Up Le D Pr
	43a	stillborn	GD176	no abnormalities detected
	57a	postnatal death	PND1	Up AA Pr Mo; Up BB Lo AA Pr
	60b	postnatal death	PND25	no abnormalities detected
	66b	stillborn	GD143	no abnormalities detected
	103a	stillborn	GD173	no abnormalities detected

*Maternal ID number. 'a' and 'b' indicate first and second born young, respectively.

**GD: gestation day; PND: postnatal day.

***Up: upper; Lo: lower; Le: left; A: central incisor; B: lateral incisor; D: first molar; Pr: precociously erupting; Dy: dysgenetic; Mi: missing; Mo: mobile.

Macroscopic observation. Stillborn and postnatally died young were autopsied, and the upper and lower jaws were dissected for detailed observation. Macroscopic observation was made under a dissecting microscope (Olympus SZX12). Photographs were taken by a digital camera (Olympus C-4040).

Radiographic observation. Conventional intraoral radiographs were taken by a portable X-ray apparatus (Asahi Roentgen KX-60) with a CCD sensor (Gendex Visualix). CT examination was done by a high resolution dento-maxillofacial cone beam X-ray CT system (Hitachi CB MercuRay) and three dimensional images were reconstructed by a computer with a software (ExaVison LITE).

Results and Discussion

Number of observed specimens and their findings are listed in Table 1. No abnormalities were detected in the control and 30 ng/kg groups. In the 300 ng/kg group, three of the eight observed specimens had abnormally developed teeth. Figures 1-3 illustrate abnormalities in a case. These findings suggest that teeth are sensitive targets of developmental toxicity of dioxin in primates.

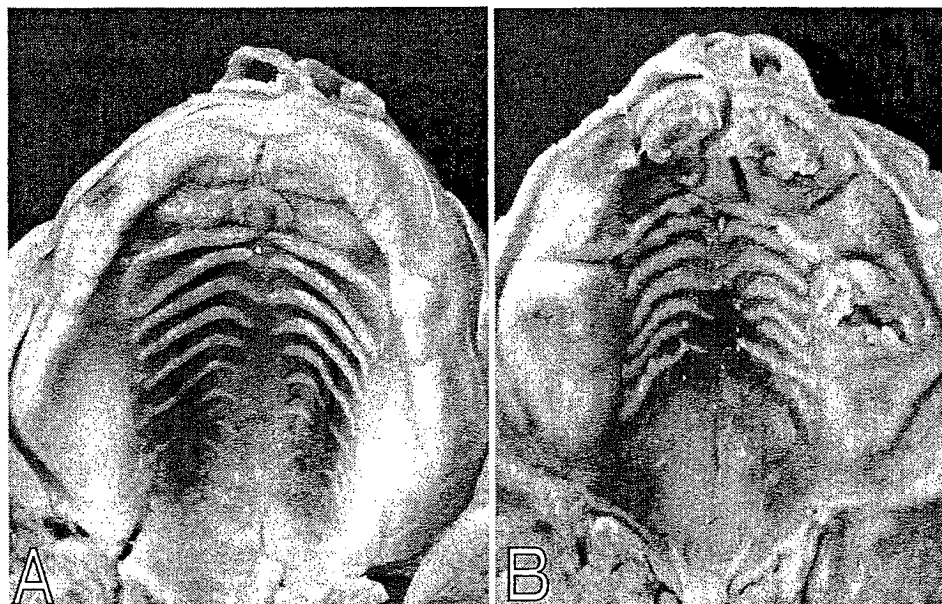


Fig.1. A: The upper jaw viewed from the oral cavity of a young stillborn on day 156 of gestation in the control group (13a). No teeth have erupted. B: The upper jaw of a young stillborn on day 164 of gestation in the 300 ng/kg group (37a). The central incisors and the left first molar have erupted precociously, and are dysgenetic.

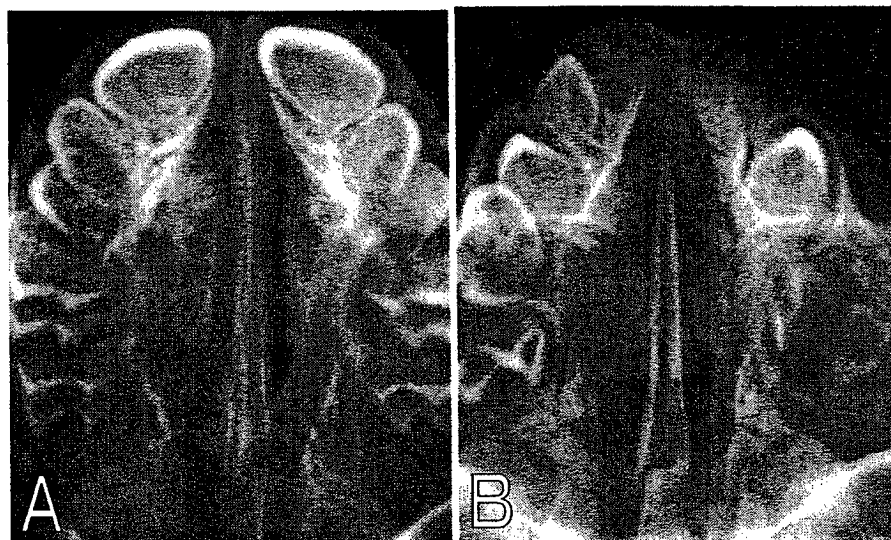


Fig.2. A, B: X-ray view of the upper jaw shown in Fig. 1A and B, respectively. In B, the precociously erupted central incisors and left first molar are not well calcified, the left lateral incisor is missing, and the left second molar is dislocated anteriorly.

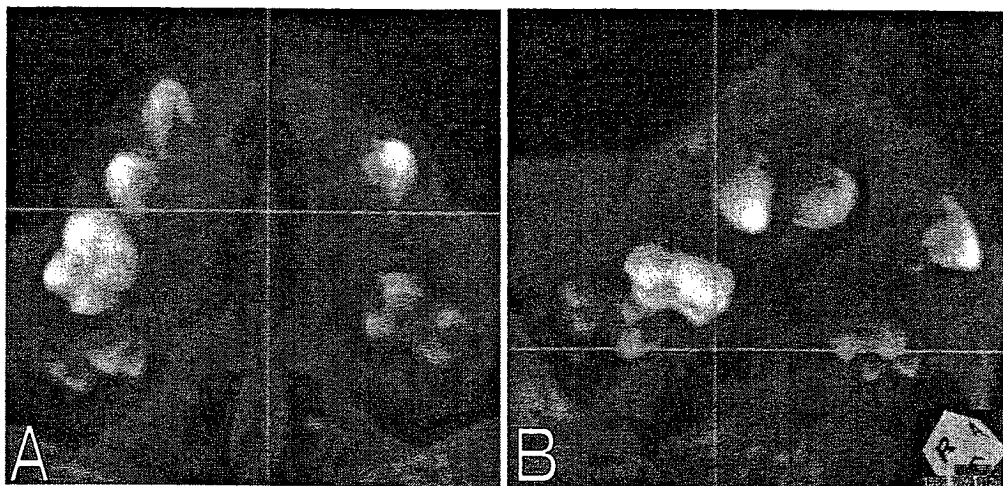


Fig.3. Three dimensionally reconstructed CT images of the upper jaw shown in Fig. 1B.

A: Inferior view. B: Right inferior oblique view. Note poor calcification of both central and left lateral incisors, and the left first molar.

In humans, it has been reported that demarcated hypomineralizations of developing teeth are a biological indicator of an early dioxin exposure in children⁵. For further evaluation of tooth development in our monkey population, observation of surviving young is in progress.

Acknowledgement

The authors thank Prof. Keiji Tanimoto, Department of Oral and Maxillofacial Radiology, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University for his valuable suggestions for dental radiography, and Mr. Masamichi Aita, Department of Oral and Maxillofacial Radiology, Hiroshima University Dental Hospital for his technical assistance in three-dimensional CT. This study was supported by Health Labour Sciences Research Grants for Research on Food and Chemical Safety from the Ministry of Health Labour and Welfare of Japan.

References

1. Environmental Health Committee of the Central Environment Council, Living Environment Council, and Food Sanitation Investigation Council (1999) Memorandum on Tolerable Daily Intake (TDI) of Dioxin and Related Compounds (Japan), Center for Environmental Information Science, Tokyo.
2. Gray, L.E., Jr., Ostby, J.S. and Kelce, W.R. (1997) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 146, 11
3. Miettinen, H.M., Alaluusua, S., Tuomisto, J. and Viluksela, M. (2002) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 184, 57
4. Kiukkonen, A., Villuksela, M., Sahlberg, C., Alaluusua, S., Tuomisto, J.T., Tuomisto, J. and Lukinmaa, P.-L. (2002) *Toxicol. Sci.*, 69, 482.
5. Holtta, P., Kiviranta, H., Leppaniemi, A., Vartiainen, T., Lukinmaa, P.L. and Alaluusua, S. (2001) *Arch. Environ. Health*, 56, 522

RENAL FIBROSIS INDUCED BY IN UTERO AND LACTATIONAL EXPOSURE TO 2,3,7,8-TETRACHLORODIBENZO-*P*-DIOXIN IN RHESUS MONKEYS

Hiroshi Sumida¹, Hideshi Tsusaki², Minoru Inouye² and Mineo Yasuda³

1 Department of Clinical Radiology, Faculty of Health Sciences, Hiroshima International University, Hiroshima 724-0695, Japan

2 Safety Research Facility, Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd., Kagoshima 891-1394, Japan

3 Department of Clinical Engineering, Faculty of Health Sciences, Hiroshima International University, Hiroshima 724-0695, Japan

Introduction

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) might induce the proliferation of the interstitial tissues. A recent study showed that low dose administration of TCDD induced myocardial fibrosis in marmosets by short range exposure¹. In fibrotic myocardium, it was confirmed that proliferated components were not only collagen, but also fibronectin and laminin. Furthermore, TCDD induces endometriosis in the female monkey at a daily dose of 0.15 ng/kg/day for 4 years². The effects of TCDD on proliferation of the extracellular matrix are possibly related to the increasing activation of growth factors such as TGF- β 1 and its receptor¹. On the other hand, effects of TCDD on proliferation of the interstitial tissues of the offspring have not been well confirmed. It has been reported that TCDD alters extracellular matrix development in the kidney in the mouse fetus, when TCDD was administered to the pregnant mother³. In this report, however, decreasing of components of the extracellular matrix, such as fibronectin and collagen type IV, was described. It was concluded that the decreasing of the extracellular matrix results ultrastructural maldevelopments of the kidney. Recently, we observed renal dysgenesis in two postnatally dead young from mothers exposed to TCDD during the pregnancy and lactational period. In these two cases, renal corpuscles were mostly hypoplastic, and the interstitial tissues seem proliferated. These two cases were obtained by exposure to a high TCDD level, and these young died at the age of 406 days and 422 days. In the present study, we report that these two cases had renal fibrosis induced by TCDD exposure during the pregnancy and lactation, and show collagen proliferation in the kidney with picrosirius red staining.

Materials and Methods

Animals and treatment. Adult rhesus monkeys were mated, and females with confirmation of pregnancy by ultrasonography were given TCDD subcutaneously on day 20 of gestation at an initial dose level of 30 or 300 ng/kg. Controls received the vehicle. The lower dose level was set at about one third of the LOAEL body burden in rodents, and the higher one at about three times of the LOAEL. For maintenance of a certain body burden, 5% of the initial dose was given to dams every 30 days during pregnancy and lactation until 90 days after delivery. As of

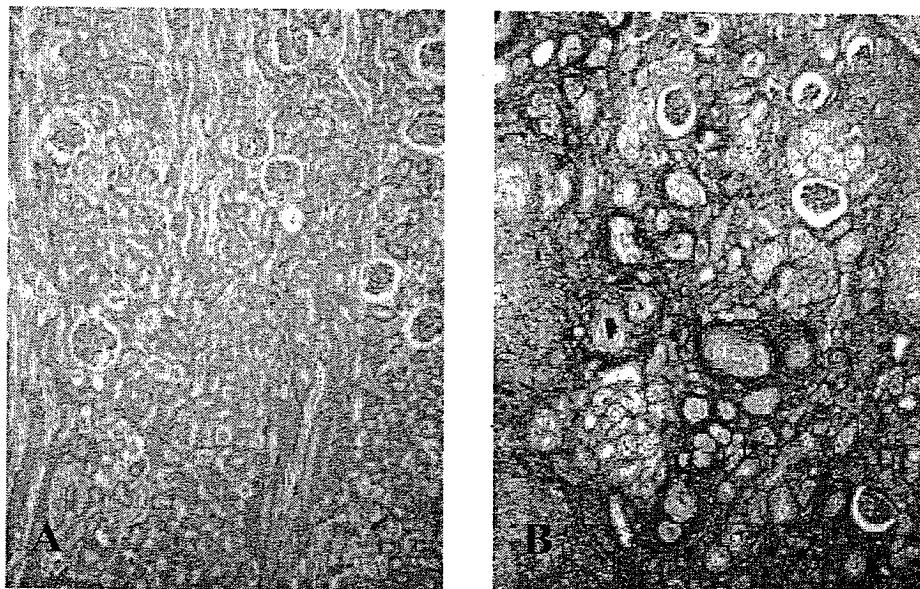


Figure 1. A: The kidney without dysgenesis. The tissue was not stained with picrosirius red. B: The kidney with dysgenesis. The renal corpuscle and tubules were very hypoplastic. The area of renal columns was fibrotic and intensely stained with picrosirius red.

March 2003, data on approximately 20 young in each group were obtained. Young that died postnatal were autopsied, and main organs were histopathologically examined.

Picrosirius red staining. The kidney was fixed in 10% buffered formalin, and embedded in paraffin. Thin sections were stained with 0.1% picrosirius red as a specific dye for collagen. Sections were photographed under a light microscope as digital images with a digital camera (Olympus C-4040).

Results and Discussion

Two cases of renal dysgenesis were detected in dead young from the 300 ng/kg group. These young died 406 days and 422 days after birth. Eight young died by 468 days after birth, thus, renal dysgenesis was seen in 25 % of dead young.

The kidney without dysgenesis showed almost no staining with picrosirius red (Figure 1, A). In contrast, the kidney with dysgenesis was fibrotic and then intensely stained with picrosirius red (Figure 1, B). In the dysgenetic kidney, the renal corpuscles and tubules developed hypoplastic. Collagen fibers surrounding vascular or the adventitia seemed proliferated, and invaded into the interstitial tissue. Lumen of some vascular was closed by proliferation of the intima (Figure 1,

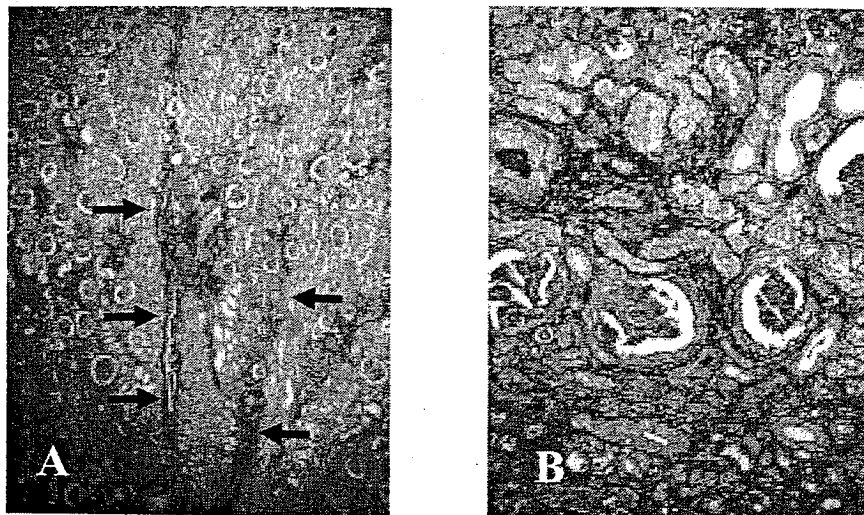


Figure 2. A: Low power microphotograph of fibrotic kidney. The renal columns (arrows) were stained with picosirius red. Most of the renal corpuscles and tubules were not stained. B: High power microphotograph of fibrotic kidney. Some renal tubules were surrounded by collagen fibers. The wall of renal corpuscles was thickened.

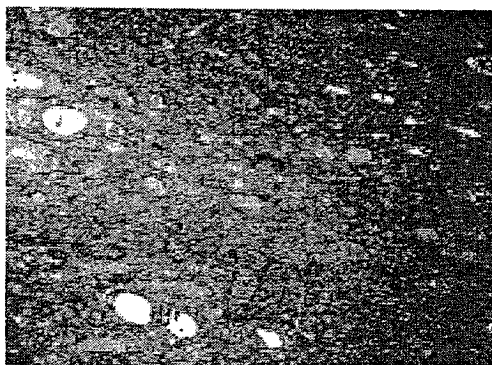


Figure 3. Severe fibrosis in the kidney. In the fibrotic area, most of renal corpuscles and tubules disappeared due to collagen fiber proliferation.

B).

At low power, the staining with picosirius red was seen in the renal columns (Figure 2, A). Surrounding tissues of most of the renal corpuscles and tubules were not stained intensely. At

high power, however, it was recognized that collagen fibers surrounded some renal corpuscles and tubules (Figure 2, B). Remarkably, the wall of the renal corpuscles was thickened (Figure 2, B).

One kidney was highly fibrotic (Figure 3). In the fibrotic area, most of the renal corpuscles and tubules disappeared, and collagen fibers markedly proliferated.

A previous immunohistochemical study³ showed decreasing of collagen type IV in the fetal kidney from mouse dams exposed to TCDD. In the present study, however, proliferation of collagen in the kidney was clearly recognized. Furthermore, lumen of some vessels in the kidney was obliterated by proliferation of the intima. Further studies are needed whether TCDD induces atherosclerosis.

The effects of TCDD on collagen proliferation in the kidney are possibly linked to the effects of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1). This factor is known to induce fibrosis in various organs⁴. TGF- β 1 has been recognized to induce marked fibrosis in the kidney⁴. Indeed, TGF- β 1 was increased in marmosets with myocardial fibrosis by TCDD¹. Clarification of relations between TCDD and increasing of growth factors is expected.

Acknowledgements

This study was supported by Health Labour Sciences Research Grants for Research on Food and Chemical Safety from the Ministry of Health Labour and Welfare of Japan.

References

1. Riecke, K., Grimm, D., Shakibaei, M., Kossmehl, P., Schulze-Tanzil, G., Paul, M. and Stahlmann, R. (2002) *Arch. Toxicol.* 76: 360-366.
2. Rier, S.E., Martin, D.C., Bowman, R.E., Dmowski, W.P. and Becker, J.L. (1984) *Fundam. Appl. Toxicol.*, 21: 433-441.
3. Abbott, B.D., Morgan, K.S., Birnbaum, L.S. and Pratt, R.M. (1987) *Teratology* 35: 335-344.
4. Terrell, T.G., Working, P.K., Chow, C.P. and Green J.D. (1993) *Int Rev Exp Pathol* 34: 43-67.

METABOLISM OF INDIRUBIN AND INDIGO, ENDOGENOUS ARYL HYDROCARBON RECEPTOR LIGAND CANDIDATES, AND COMPETITIVE EFFECT WITH RESPECT TO 2,3,7,8-TETRACHLORODIBENZO-*p*-DIOXIN (TCDD)

Kazumi Sugihara¹, Shigeyuki Kitamura¹, Takashige Okayama¹, Youichi Kohno¹, Shigeru Ohta¹, Keisuke Yamashita¹, Saori Okamura¹, Mineo Yasuda², Ken'ich Saeiki³, Saburo Matsui⁴ and Tomonari Matsuda⁴

¹ Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Japan. ² Faculty of Health Sciences, Hiroshima International University, Japan. ³ Nagoya City University, Japan. ⁴ Graduate School of Global Environmental Studies, Kyoto University, Japan.

Introduction

Aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a ligand-binding transcription factor which was isolated as a 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) receptor in the cell, but remains an orphan receptor. Most of the effects of TCDD are mediated by cytosolic AhR. Binding of TCDD to AhR is considered to be the initial event leading to the manifestation of the biological and toxicological responses elicited by TCDD¹. Indirubin and indigo were identified as AhR ligands in human urine and serum by means of a recombinant yeast assay². The AhR ligand activity of indigo in this assay was about the same as that of TCDD, and the potency of indirubin was 50 times higher. The two compounds are plant products that have been used to dye cloth. Indirubin and its analogs have been used in traditional Chinese medicine to treat human chronic myelocytic leukemia, and they were reported to act by inhibiting cyclin-dependent kinases³. Pathways for the endogenous production of indirubin and indigo in the human body were postulated by Gillam *et al.*⁴ In the previous report, we demonstrated that indirubin and indigo are potent inducers of cyp1a1/2 in mouse liver⁵. Since the inducing effect was abolished in AhR knock-out mice, the inducing effects should be mediated by AhR. Though indirubin has a higher AhR binding affinity than TCDD, its ability to induce drug-metabolizing enzymes *in vivo* is weaker than that of TCDD. Thus, these compounds might block the AhR-mediated toxicity of dioxins *in vivo*. However, their metabolism has not been examined. In this study, we examined the metabolism and excretion of indirubin, indigo and indigocarmine in rats and mice, and their competitive effect with respect to TCDD and MC *in vivo* and *in vitro*.

Materials and Methods

Animals, *in vivo* treatment and metabolism studies. Male C57BL/6JJcl mice (5-6 weeks old) from CLEA Japan, Inc. (Tokyo, Japan) were given indirubin (1-50 mg / kg body weight) dissolved in Panacete 810TM (5 mL / kg) by gavage for three days. Vehicle control mice were given the same volume of Panacete 810TM. For the competition experiment, indirubin was given for 4 days and TCDD or MC was given on the second day. Male Slc:SD rats (6-8 weeks old) from Japan SLC, Inc. (Shizuoka, Japan) were given indirubin (10-50 mg/kg) by gavage at 6, 12, 24 or 48 hours after TCDD or MC, and urine and feces were collected. Indirubin and its metabolites in urine and feces were extracted and measured with HPLC.

Preparation of liver preparations and enzyme assays. Mice were killed and the livers were quickly removed. Microsomes and cytosol were prepared according to usual methods. The ethoxyresorufin-*O*-dealkylase (EROD), methoxyresorufin-*O*-dealkylase (MROD) and pentoxyresorufin-*O*-dealkylase (PROD) activities in liver microsomes were assayed by a fluorophotometric method.

***In vitro* metabolism of indirubin and indigocarmine.** Indirubin and indigocarmine were incubated with liver microsomes or cytosol in 0.1 M Na-K phosphate buffer (pH 7.4), then metabolites and the substrate were measured by means of HPLC.

Hepatocyte preparation and incubation. Rat hepatocytes were isolated from male rats by collagenase perfusion as described previously. Hepatocytes (2×10^6 cells/ml) were suspended in Williams' E medium supplemented with 7 % fetal calf serum. After 7 hr of incubation at 37°C under an atmosphere of 5 % CO₂ and 95 % air, the cells were harvested and the medium was changed. After an additional 17 hr of incubation, the enzyme inducers were added to the cell suspensions. Dimethyl sulfoxide was used for the solubilization of these inducers. After treatment of hepatocytes with the enzyme inducers, EROD activities were assayed and mRNA was measured by RT-PCR. Cell viability after isolation, estimated by means of the trypan blue exclusion test, was always greater than 90 %.

Enzyme assays in HepG2 cells. Human hepatocarcinoma HepG2 cells were grown to confluence at 37°C under 5% CO₂ in MEM (Sigma Chemical Co.) with 5 % fetal bovine serum (Life Technologies, Rockville, MD). The cells were seeded in 24-well plates at 2.5×10^4 cells/well and chemicals were added the next day. One hour after addition of the enzyme inducers, the EROD assay was performed. In this study, about 0.5 mg protein of HepG2 cells was used.

Results and Discussion

Time course of liver CYP activities after indirubin treatment in mice *in vivo*.

The microsomal alkoxyresorufin-*O*-dealkylase activities, EROD, MROD and PROD, of male C57BL/6J mice after treatment with indirubin (50 mg / kg body weight) by gavage for three days were examined. The EROD and MROD activities were induced to the extents of 1.9- and 2.7-fold at 24 hours after the last dose, then decreased time-dependently and returned to the original level after three days. In the case of TCDD the induction levels were still more than 70% of the peak after 4 weeks, whereas in the case of indirubin, they decreased promptly.

***In vitro* metabolism of indirubin by rat liver microsomes and cytosol.**

In vitro metabolism of indirubin, indigo and indigocarmine was examined using rat liver preparations. When indirubin was incubated with rat liver microsomes, it was metabolized time-dependently. Liver microsomes from MC-treated rats were most effective compared with microsomes from untreated and phenobarbital-treated rats. The metabolic activities were inhibited by general CYP inhibitors, SKF-525A and carbon monoxide, and a specific inhibitor of CYP1A, α -naphthoflavone. Radical trapping agents, α -tocopherol, ascorbic acid and mannitol did not inhibit the activities. These facts indicate that indirubin is metabolized by CYP1A1/2 and that radical intermediates are not generated. Indigocarmine, indirubin and indigo were also reductively metabolized by liver microsomes and cytosol. Their leuco-form metabolites were detected under anaerobic conditions. The metabolites were auto-oxidized to the mother compounds by oxygen.

***In vivo* metabolism of indirubin**

In vivo metabolism of indirubin was examined using HPLC. Urine of rats dosed with indirubin (10 mg/kg) was treated with β -glucuronidase/arylsulfatase and extracted with ethyl acetate. Unchanged indirubin (about 0.1% of the dose) was detected in 24-hour urine.

Competitive effect of indirubin with respect to TCDD or MC for AhR in mice *in vivo*.

Indirubin (5 or 100 mg/kg) was administered to mice with TCDD (30 and 625 ng/kg) or MC (25 mg/kg). Indirubin was administered for 4 days, and TCDD or MC was given after indirubin on the second day. Liver CYP activities were then measured, but no significant difference of induction or mRNA levels were observed (Fig. 1).

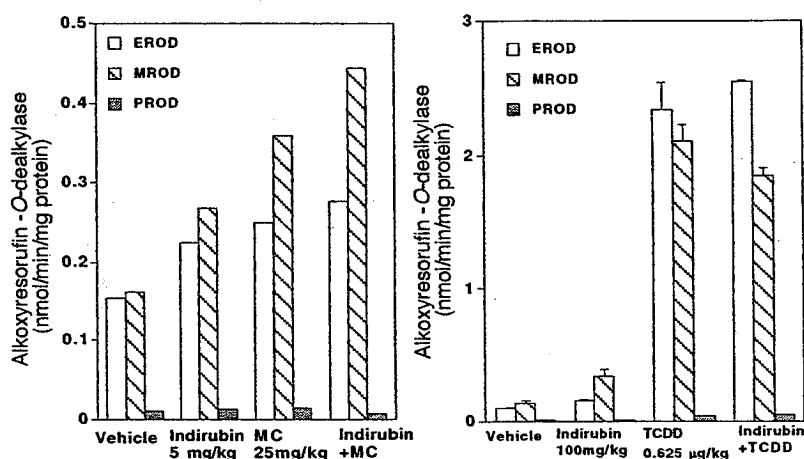


Fig. 1. Competitive effect with respect to MC (left), and TCDD (right) for AhR in mice *in vivo*

Effects of indirubin on rat hepatocytes and HepG2

The enhancing effect of indirubin and indigo on EROD activities in rat hepatocytes and HepG2 cells was examined. EROD activities in rat hepatocytes and HepG2 cells were increased by the addition of indirubin and indigo, as well as TCDD and 3-MC. The effect of indirubin after 10 hr was intermediate between those of TCDD and 3-MC in the concentration range of 1×10^{-9} - 1×10^{-5} M in HepG2 cells. When indirubin (10^{-6} M) was added with various concentrations of TCDD, a slight blocking effect on the action of TCDD was observed. However, a synergistic effect was observed with MC.

In this study, we observed a competitive effect of indirubin with respect to TCDD or MC *in vivo* and *in vitro*. The induction of liver CYP activities by indirubin was lower than that of TCDD and indirubin did not affect the inducing effect of TCDD. Indirubin was metabolized by liver microsomal cyp1a1/2, and reductive metabolism was catalyzed by cytosolic enzymes. The postulated metabolic pathways are illustrated in Fig. 2.

In conclusion, indirubin and indigo are easily metabolized and excreted *in vivo*. A blocking effect of indirubin on TCDD toxicity *in vivo* was not observed in this study.

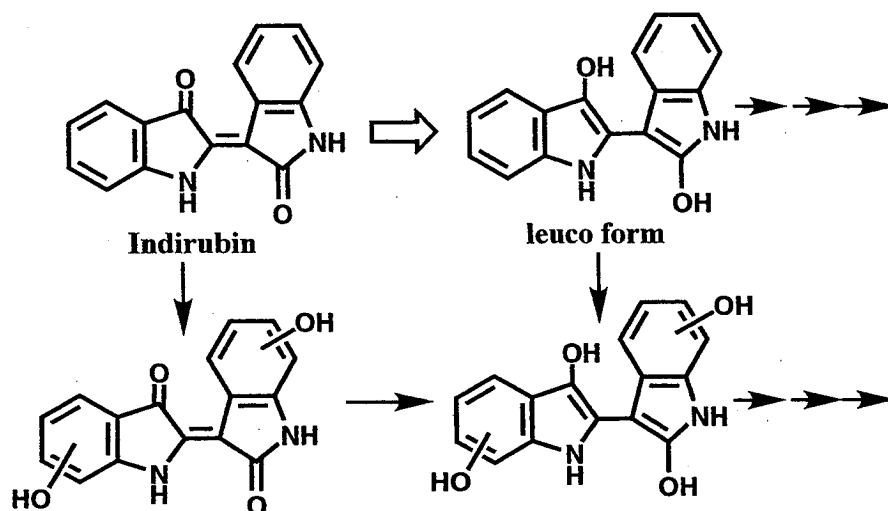


Fig. 2. Postulated metabolic pathways of indirubin in rats and mice

Acknowledgements

This study was supported by Health Science Research Grants for Research on Environmental Health from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan and Grants-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas (13027256, 13672343) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

References

1. L.S. Birnbaum, (1994) *in Progress in Clinical and Biological Research* (Spitzer, H. L., Slaga, T. J., Greenlee, W. F., and McClain, M., Eds.), 387: 139-154.
2. Adachi, J., Mori, Y., Matsui, S., Takigami, H., Fujino, J., Kitagawa, H., Miller, C.A., Kato, T., Saeki, K. and Matsuda, T. (2001) *J. Biol. Chem.* 276(34): 31475-8.
3. Marko, D., Schatzle, S., Friedel, A., Genzlinger, A., Zankl, H., Meijer, L., Eisenbrand, G. (2001) *British J. Cancer*, 84(2): 283-289.
4. Gillam, E.M., Notley, L.M., Cai, H., DeVoss, J.J. and Guengerich, F.P. (2000) *Biochemistry*.39(45): 13817-24.
5. Sugihara, K., Yamada, T., Kitamura, S., Ohta, S., Yamashita, K., Okamura, S., Yasuda, M., Fujii-Kuriyama, Y., Saeki, K., Matsui, S. and Matuda, T.(2002) *Organohalogen Compounds*, 59: 453-456.

Po-12 ダイオキシン胎生期暴露のアカゲザル歯形成への影響

¹ 広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 展開医科学専攻 顎口腔頸部医科学講座 先端補綴学研究室、² 広島国際大学 保健医療学部 臨床工学科、³ 広島国際大学 保健医療学部 診療放射線学科、⁴ 株式会社 新日本科学 安全性研究所安田 以久¹、安田 峯生²、隅田 寛³、角崎 英志⁴、井上 稔⁴、津賀 一弘¹、赤川 安正¹

げっ歯類の歯はダイオキシン類の発生毒性作用に対して鋭敏に反応する標的器官であると報告されている。われわれは胎生期にダイオキシン暴露を受けたアカゲザル児の歯を観察した。アカゲザルを交配し、約 60 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 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、児を哺育させた。各群に散発した死産児および生後死亡児の歯を肉眼、単純 X 線画像、三次元 CT 画像で詳細に観察した。各群での観察標本数は溶媒対照群 4 例、30 ng/kg 群 8 例、300 ng/kg 群 8 例である。アカゲザルの乳歯はヒトと同様に上・下顎それぞれ切歯 2 対 (A、B)、犬歯 1 対 (C)、臼歯 (D、E) 2 対、合計 20 本である。対照群と 30 ng/kg の満期死産児には、乳歯早期萌出と X 線で観察可能な形態異常は見られなかったが、300 ng/kg では 1 例に上下顎両側 A の早期萌出と上顎両側 A 形成不全、上顎左側 BD の欠如、1 例に上顎両側 A の早期萌出、動揺、歯根形成不全、上顎両側 B、下顎両側 A の早期萌出、1 例に上顎両側 A の欠如と上顎左側 D の早期萌出と、8 例中 3 例に歯の異常が認められた。以上の結果は霊長類でもダイオキシンが発生中の歯に悪影響を及ぼすことを示すものである。(厚生労働科学研究費による。)

学会発表 2)

Po-13 ダイオキシン胎生期暴露のアカゲザル口蓋ヒダ形成への影響

¹ 広島国際大学、² 広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 展開医科学専攻 顎口腔頸部医科学講座 先端補綴学研究室、³ 広島国際大学 保健医療学部 診療放射線学科、⁴ 株式会社新日本科学 安全性研究所安田 峯生¹、安田 以久²、隅田 寛³、角崎 英志⁴、井上 稔⁴、津賀 一弘²、赤川 安正²

口蓋ヒダの形態変異はマウスやラットで発生毒性作用検出の指標として有用であることが知られている。われわれは胎生期にダイオキシン暴露を受けたアカゲザル児の口蓋ヒダ異常を観察した。アカゲザルを交配し、約 60 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 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、児を哺育させた。各群に散発した死産児および生後死亡児の口蓋を詳細に観察し、口蓋ヒダの形態を記載した。各群での観察標本数は溶媒対照群 4 例、30 ng/kg 群 8 例、300 ng/kg 群 8 例である。アカゲザルの口蓋ヒダは通常 8~9 対で、これらに前方から番号を付けると、ヒダ 1 は切歯乳頭の左右に伸び、2~4 は正中部で連続する。5~9 は正中部では離開する。ヒダは内側前方から外側後方に斜めに走るが、正中部近くでは内側後方から外側前方に走り、前に凸な曲線を描く。300 ng/kg 群では、口蓋ヒダの異常な肥厚、著しい非対称、不規則な走行などの形態変化が認められた。対照群の例数が少ないために、どの程度が正常範囲の変異で、どのようなものが発生毒性因子による異常であるかを識別するのは困難であるが、生存児での観察も合せて評価した結果を報告する。(厚生労働科学研究費による。)

PD-29

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
アカゲザル肝細胞の形態解析

隅田寛¹⁾、上塚翼¹⁾、安田峯生¹⁾、山下敬介²⁾、角崎英志³⁾、井上稔³⁾

1) 広島国際大学保健医療学部、2) 広島大学大学院医歯薬学総合研究科、3) 新日本科学安全性研究所

ダイオキシン類の耐容1日摂取量(TDI)は、わが国では4 pg/kg/日と定められている。この値はおもに齧歯類のデータから算出されたものである。ところが、齧歯類と霊長類では生体内でのダイオキシン類の長期的な代謝の様子が異なることが予想される。このため、TDIの妥当性は検討の余地がある。そこで、霊長類へのダイオキシン類投与実験によるデータの蓄積が望まれる。この目的のために、妊娠20日のアカゲザルに2,3,7,8-四塩化ジベンゾパラジオキシン(TCDD) 300 ng/kgを皮下投与、初回投与後30日毎に初回投与量の5%を追加投与し、生後90日まで体内負荷量を一定にするように維持量の投与を続け、その児の生後発育と生殖への影響を調べた。今回は、肝臓の組織について検討した。TCDD暴露を受けた児と溶媒のみの投与を受けた群(以下、対照群)から生まれたアカゲザルの児の中で、死亡した児の肝臓の組織切片から中心静脈周辺と小葉周辺の核密度を計測した。中心静脈周辺と小葉周辺では核密度に有意な差は見られなかったが、TCDD暴露群と対照群では暴露群の核密度が低かった。TCDD暴露群の肝臓組織切片による形態的観察によると、細胞質に泡沫状の構造が認められ、脂肪変性が強く疑われる細胞が多く確認された。また、TCDD暴露群の肝細胞の形態は不整形で、肥大しているようであった。

一方、TCDD暴露群の肝臓組織の中に前癌状態かもしれない好酸性変異病巣が見られたので同時に検討した。その結果、病巣部の核密度は他のものと比べて明らかに多く、細胞が異常増殖していたと考えられた。

これらの結果によりTCDDの母体負荷が、その児の肝臓発生過程に何らかの影響を及ぼしていることが明らかになった。(厚生科学研究費補助金による。)

Morphometric analysis of the hepatic tissue in rhesus monkeys exposed with TCDD in utero and lactational periods

Hiroshi Sumida¹⁾, Tsubasa Uetsuka¹⁾, Mineo Yasuda¹⁾, Keisuke Yamashita²⁾, Hideshi Tsusaki³⁾, Minoru Inouye³⁾

1) Faculty of Health Sciences, Hiroshima International University, 2) Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, 3) Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.

The current tolerable daily intake (TDI) of dioxin and dioxin related compounds (TCDD) has been set at 4 pg TEQ/kg/day. This value was calculated from the lowest-observed-adverse-effect level (LOAEL) in experimental animals, mostly rodents. However, due to great differences in the biological half life of TCDD between human and rodents, the validity of this calculation is questioned. Thus, the accumulation of the data for dioxin administration experiments to the primates is expected. For this purpose, pregnant rhesus monkeys received 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin subcutaneously on day 20 of gestation at an initial dose level of 300 ng/kg. Controls received the vehicle. For maintenance of a certain body burden, 5% of the initial dose was given to dams every 30 days during pregnancy and lactation until 90 days after delivery. On the present study, nuclear densities of the peripheral region of the central vein and the lobules of the liver were measured. The nuclear density of the exposed group was significantly different from that of the controls. Hepatic cells of the exposed group were irregular shaped and atrophic. Fatty degeneration was seen in many hepatic cells of the exposed group. On the other hand, a precancerous eosinophilic tissue was seen in a liver of the exposed group. The cells of the eosinophilic tissue were abnormally proliferated. These data revealed that TCDD distinctly affected with the liver development. (Supported by Health Science Research Grants for Research on Environmental Health from the Ministry of Health, Welfare and Labor of Japan.)