

厚生労働科学研究費補助金  
食品・化学物質安全総合研究事業

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 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 安田 峯生

平成 15 (2003) 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 暴露のアカゲザル外生殖器への影響に関する研究	----- 7
安田 峯生、杉原 数美	
2. 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 暴露のアカゲザル児の行動発育への影響に関する研究	----- 11
安田 峯生、浅岡 一雄	
3. 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 暴露による腎病変に関する研究	----- 17
隅田 寛、山下 敬介	
4. 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 暴露によるアカゲザル肝細胞の形態解析	----- 23
隅田 寛、山下 敬介	
5. 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及び口蓋ヒダ発生への影響に関する研究	---- 31
安田 峯生、浅岡 一雄	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 37
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 39

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の児について、外生殖器の発生・成長、神経行動学的発達、死亡児臓器の病理組織学的変化、死亡児の歯及び口蓋ヒダなどを観察した。300 ng/kg 群では流死産、生後死亡の頻度が高かった。外生殖器の発達、知能の発達には各群間に顕著な差は見られなかった。300 ng/kg 群死亡児の一部で腎臓及び肝臓に病理組織学的変化が認められ、また歯や口蓋ヒダの異常が観察された。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

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

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

ダイオキシン類の環境ホルモン様作用が疑われ、精子数の減少や子宮内膜症との関連が懸念されている。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

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、同様に TCDD を投与して第二産児（F1b）を得た。これらの児について以下の観察を行った。なお、これらの全てを平成 14 年度に行ったわけではないが、研究の全貌を理解しやすいように、前年度から継続している観察についても記載した。

- （1）外生殖器の発達：生後 1 日、90 日、270 日に肛門－生殖器間距離を測定した。
- （2）神経行動学的発達：生後 12～15 ヶ月齢で 4 段指迷路試験、13～15 ヶ月齢で新奇出会わせ試験、23～26 ヶ月齢でアイコンタクト試験を行った。

- (3) 死亡児臓器の病理組織学的変化: 生後死亡児について、主要臓器のパラフィン包埋ヘマトキシリン・エオシン染色標本を作製し、光学顕微鏡で観察した。
- (4) 死亡児歯及び口蓋ヒダの変化: 死産児及び生後死亡児の上下顎を切り出し、歯を実体顕微鏡及びX線で観察した。口蓋の口腔面にあるヒダの形態を実体顕微鏡で観察した。

#### 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

平成14年度末におけるアカゲザルの交配、分娩、生存状況を表1に示す。F1a児の多くは生後1000日に達している。F1b児は生後およそ200~300日である。各群の流死産、生後死亡を表2にまとめた。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。年度末に生存している児はF1aとF1bを合わせて対照群24匹、30 ng/kg群22匹、300 ng/kg群19匹である。

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) 肛門—生殖器間距離の測定

F1aオスの生後1日の肛門—陰茎基部間距離(mm)平均値が対照群で $37.6 \pm 1.8$ 、30 ng/kg群で $37.3 \pm 8.1$ 、300 ng/kg群で $31.3 \pm 8.4$ と、300 ng/kg群で短縮の傾向を示した。しかし、生後90日、生後270日と成長につれて対照群の値に近づいた。F1bでは生後1日の平均値が対照群で $56.6 \pm 5.2$ 、30 ng/kg群で $54.2 \pm 4.8$ 、300 ng/kg群で $56.9 \pm 7.2$ とF1aのような差は認められなかった。メス児の肛門—膣口間距離については、各群間に差は認められなかった。

##### 2) 神経行動学的発達評価

各群4匹をランダムに抽出して行った4段式指迷路試験では、馴化と練習課題を経た後には、いずれの群も90%以上の正反応率を示し、群間には有意差は認められなかった。各群オス・メス2匹ずつ選んだ児での出会わせ

15分間の行動を解析したところ、対照群では、ステレオ環境探索行動が、低用量群では他個体に接近・接触する友好的行動が、高用量群では移動する環境探索行動が、比較的多く観察された。各群オス・メス5匹(高用量群のみオス3匹)について行ったアイコンタクト試験では、いずれの群でもメスのアイコンタクト数が多い傾向が見られたが、TCDD投与の影響は認められなかった。

##### 3) 死亡児腎臓及び肝臓の病理組織学的変化

300 ng/kg群の2例(死亡時日齢406日、422日)で、両側性の腎臓形成異常が認められた。多くの腎小体が対照に比べて小さく、一部の腎小体が代償的に肥大していた。尿細管上皮には空胞化が認められ、間質が増生していた。コンピュータを用いた形態計測でも、300 ng/kg群では腎小体面積の平均値は対照群に比べて有意に小さく、分布にばらつきが大きいたことが確認された。また、300 ng/kg群の1例(死亡時日齢425日)で肝臓の好酸性変異病巣が認められた。また、3例の対照群児(死亡時日齢465日、435日、395日)と5例の300 ng/kg群児(死亡時日齢468日、425日、422日、406日、301日)肝臓の病理組織学的検査とコンピュータ解析で、300 ng/kgで肝細胞の肥大と脂肪蓄積を示唆する所見が得られた。

##### 4) 死亡児歯及び口蓋ヒダの変化

対照群4例、30 ng/kg群8例、300 ng/kg群8例の死産児と生後100日以内に死亡した乳児について、口腔内を観察したところ、対照群及び300 ng/kg群では特に異常は認められなかったが、300 ng/kgで3例に上顎切歯の早期萌出、動揺、歯根形成不全、欠如などの異常が認められた。これらの個体では口蓋ヒダの肥厚、分断、走行の乱れなどの異常も見られた。

#### D. 考察

肛門—生殖器間距離は多くのほ乳動物でオスでは長く、メスでは短い。オスでこれが短縮することはメス化を示すとされる。F1aオスの生後1日の肛門—生殖器間距離が300 ng/kg群で短縮の傾向を示したことから、TCDDの内分泌かく乱作用の影響が疑われた。しかし、成長とともにこの差は消失し、また、F1bでは各群間に差がみとめられなかったことから、300 ng/kgの母体負荷は児の外生殖器発育には顕著な影響は及ぼさないものと考え

えられる。

児の神経行動学的発達の観察により、アカゲザルでは生後1年で既に指迷路試験での知能評価が可能であること、300 ng/kg の母体体内負荷量でも、児の知能発達に悪影響を及ぼさないことが明らかになった。出合わせ試験では、群間の行動パターンに若干の差が認められ、対照群に比べてダイオキシン暴露群では環境への興味を示している傾向が見られたが、これは暴露群でむしろ行動の成熟が進んだのではないかと考えられる。アイコンタクト試験では、明らかな性差が認められたが、TCDD 投与による差は見られず、この指標で評価する限り、オス個体のメス化が起こっているとは考えられない。

生後1年以上経って死亡した300 ng/kg 群 F1a に2例の腎臓形成異常が認められたが、生後1年での血液生化学検査で、これらの個体の血液尿素窒素 (BUN) 値 (mg/dl) は45.3 及び98.2 と対照群の平均値  $26.9 \pm 6.5$  よりはるかに高く、生前から腎機能が低下していたことが分かった。2例で両側性的の変化が見られたことは、この変化がTCDDの影響によるものである可能性を示唆しており、今後、他の個体についても精査する必要がある。肝臓もダイオキシンの毒性に鋭敏に反応する器官であり、300 ng/kg 死亡児に見られた組織変化はTCDDの影響によるものである可能性が高い。

歯はダイオキシンの発生毒性に感受性の高い組織であることがげっ歯類の実験で明らかにされている。ヒトの疫学調査でダイオキシン類に暴露された集団で歯の異常の頻度が高まるとの報告があり、300 ng/kg 群死亡児の3例で歯の異常が見られたことは、注目に値する。今後、生存児での観察を進める予定である。また口蓋ヒダの形態変異はげっ歯類で発生毒性検出指標として有用であることが知られており、生存児での観察を合わせて評価する必要がある。

## 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1000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 の負荷では児の発生、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) Sugihara K, Yamada T, Kitamura S, Ohta S, Yamashita K, Okamura S, Yasuda M, Fujii-Kuriyama Y, Saeki K, Matsui S, Matsuda T: Ah-receptor-mediated induction of drug-metabolizing enzymes by indirubin and indigo. *Organohalogen Compounds*, 59, 453-456, 2002.

### 2. 学会発表

- 1) 安田峯生, 隅田寛, 浅岡一雄, 山下敬介, 角崎英志, 井上稔: ダイオキシン胎生期・授乳期暴露のアカゲザル生殖器発育への影響. 環境ホルモン学会第5回研究発表会要旨集, 355 (抄録), 2002. (環境ホルモン学会第5回研究発表会, 2002年11月25-26日, 広島)
- 2) 飯田景子, 釜中慶朗, 鈴木樹理, 渡辺邦夫, 安田峯生, 久保田俊一郎, 浅岡一雄: ダイオキシン類のサル子宮内膜におよぼす影響のDNAチップによる解析. 環境ホルモン学会第5回研究発表会要旨集, 109 (抄録), 2002. (環境ホルモン学会第5回研究発表会, 2002年11月25-26日, 広島)
- 3) 安田峯生, 隅田寛, 角崎英志, 井上稔, 山下敬介: ダイオキシン胎生期・授乳期暴露を受けたアカゲザル児の腎臓異常. 第42回日本先天異常学会学術集会抄録集, 107, 2002. (第42回日本先天異常学会学術集会, 2002年7月10-12日, 浜松)
- 4) Yasuda M, Koito A, Sumida H, Tsusaki H, Inouye M, Yamashita K: Renal

dysgenesis in rhesus monkeys exposed to dioxin during gestation and lactation. (22<sup>nd</sup> International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, August 11-16, Barcelona, Spain)

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	2003/3/31 日齢	備考
対照	1	1999/11/30	2000/5/9	161	♀				1056	
	2	1999/12/3	2000/5/18	167	♀				1047	
	3	1999/12/11	2000/5/30	171	♀		2001/8/29	456		F1 死亡
	4	1999/12/11	2000/5/23	164	♂				1042	
	5	1999/12/14	2000/2/12	60		胎児死亡				
	6	1999/12/15	2000/6/3	171	♀				1031	
	7	1999/12/15	2000/5/7	144	♀				1058	
	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	♀				1044	
	12	1999/12/19	2000/5/31	164	♀				1034	
	13	1999/12/23	2000/5/21	150	♂				1044	
	15	1999/12/28	2000/6/10	165	♀		2002/6/3	723		F1 死亡
	46	1999/12/31	2000/6/10	162	♀				1024	
	49	2000/1/28	2000/7/7	161	♀		2001/8/6	395		F1 死亡
	58	2000/1/10	2000/6/25	167	♀		2000/10/1	98		F1 死亡
	61	2000/1/16	2000/6/17	153	♂				1017	
	62	2000/1/17	2000/7/6	171	♂				998	
	63	2000/1/24	2000/7/6	164	♀				998	
	64	2000/1/29	2000/7/2	155	♂				1002	
30ng/kg	16	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	♀				1038	
	19	1999/12/9	2000/5/13	156	♂				1052	
	20	1999/12/11	2000/5/22	163	♀	死産				
	21	1999/12/15	2000/5/22	159	♀				1043	
	22	1999/12/18	2000/5/30	164	♂				1035	
	23	1999/12/19	2000/6/3	167	♀				1031	
	24	1999/12/28	2000/6/3	158	♂		2000/11/10	160		F1 死亡
	25	1999/12/22	2000/5/25	155	♂				1040	
	26	1999/12/22	2000/6/10	171	♀		2002/8/25	806		F1 死亡
	27	1999/12/25	2000/6/17	175	♂				1017	
	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	♀				1027	
	47	1999/12/31	2000/6/10	162	♂				1024	
	50	2000/1/2	2000/6/22	172	♀	死産				
	53	2000/1/4	2000/6/18	166	♂				1016	
	59	2000/1/11	2000/6/18	159	♀				1016	
	65	2000/3/3	2000/8/14	164	♀				959	
300ng/kg	31	1999/11/28	2000/5/17	171	♂				1048	
	32	1999/11/30	2000/5/16	168	♂		2001/8/27	468		F1 死亡
	33	1999/12/1	2000/4/29	150	♀				1066	
	34	1999/12/6	2000/4/12	128		流産				
	35	1999/12/12	2000/5/22	162	♀				1043	
	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	♀				1028	
	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	♂				1033	
	43	1999/12/23	2000/6/16	176		死産				
	44	1999/12/25	2000/6/1	159	♂				1033	
	45	1999/12/27	2000/6/11	167	♂		2001/8/6	421		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	♂				1008	
	66	2000/2/25	2000/8/15	172	♂				958	
	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				
	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	♀				306	
	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	♂				297	

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	2003/3/31 日齢	備考	
対照	1b	2002/3/4	2002/8/17	166	♂				226		
	2b	2002/2/5	2002/7/22	167	♀				252		
	3b	2001/11/29	2002/5/10	162	♀				325		
	4b	2002/3/3	2002/8/18	168	♂				225		
	5b	2002/1/13	2002/2/13	31		流産					
	6b										
	7b	2001/12/8	2002/5/6	149		死産					
	8b										
	9b	2002/1/31	2002/7/17	167	♀					257	
	10b										
	11b	2001/12/27	2002/6/13	168	♂					291	
	12b										
	13b	2001/12/5	2002/1/1	27		流産					
	14b										
15b	46b	2001/12/11	2002/5/24	164	♀				311		
16b	49b	2001/12/14	2002/6/2	170	♀				302		
17b											
18b	61b	2002/1/25	2002/7/5	161	♀				269		
19b											
20b	63b	2002/2/2	2002/7/16	164	♀				258		
21b	64b	2002/2/4	2002/7/15	161	♀				259		
30ng/kg	16b	2001/12/23	2002/5/20	148		死産					
	17b										
	18b	2001/12/11	2002/1/5	25		母体死亡					
	19b										
	20b	2001/12/12	2002/5/29	168	♀				306		
	21b	2002/1/21	2002/7/7	167	♂				267		
	22b	2001/12/10	2002/1/4	25		流産					
	23b	2001/12/7	2002/5/18	162	♀				317		
	24b	2001/12/31	2002/6/3	154	♂				301		
	25b	2002/1/23	2002/7/7	165	♂				267		
	26b	2001/12/6	2002/5/23	168	♀				312		
	27b	2002/1/22	2002/7/12	171	♂				262		
	28b										
	29b										
30b	47b	2002/2/9	2002/7/13	154	♂				261		
31b	50b	2002/1/6	2002/6/23	168	♀				281		
32b	53b	2001/12/19	2002/5/27	159		死産					
33b	59b	2002/1/4	2002/6/12	159		死産					
34b	65b	2001/12/17	2002/6/3	168	♂				301		
300ng/kg	31b	2002/2/4	2002/7/15	161	♂				259		
	32b	2001/12/13	2002/5/24	162		死産					
	33b	2002/1/3	2002/6/6	154	♀				298		
	34b										
	35b	2002/1/25	2002/6/21	147	♀				283		
	36b										
	37b	2001/12/3	2002/1/18	46		流産					
	38b	2002/1/19	2002/6/11	143	♂				293		
	39b	2001/12/22	2002/6/9	169	♀				296		
	40b										
	41b	2002/2/21	2002/4/22	60		胎児死亡					
	42b	2001/12/10	2002/5/22	163	♂				313		
	43b										
	44b	2002/1/11	2002/6/24	164	♂				280		
45b	2001/12/15	2002/6/2	169	♂				302			
46b	2001/12/25	2002/6/16	173	♂				288			
47b											
48b	60b	2002/1/16	2002/7/4	169	♂		2002/7/29	25		F1 死亡	
49b	66b	2002/1/22	2002/6/14	143		死産					
50b											
51b	68b	2002/1/27	2002/7/15	169	♂				259		



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  
アカゲザル外生殖器への影響に関する研究

分担研究者 安田 峯生  
杉原 数美

広島国際大学保健医療学部教授  
広島大学医学部総合薬学科教務員

**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の児について、生後 1 日、90 日、270 日に肛門-生殖器間距離を測定した。F1a オスの生後 1 日の肛門-陰茎基部間距離 (mm) 平均値が対照群で  $37.6 \pm 1.8$ 、30 ng/kg 群で  $37.3 \pm 8.1$ 、300 ng/kg 群で  $31.3 \pm 8.4$  と、300 ng/kg 群で短縮の傾向を示した。しかし、生後 90 日、生後 270 日と成長につれて対照群の値に近づいた。F1b では生後 1 日の平均値が対照群で  $56.6 \pm 5.2$ 、30 ng/kg 群で  $54.2 \pm 4.8$ 、300 ng/kg 群で  $56.9 \pm 7.2$  と F1a のような差は認められなかった。メス児の肛門-膣口間距離または膣口については、各群間に差は認められなかった。この結果から、TCDD 30 ng/kg または 300 ng/kg の母体負荷は児の外生殖器発達には影響しないものと考えられる。

#### A. 研究目的

ダイオキシン類には内分泌かく乱作用があるとされ、状況によってはエストロゲン様作用を示す。本研究の目的は、妥当なダイオキシン類の耐容一日摂取量 (TDI) TDI 決定のための基礎的なデータを得ることである。妊娠アカゲザルに 30 または 300 ng/kg という微量の 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ているが、その一環として、オスのメス化の指標となる肛門-生殖器間距離や陰茎長など、外生殖器の発達を観察した。

#### 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 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、同様に TCDD を投与して第二産児 (F1b) を得た。これらの児について生後 1 日、90 日、270 日に肛門-生殖器間距離、陰茎長をノギスで測定した。オスの肛門-生殖器間距離は肛門から陰茎基部までを測定した。メスの肛門-生殖器間距離は肛門から膣口までと肛門から陰核までの 2 種類測定した。

#### 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

各群の計測結果を表 1 に示す。

F1a オスの生後 1 日の肛門-陰茎基部間距離 (mm) 平均値が対照群で  $37.6 \pm 1.8$ 、30 ng/kg 群で  $37.3 \pm 8.1$ 、300 ng/kg 群で  $31.3 \pm 8.4$  と、300 ng/kg 群で短縮の傾向を示した。しかし、生後 90 日、生後 270 日と成長につれて対照群の値に近づいた。F1b では生後 1 日の平均値が対照群で  $56.6 \pm 5.2$ 、30 ng/kg 群で  $54.2 \pm 4.8$ 、300 ng/kg 群で  $56.9 \pm 7.2$  と F1a

のような差は認められなかった。F1a オスの生後1日の陰莖長(mm)平均値が対照群で20.6±2.9、30 ng/kg 群で21.5±4.5、300 ng/kg 群で19.4±3.0 と、300 ng/kg 群で僅かに短く、この傾向は生後270日でも認められた。メス児の肛門-腔口間距離については、各群間に差は認められなかった。生後1日F1b オスの肛門-陰莖基部間距離はF1aのそれに比べて長く、陰莖長は逆にF1aよりも短かった。メスでの計測値には、F1aとF1b間に著差はなかった。

#### D. 考察

肛門-生殖器間距離は多くのほ乳動物でオスでは長く、メスでは短い。オスでこれが短縮することはメス化を示すとされる。F1a オスの生後1日の肛門-生殖器間距離が300 ng/kg 群で短縮の傾向を示したことから、TCDDの内分泌かく乱作用の影響が疑われた。しかし、成長とともにこの差は消失し、また、F1bでは各群間に差がみとめられなかった。陰莖長についても300 ng/kg 群で短縮の傾向が認められたが、有意な差ではなかった。測定値にはかなりのばらつきがあり、とくにF1aとF1bの測定値にかなりの差が認められることから、測定者による差がある可能性が考えられる。アカゲザルでの肛門-生殖器間距離はげっ歯類のように信頼性の高い指標とはいえないようである。これらの所見を総合的に評価すると、300 ng/kgの母体負荷は児

の外生殖器発育には顕著な影響は及ぼさないものと考えられる。

#### 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の外生殖器の発達には現時点で明確な影響は認められず、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

なし。

##### 2. 学会発表

- 1) 安田峯生, 隅田寛, 浅岡一雄, 山下敬介, 角崎英志, 井上稔: ダイオキシン胎生期・授乳期暴露のアカゲザル生殖器発育への影響. 環境ホルモン学会第5回研究発表会要旨集, 355(抄録), 2002. (環境ホルモン学会第5回研究発表会, 2002年11月25-26日, 広島)

#### H. 知的財産所有権の出願、登録状況

なし。

表1 胎生期・授乳期に TCDD に暴露された児の外生殖器の発育

表1-1 F1a オス

群	生後1日			生後90日			生後270日		
	例数	陰茎基部まで (mm)	陰茎長 (mm)	例数	陰茎基部まで (mm)	陰茎長 (mm)	例数	陰茎基部まで (mm)	陰茎長 (mm)
対照	5	37.6±1.8	20.6±2.9	5	51.0±4.8	22.0±1.6	5	56.6±4.4	27.4±6.3
30ng/kg	8	37.3±8.1	21.5±4.5	8	51.8±6.0	23.4±5.3	7	55.1±5.2	27.0±5.3
300ng/kg	8	31.3±8.4	19.4±3.0	8	47.8±6.4	21.8±2.5	8	54.0±3.1	23.5±1.5

表1-2 F1a メス

群	生後1日			生後90日			生後270日		
	例数	膣口まで (mm)	陰核まで (mm)	例数	膣口まで (mm)	陰核まで (mm)	例数	膣口まで (mm)	陰核まで (mm)
対照	13	12.2±3.0	20.3±1.7	13	15.0±2.3	25.8±3.4	12	18.9±2.6	31.8±4.3
30ng/kg	7	10.9±1.7	20.6±1.7	7	13.1±2.0	26.3±2.3	7	20.0±3.7	32.1±2.5
300ng/kg	7	11.7±2.4	19.9±2.0	6	15.3±2.2	25.7±2.9	6	20.8±3.0	31.8±4.1

表1-3 F1b オス

群	生後1日		
	例数	陰茎基部まで (mm)	陰茎長 (mm)
対照	3	56.6±5.2	13.1±2.7
30ng/kg	6	54.2±4.8	12.9±1.7
300ng/kg	8	56.9±7.2	11.9±2.1

表1-4 F1b メス

群	生後1日		
	例数	膣口まで (mm)	陰核まで (mm)
対照	8	11.4±1.0	21.2±0.9
30ng/kg	4	11.4±2.0	21.4±1.5
300ng/kg	3	11.0±1.0	22.3±0.9

注：オスの肛門－生殖器間距離は肛門から陰茎基部までを測定した。

メスの肛門－生殖器間距離は肛門から膣口までと肛門から陰核までの2種類測定した。

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）  
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  
アカゲザル児の行動発育への影響に関する研究

分担研究者 安田 峯生 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 吉川 泰弘 東京大学大学院農学生命科学研究科)

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の児について、生後 12~15 ヶ月齢で 4 段指迷路試験、13~15 ヶ月齢で新奇出合わせ試験、23~26 ヶ月齢でアイコンタクト試験を行った。指迷路試験では、馴化と練習課題を経た後には、いずれの群も 90%以上の正反応率を示し、群間には有意差は認められなかった。児を出合わせ 15 分間の行動を解析したところ、対照群ではステレオ環境探索行動が、低用量群では他個体に接近・接触する友好的行動が、高用量群では移動する環境探索行動が、比較的多く観察された。アイコンタクト試験では、いずれの群でもメスのアイコンタクト数が多い傾向が見られたが、TCDD 投与の影響は認められなかった。これらの結果から、300 ng/kg の母体体内負荷量でも、児の知能発達に悪影響を及ぼさないことが明らかになった。出合わせ試験では、対照群に比べてダイオキシン暴露群では環境への興味を示している傾向が見られたが、これは暴露群でむしろ行動の成熟が進んだのではないかと考えられる。アイコンタクト試験では、明らかな性差が認められたが、TCDD 投与による影響は見られず、この指標で評価する限り、オス個体のメス化が起こっているとは考えられない。以上の結果から、現在の 4 pg/kg/日の TDI は妥当なものといえる。

#### A. 研究目的

ダイオキシン類の胎生期・授乳期暴露により、児の知能低下、行動異常が誘発されるのではないかと懸念が社会に広がっている。げっ歯類や霊長類でダイオキシン類が神経行動学的影響を及ぼしたとの報告もなされている。本研究の目的は、げっ歯類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、児の生後の行動を観察することにより、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。

#### 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。生後 12~15 ヶ月齢で 4 段指迷路試験、13~15 ヶ月齢で新奇出合わせ試験、23~26 ヶ月齢でアイコンタクト試験を行った。各試験の方法を以下に記述する。

##### 1) 4 段指迷路試験

各群 4 匹の子ザルを選び、図 1 に示す非修正法型 4 段指迷路を施行した。その手続きは次のとおりである。

馴化:実験装置と実験者に馴れさせるために、餌箱丈夫からリンゴ片を落とし、これを拾わせる訓練を2日間行う。

訓練1:迷路第1段中央に置かれた報酬(リンゴ片)を指先で移動させ、餌箱へ落とす訓練。15試行からなるセッションを1日2回。2セッション連続で14試行以上正試行であることを習得基準とした(以下同様)。

訓練2:迷路第2段中央に置かれた報酬を指先で移動させ、餌箱へ落とす訓練。

訓練3:迷路第3段中央に置かれた報酬を指先で移動させ、餌箱へ落とす訓練。

訓練4:迷路第4段中央に置かれた報酬を指先で移動させ、餌箱へ落とす訓練。

ランダムテスト:迷路第1段から第4段までのいずれかに擬似ランダムな順序で報酬を置き、餌箱へ落とすことができるか否かをテスト。

## 2) 新奇出合わせ試験

各群オス2匹、メス2匹の子ザルについて試験した。実験装置と試行の様子を図4に示す。幅122 cm、奥行き75 cm、高さ69 cmの透明なアクリル製ケージの中央部に取り外せるステンレス板とアクリル板の仕切が付けられている。この仕切の両側に子ザルを1匹ずつ入れ、10分間馴化させる。に2匹の子ザルを入れ、まずステンレス板のみを外し、5分間お互いに姿が見えるが直接の接触はできない状態に置く。その後アクリル板も外してお互いに接触可能な状態にする。15分間そのままに保ち、その間の行動をビデオカメラで撮影する。行動を社会行動32種類、その他8種類に分類し、その頻度を解析した。第1回試験から12ヶ月後に第2回試験を行った。

## 3) アイコンタクト試験

合計28匹の子ザルについて試験した。試験の様子を図6に示す。ケージの前面から85 cm離れて試験者が座り、1分間に子ザルと目の合う回数を数えた。

## 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

### 1) 指迷路試験

各群4匹をランダムに抽出して行った4段式指迷路試験の結果を各子ザルについて図2に示す。図の上部に各子ザルの動物番号が表示されている。習得の進行にはかなりの個体差が認められたが、どの個体も訓練を経るにつれて正反応率が上昇することが分かる。図3に群別の正

反応率を示す。馴化と練習課題を経た後には、いずれの群も90%以上の正反応率を示し、群間には有意差は認められなかった。また、2回の試行の間にも顕著な差は認められなかった。

### 2) 新奇出合わせ試験

各群オス・メス2匹ずつ選んだ児を出合わせして15分間の行動を解析した結果を図5に示す。群間の行動パターンに若干の差が認められ、対照群では、ステレオ環境探索行動が、低用量群では他個体に接近・接触する友好的行動が、高用量群では移動する環境探索行動が、比較的多く観察された。1回目と2回目を比較すると、どの群でも2回目が自己中心性行動が高まる傾向が認められた。

### 3) アイコンタクト試験

各群オス・メス5匹(高用量群のみオス3匹)について行ったアイコンタクト試験では、いずれの群でもメスのアイコンタクト数が多い傾向が見られたが、TCDD投与の影響は認められなかった。

## D. 考察

児の神経行動学的発達の観察により、アカゲザルでは生後1年で既に指迷路試験での知能評価が可能であること、300 ng/kgの母体体内負荷量でも、児の知能発達に悪影響を及ぼさないことが明らかになった。出合わせ試験では、対照群に比べてダイオキシン暴露群では環境への興味を示している傾向が見られたが、これは暴露群でむしろ行動の成熟が進んだのではないかと考えられる。1回目と2回目の差は、約1年間の行動面での成長を示したものであろう。アイコンタクト試験では、明らかな性差が認められたが、TCDD投与による差は見られず、この指標で評価する限り、オス個体のメス化が起きているとは考えられない。

## 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の認知・行動評価では、発育個体の社会性に影響がある可能性が示唆されたが、児の知能や警戒心に悪影響を与えないことが示された。この結果から、現行のTDIは妥当なものであることが示唆された。

G. 研究発表

なし。

H. 知的財産所有権の出願、登録状況

なし。

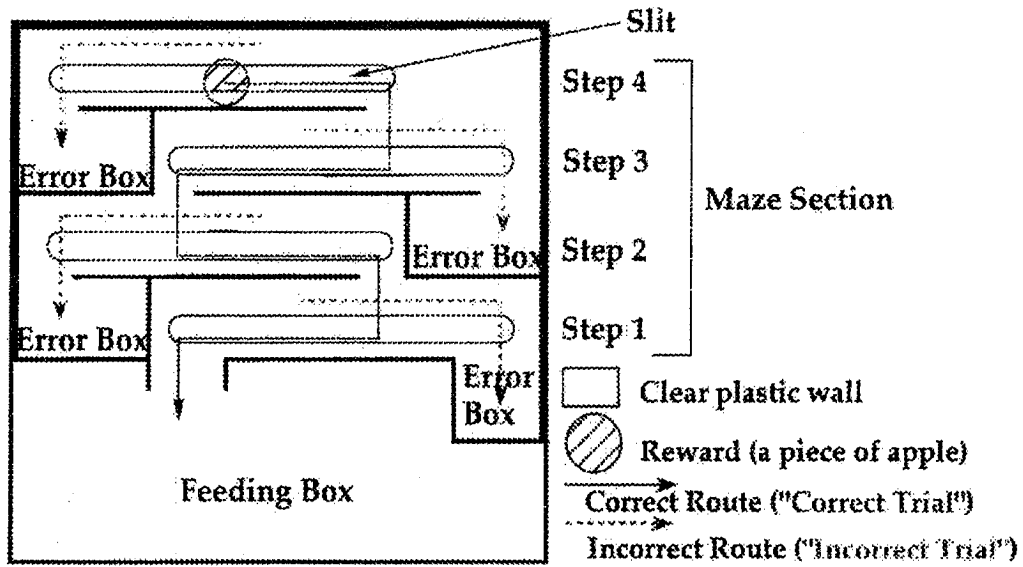


図1 4段指迷路試験装置

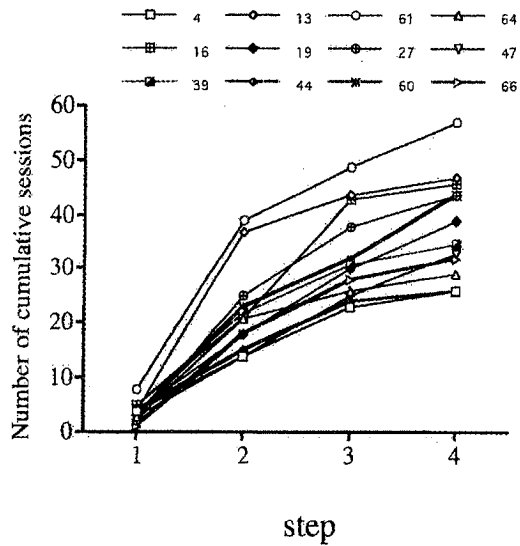


図2 各個体が4段目まで到達する累積度数

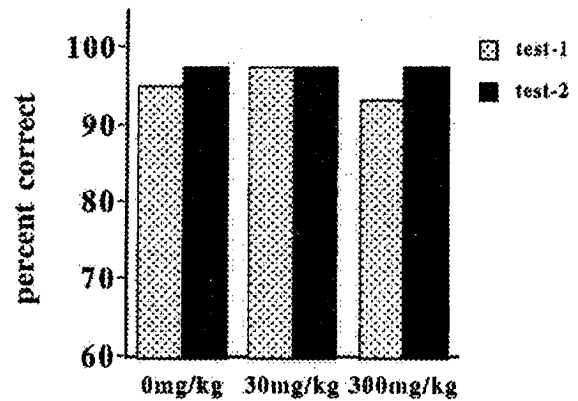


図3 各群の正反応率

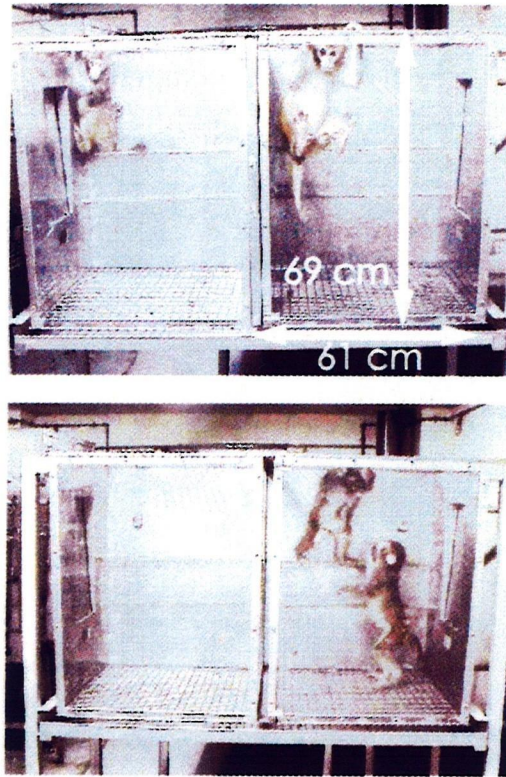


図4 新奇出合わせ試験の様子。上図中央の隔壁を取り、その後の2匹の行動を観察する。

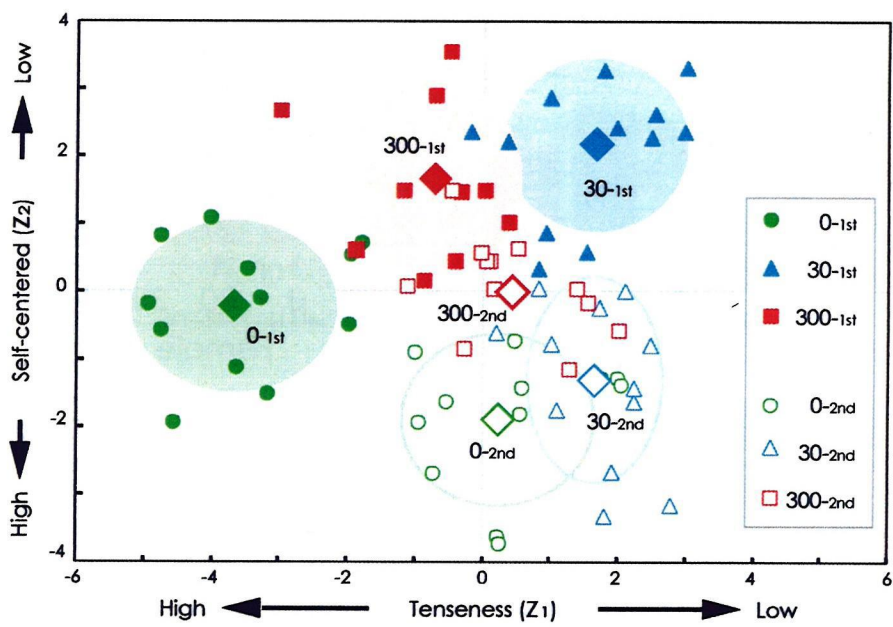


図5 新奇出合わせ試験の結果を示す散布図  
 横軸には緊張度を示す。右へ行くほど緊張度は低い。  
 縦軸には自己中心性を示す。上へ行くほど自己中心性は低い。



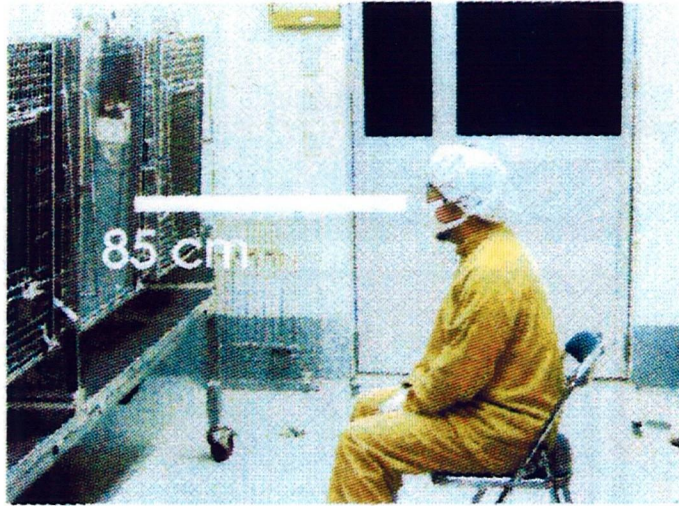


図6 アイコンタクト試験の様子

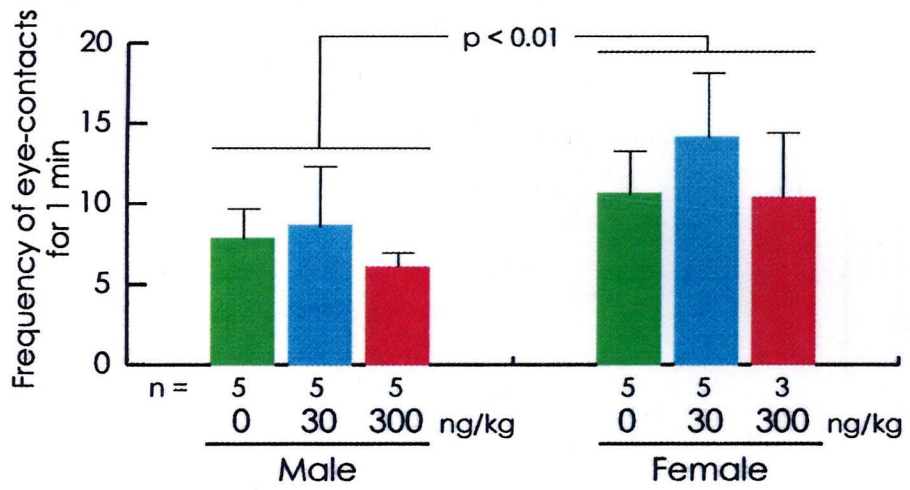


図7 アイコンタクト試験結果

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病変に関する研究

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： 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。本研究では、一定の体内負荷量になるように、妊娠したアカゲザルにダイオキシン類の中でも最も毒性の強い2,3,7,8-四塩化ジベンゾパラジオキシン (以下 TCDD) を妊娠 20 日に 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る影響を調べた。生後死亡した対照児 (死亡日齢 432 日) と TCDD 暴露を受けた児 (死亡日齢 425 日) の腎臓の組織切片標本からそれぞれ腎小体の個数、その面積を数値化し、その差を比較、検討した。

その結果、TCDD 暴露を受けた児の腎には異形成が認められた例が確認された。正常な児のそれに比べ、TCDD 暴露による異形成腎には変形した腎小体が多く認められた。腎小体の個数に大きな違いは見られなかったが、異形成腎の腎小体の面積は小さいものが多く、ばらつきも大きかった。BUNの数値から、異形成腎は児の生前から腎機能が著しく低下していたことが判明した。以上の結果より TCDD300 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

ダイオキシン類は消化管、皮膚及び肺から吸収され、ヒトは日常生活でのダイオキシン類の総摂取量の 90%以上を経口摂取している。一般にダイオキシン類は代謝されにくく、代謝には大きな種差がある。ダイオキシン類の発生毒性のメカニズムは、十分に解明されている段階には至っていないが、アリーール炭化水素受容体 (AhR) の

仲介で DNA の特定部位に結合し、遺伝子の発現を乱して、哺乳類に奇形を生じるなどの影響を及ぼしていると考えられている。つまり、妊娠 AhR ノックアウトマウスと野生型のマウスにダイオキシンを投与すると、野生型のマウスにはその仔に尿管異常、口蓋裂、水腎症などの異常が惹起されるが、ノックアウトマウスではこれらの異常は出現しない。ダイオキシン類はヒトにおいて

も発ガン性や催奇形性が疑われている。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  $4 \text{ pg/kg}$  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。この実験において生後死亡した児の中に腎の異形成が認められた例があった。この研究では、腎異形成例の微細構造を対照腎と比較することで、腎発生にあた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 $300 \text{ ng/kg}$  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。このように母動物の体内負荷量を一定に保つように投与し、生後死亡した 1 例の児 (♀、生後 425 日に死亡) と対照群で生後死亡した 1 例 (♀、生後 432 日に死亡) の腎臓のパラフィン包埋ヘマトキシリン-エオシン染色組織切片標本を材料に、腎小体の個数、その面積を数値化した。

顕微鏡にデジタルカメラを装着し、各群 1 枚の組織切片につき撮影範囲が重ならないよう、かつ腎断面全体をカバーするように撮影し、パーソナルコンピューターに取

り込んだ。1 画像で撮影された範囲は  $2.9 \text{ mm} \times 3.3 \text{ mm}$  であった。その画像を Scion Image を使用して腎小体の個数と面積を算出した。面積は対物マイクロメーターの写真を利用しキャリブレーションを行った。

また生後 12 ヶ月に血液尿素窒素 (BUN) を調べた。

## 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 25% に出現した割合となる。

顕微鏡所見において異形成が認められた腎の腎小体は、対照腎のそれに比べ変形が認められた。ボウマン囊の上皮には対照群と比較して変化は認められなかった。また腎表面に凹凸が認められ、腎線維被膜の肥厚と剥離も同時に認められた (図 1, 2)。異形成腎は線維化の傾向があった。皮質においては、特に血管周囲の間質の増殖が顕著であった。皮質の萎縮は認められなかったが、一部、尿細管の萎縮と消失が認められた (図 1, 2)。髄質の線維化は部位によっては著しく、腎細管がほとんど消失している部も観察された。

計測の結果、単位面積あたりの腎小体の個数は対照腎と異形成腎とでほぼ同数であり、有意差はみられなかった。しかし腎小体の面積には対照腎と異形成腎の間に差が認められた (図 3)。対照腎の腎小体面積の平均は  $9.2 \pm 3.3 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$  で、 $9 \sim 10 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$  の面積を有する腎小体が最も多く認められた (図 3)。また面積の最小値は  $3 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$ 、最大値は  $16 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$  であった。一方、異形成腎の平均腎小体面積は

6.8±5.3×10<sup>-3</sup> mm<sup>2</sup>、モード値は3~4×10<sup>-3</sup> mm<sup>2</sup>で対照腎に比較して腎小体の明らかな萎縮が認められた(図3)。また、異形成腎の腎小体面積のばらつきは大きく、対照腎には認められない非常に萎縮した腎小体(1~2×10<sup>-3</sup> mm<sup>2</sup>)が認められた一方で、一部は22×10<sup>-3</sup> mm<sup>2</sup>と肥大していた(図3)。対照腎と異形成腎の腎小体面積の分散、平均値とも統計的検定(t検定)で有意差が認められた(p<0.01)。

生後12ヶ月に行われた血液生化学検査において、血中尿素窒素の値がTCDD暴露により腎異形成が認められた児では45.3 mg/dlであり、対照群平均値26.9 ±6.5 mg/dlより高かった。

#### D. 考察

本研究結果から、TCDD暴露群の腎に異形成が生じる可能性があることが判明した。異形成腎では、特に腎小体の矮小化が著しかった。本研究では薄切された腎小体を計測対象としているので、仮に全ての腎小体の大きさが同じだとしても、切片上に現れる面積にはばらつきが生じる。しかし異形成腎の腎小体面積の分布は、対照群と比べ明らかに異なっており、腎小体の多くが萎縮していたと考えられる。BUN量から、異形成腎は生前から機能低下していたと考えられる。萎縮した腎小体が機能低下の原因であることが示唆される。また、異形成腎では著しく萎縮した腎小体が多いのかかわらず、腎小体面積の平均値がモード値よりも比較的大きいのは、一部に肥大化した腎小体が認められるためである。この腎小体の肥大は萎縮した腎小体の機能低下を補うため、代償的に生じたものかもしれない。

腎発生の過程はまず初期の尿管芽が伸び

るところから始まり、この誘導作用で造腎間葉内にボーマン嚢が形成される。その中に血管が陥入して糸球体となり、両者が腎小体を形成する。観察した切片上での腎小体の数に大きな差は無かったところから、腎の初期発生における尿管芽の分枝は正常に進行し、その後の腎小体の分化、成長の過程がTCDDにより障害されたと推測される。TCDDの胎生期暴露はマウスで腎臓障害を起こすことが知られているが、これは尿管上皮の過形成によって尿管狭窄が生じ、その結果尿が腎盂に溜まり二次的に水腎症を起こしたものである。今回観察されたアカゲザルでの腎障害は水腎症に特徴的な所見は得られておらず、マウスに認められる腎障害とは明らかに発生病理過程が異なるものと考えられる。

異形成腎では、腎小体の萎縮の他に、間質の増殖が認められ、線維化をおこしていたと考えられる。一部の尿細管は線維化のために消失しており、腎機能低下の原因の一部であった可能性が高い。特に髄質においてはほとんど腎細管が消失していた部もあり、最終的にはこの異形成腎はほとんど機能が失われていたかも知れない。間質の増殖は、特に血管周囲に著しかったが、その原因は不明である。一方、TCDDはTGF-βの過剰発現を引き起こすことが報告されている。TGF-βの過剰発現は種々の器官に線維化を生じさせるという報告があり、異形成腎に認められた線維化もTCDDによりTGF-βの過剰発現を介して引き起こされた可能性がある。

#### E. 結論

胎生・授乳期のアカゲザルにTCDD300 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。

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, in press)

##### 2. 学会発表

- 1) 安田峯生、隅田寛、角崎英志、井上稔、  
山下啓介： ダイオキシン胎生期・授  
乳期暴露を受けたアカゲザル児の腎臓  
異常。第42回日本先天異常学会学術集  
会抄録集、107 (抄録)、2002。(第42  
回日本先天異常学会学術集会、2002年  
7月10-12日、浜松)

- 2) Yasuda M, Koito A, Sumida H,  
Tsusaki H, Inoue M, Yamashita K:  
Renal dysgenesis in rhesus  
monkeys exposed to dioxin during  
gestation and lactation. (22<sup>nd</sup>  
International Symposium on  
Halogenated Environmental  
Organic Pollutants and POPs,  
August 11-16, Barcelona, Spain)

#### 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       なし

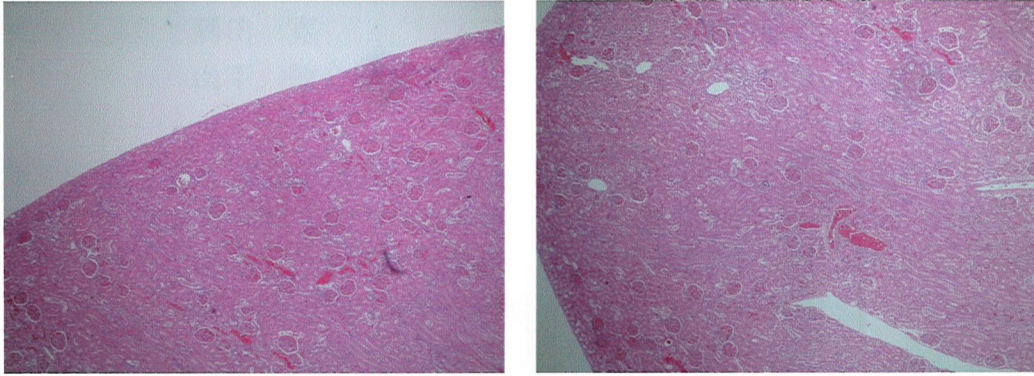


図1 対照腎の顕微鏡写真

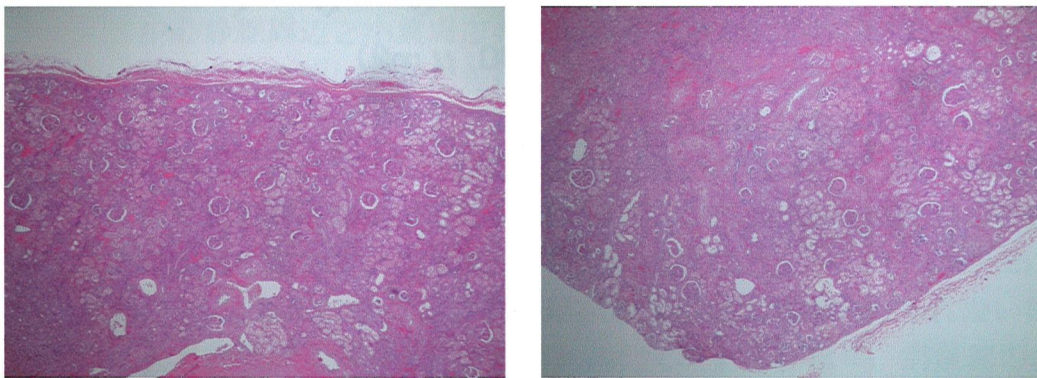


図2 異形成腎の顕微鏡写真

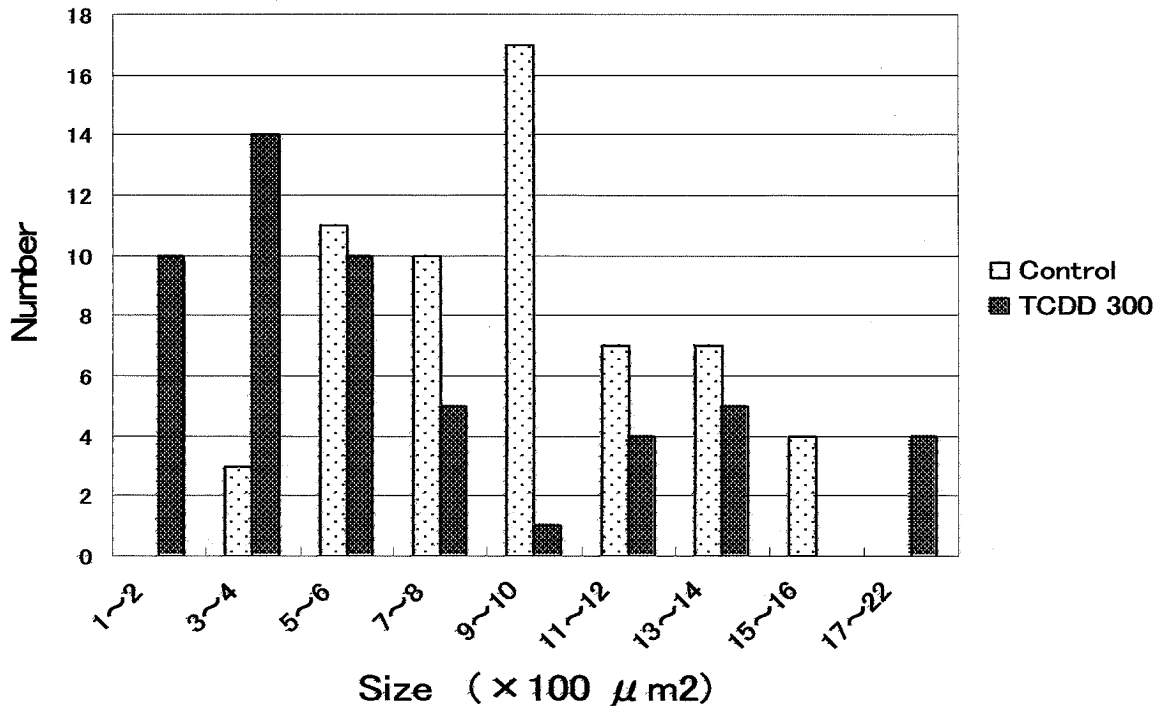


図3 対照腎と異形成腎に認められた異形成腎の糸球体面積

2,3,7,8-四塩化ジベンゾパラジオキシン(TCDD)の胎児・授乳期暴露による  
アカゲザル肝細胞の形態解析

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： 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。TCDDは肝臓に蓄積することが知られているので、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、病巣部の核数・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確になった。

#### A. 研究目的

ダイオキシン類は生殖機能の低下、発癌や腫瘍の形成、免疫抑制などの様々な生体への影響を引き起こす非常に毒性の強い物質であり、ラットでの試験で肝細

胞癌の発生が報告されている。また、ダイオキシン類は肝細胞の肥大や脂質代謝異常などの肝毒性を示すことがよく知られている。

一方で、多くの動物実験により、ダイ



オキシシン類の生殖毒性に対する感受性は胎生期にきわ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シン類の耐容一日摂取量(TDI)を定めた際には、胎生期に TCDD 暴露を受けたラットの生殖器系の異常を調べた実験データが大ききよりどころとなった。その最小毒性量での妊娠中の母体の体内負荷量がおよそ 86 ng/kg であったところから、ヒトでこれに等しい体内負荷量に達するために必要な一日摂取量が 43.6 pg/kg と算定された。これを不確実係数 10 で割り、4 pg/kg を TDI としたのである。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、同様の毒性が見られるか否かを検討した実験はない。本研究の第一の目的は、体内負荷量がほぼ一定になるような条件で妊娠アカゲザルに 30 または 300 ng/kg という微量の TCDD を投与し、その児の生後発育と生殖機能を調べることにより、どの程度の母体体内負荷量で児にどのような影響が認められるのか、その関係を明らかにすることである。

ダイオキシシン類の主たる吸収経路は、消化管、皮膚、肺である。どの吸収経路においても、ダイオキシシンの吸収は動物の種類、溶媒の種類、異性体、食餌に含まれる共存物質、投与量、年齢などによって異なり、摂取されたダイオキシシン類は血流にのって各組織に到達する。異性体や投与量によって多少異なるが、ダイオキシシン類は主に肝と脂肪組織に蓄積する。どちらにより多く蓄積するかは実験動物とヒトでは異なり、ヒトにおいては脂肪により多く、モルモットを除く実験動物では肝により多く蓄積する。

ダイオキシシン類は Ah 受容体を介して CYP1A1 や CYP1A2 等の肝等から供給されるシトクロム P450 として分離され

る酵素を誘導し、特に、CYP1A2 はダイオキシシンと結合する。これらの酵素とダイオキシシンの作用メカニズムが、ダイオキシシン類の肝への蓄積や毒性の発見メカニズムと深いかかわりを持つ。ダイオキシシン類の生体内移動を決定する因子としては、脂肪組織への溶解度及び拡散速度、肝の CYP1A2 への結合、排泄、及び代謝がある。

そこで今回、TCDD に暴露されたアカゲザル児の肝細胞への影響を検討することにした。ダイオキシシン類の中で最も毒性の強い 2,3,7,8-四塩化ジベンゾパラジオキシシン(TCDD)はこれまで研究に用いられたすべての動物種において肝細胞の過形成と肥大を生じることが知られているが、小葉内での局所的な細胞毒性の差違については詳細な報告が少ない。そこで、胎生・授乳期を通じて TCDD 暴露を受けたアカゲザル児の肝臓組織切片で、肝細胞核密度の小葉内部位差を調べた。

また、前癌状態と思われる病変が発見されたので、同様に検討を加えた。

## B. 研究方法

アカゲザルの妊娠 20 日に TCDD 300 ng/kg を皮下投与し、その後 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。妊娠を維持した母サルは自然分娩させ、児を哺育させた。TCDD 投与は分娩後 90 日まで継続した。その生育過程にて死亡した児を解剖し、その各臓器を組織切片にして今回の研究に供した。

光学顕微鏡下でパラフィン包埋ヘマトキシリン・エオシン染色組織切片標本を観察し、中心静脈周辺と小葉周辺の細胞をデジタルカメラで撮影し、画像データをパソコンに取り込んだ。Photoshop で画像処理し、1 標本につき無作為に選ん

だ2つの中心静脈と小葉の周辺の肝細胞の核数を Scion Image でカウントし、同時に面積を計測した。面積は対物マイクロメーターの計測値で補正し、核密度を求めた。好酸性変異病巣部と非病巣部の任意の部についても同様に核密度を求めた。

### C. 研究結果

中心静脈周辺の核密度および小葉間周辺の核密度とも、TCDD 暴露群の方が対照群よりも有意に小さかった ( $p < 0.05$ ) (表 1、図 1)。しかし、対照群、TCDD 暴露群共に中心静脈周辺と小葉間周辺での核密度に差は認められなかった。特に対照群については、中心静脈周辺と小葉間周辺の平均核密度は同じ数値であった。

微細形態的所見では、TCDD 暴露群の肝細胞は対象群に比べて不整であった (図 2)。類洞の発達は悪くないが、肝細胞索の構造に関して、細胞間隙が認められ、細胞間の連結に乏しい印象があった。また、暴露群の肝細胞には、細胞質に泡沫状空胞の構造が認められるものが多かった。これら空胞は比較的大型で、脂肪変性が疑われた。また、大型空胞を有する細胞で核の認められない細胞も多く観察された。しかし炎症像は示しておらず、好中球やリンパ球などの組織内浸潤は認められず、線維化も認められなかった。

一方、TCDD 暴露群の 1 例に、好酸性の変異病変が認められた。この病巣の核密度を計測して非病巣部のそれと比較検討した (図 3)。肝臓の非病巣部に比較して、病巣部の核密度は著しく高値を示した。したがって、細胞の増殖は形態的観察によっても十分に確認できた (図 4, 5)。病巣部の細胞の核の大小不同や著しい異型性は認められず、また病巣と周囲の境は明瞭であった。また、病巣部では細胞の大きさが相対的に減少し、細胞内

小器官の減少が認められた。病巣部の内外を比較・検討すると、病巣の周辺部で細胞の異常増殖が起こっており、中心部ではさほど異常増殖は起こっていない。これに連動して、周辺部では中心部に比較して類洞が狭くなっていることが解った。これら病巣の周辺部では、類洞が非病巣部のそれと比べて狭く、核の大きさが非病巣部のものよりやや小さい傾向にあった。病巣部の肝細胞索配列は不鮮明であり、エオシン好性が強く、高いクロマチン密度を持つ核が観察できた。

### D. 考察

本研究結果から、TCDD 暴露群の肝臓には核密度の減少が生じることが判明した。肝細胞の核密度は肝細胞の数あるいは大きさを反映しており、毒物により生じる肝細胞の壊死、萎縮あるいは肥大を示す指標となり得る。したがって、TCDD 暴露群の核密度が低下していたことは、妊娠、授乳期の TCDD 暴露が児の肝臓に影響を与えることを示している。TCDD は授乳により児への移行が生じやすいと考えられるので、児の肝臓の変化に関しては重要な所見であると考えられる。また、TCDD 暴露群の核密度低下に関して、組織像では間質の増殖や脈管の拡大は認められなかった。したがって、TCDD 暴露群の核密度の低下は肝細胞への影響を反映していると考えられる。組織像からは、細胞肥大は明らかではないが、種々の実験動物では、ダイオキシン類による肝細胞の肥大化が報告されていることから、今回認められた各密度の低下が肝細胞肥大を示しているのかどうか今後の検討が必要である。

対象群では小葉内の核密度に部位差は認められなかったが、TCDD 暴露群でも同様であった。肝細胞が TCDD の代謝の

影響を受けるならば、血液循環経路に起因して、中心静脈周辺と小葉周辺では肝細胞の負担レベルが異なることが考えられ、細胞形態に部位差が生じる可能性がある。しかし、各密度の部位差が生じなかったということは、TCDDは代謝を受けにくい、または、肝細胞にその代謝の影響が現れにくいということが示唆される。しかしながら、TCDD暴露群の肝細胞には脂肪変性を強く示唆する組織像が認められるため、肝細胞自身がTCDDの影響を受けにくいとは考えにくい。むしろ、組織所見は、TCDDの肝細胞毒性を強く示唆している。つまり肝細胞障害の部位差が生じていないのは、TCDDの代謝速度が極めて遅いためであると思われる。

また、1例の肝臓に好酸性変異病巣が認められた。病巣部では核密度が増加していることは明らかで、細胞増殖が盛んであることが示唆され、細胞配列の乱れが著しい点で、この病巣は前癌状態ではないかと解釈できる。したがって、アカゲザルでもラットと同様にTCDDに発癌性があるのではないかと疑われる。しかし、病巣部で異常な細胞密度の増加は観察されたが、明確な異型性は認められず、また病巣と周囲の境が明瞭である点から、明らかな癌とはいえない。

一方で、病巣部では細胞の大きさが相対的に減少し、細胞内の構造を同定しにくい状態になっていた。病巣部の部位によって各密度にばらつきが生じたのは、正常な肝細胞索構造が失われたために血行状態が変化したためではないかと考えられる。

以上から、アカゲザルにおいても、TCDDは妊娠・授乳期の母体へ暴露したときに、児の肝細胞に他の実験動物にあたる影響と同様の影響を与える可能性

が示された。

## E. 結論

胎生・授乳期のアカゲザルにTCDD300 ng/kg暴露したところ、児の肝細胞に各密度の低下や脂肪変性を疑わせる所見などが認められた。また、前癌状態を疑わせる所見も得た。このことから、TCDDは妊娠・授乳期の母体への暴露は、児の肝細胞に強い影響を与えることが確認された。

## F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

## 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  
なし

表1 計測結果における各統計量

各統計量	TCDD暴露群	対照群
	中心静脈周辺の核密度	中心静脈周辺の核密度
合計	3,379	2,488
平均値	169.0	207.3
最大値	248	357
最小値	116	116
データ数	20	12
中央値	158.9	197.6
分散	1,623	3,781
標準偏差	40.28	61.49

各統計量	TCDD暴露群	対照群
	小葉間周辺の核密度	小葉間周辺の核密度
合計	3,689	2,488
平均値	184.5	207.3
最大値	256	318
最小値	101	124
データ数	20	12
中央値	186	186
分散	2,135	4,676
標準偏差	46.20	68.38

密度の単位 ( $\times 10^{-5}$  個/ $\mu\text{m}^2$ )

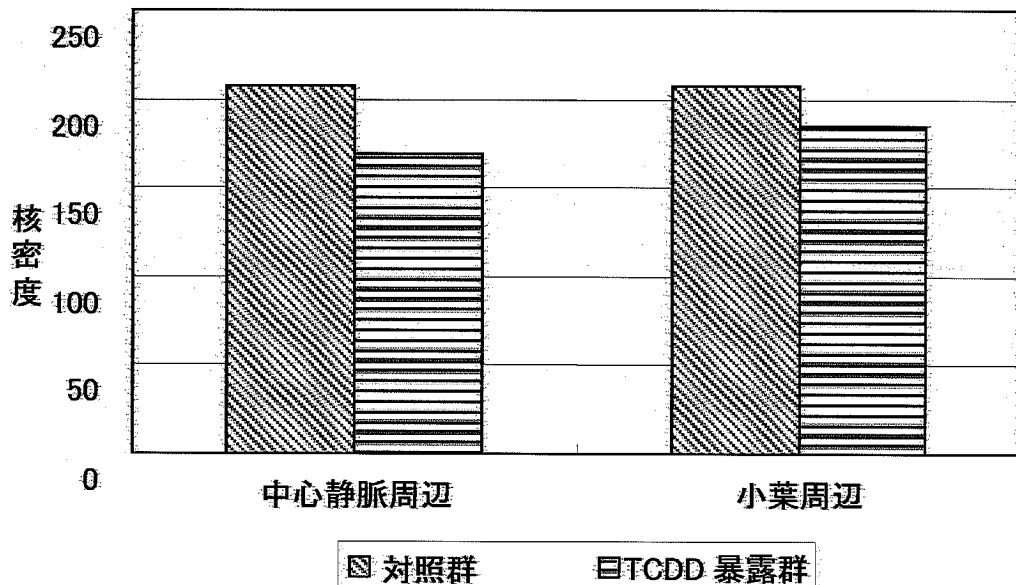


図1 対照群と TCDD 暴露群の核密度の比較

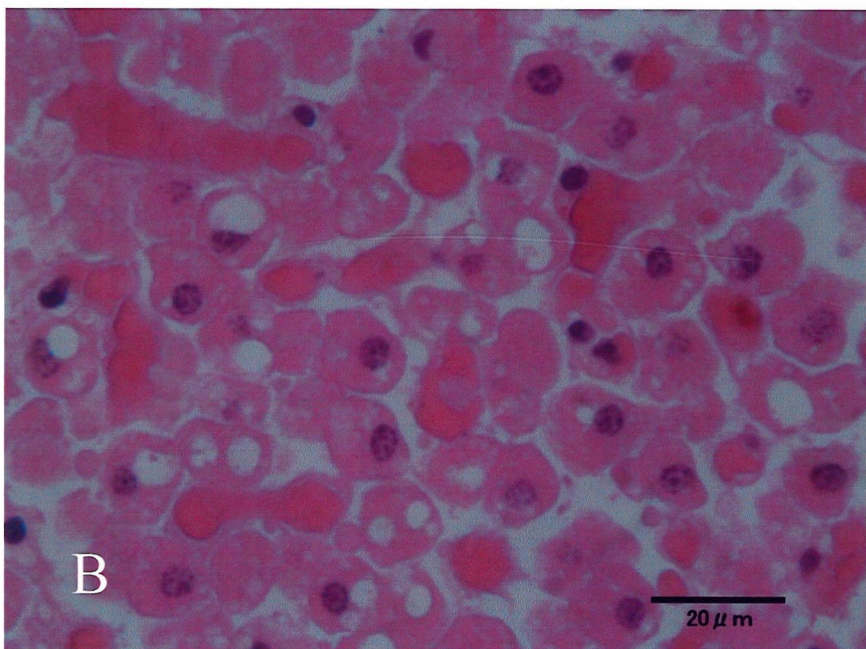
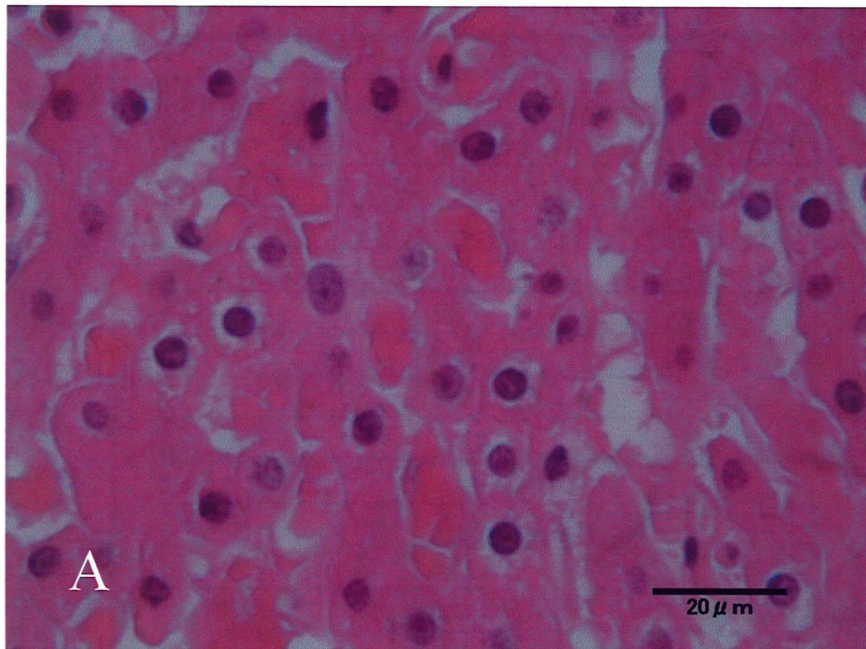


図2 A: 対照群の肝臓組織 B: TCDD 暴露群の肝臓組織

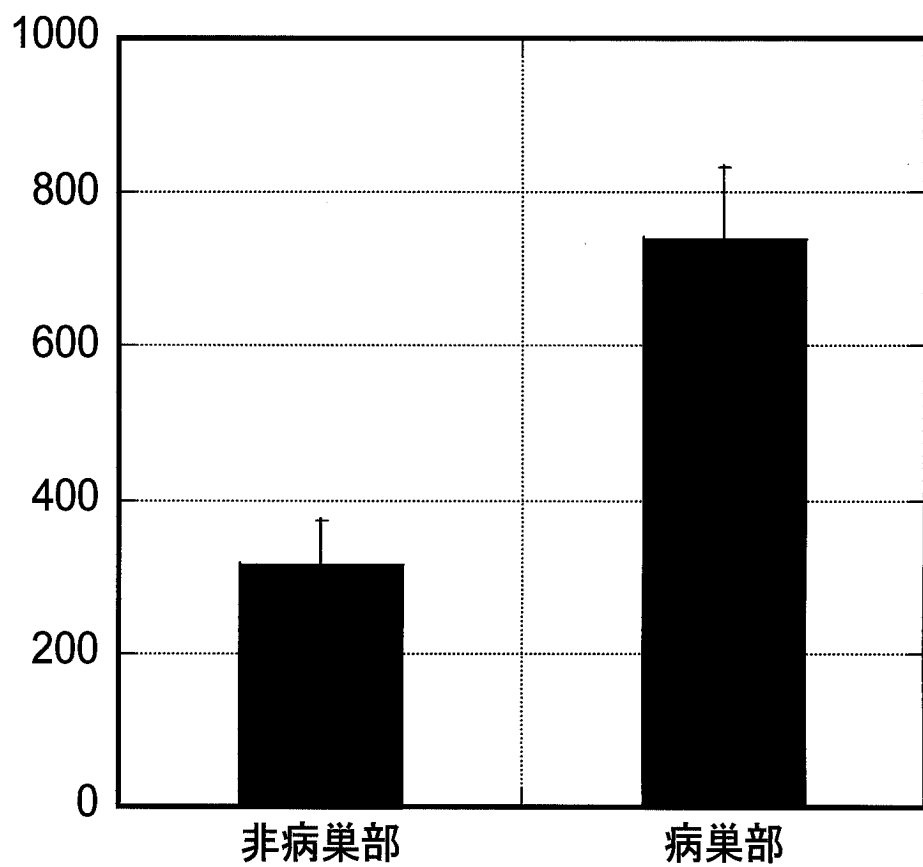


図3 非病巣部と病巣部の核密度 (×10<sup>-5</sup>個/μm<sup>2</sup>)

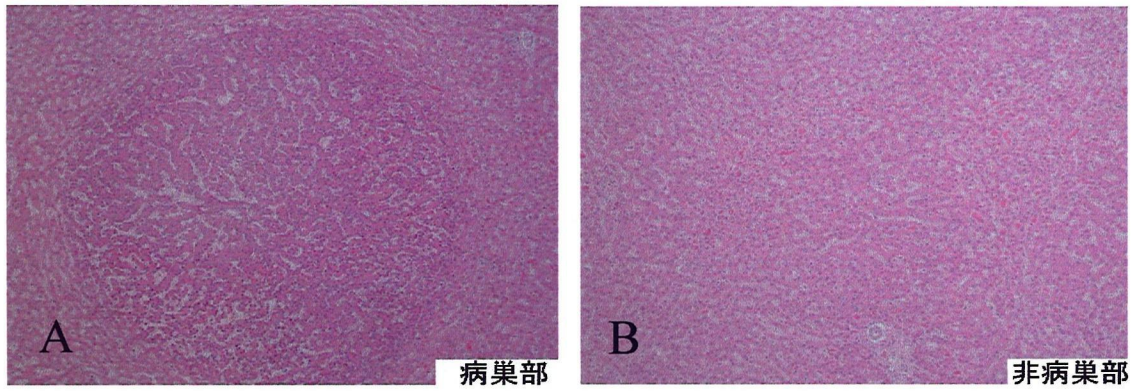


図4 A: 病巣部の低倍率顕微鏡写真 B: 非病巣部の低倍率顕微鏡写真

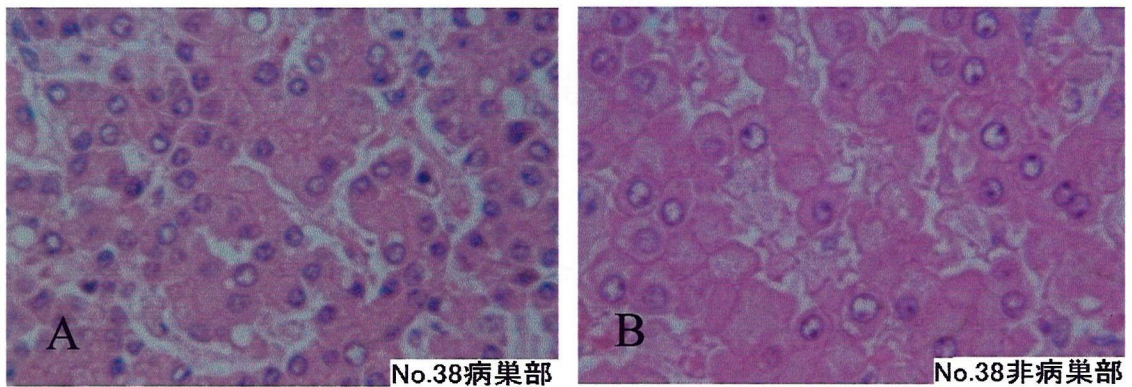


図5 A: 病巣部の高倍率顕微鏡写真 B: 非病巣部の高倍率顕微鏡写真

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）  
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  
アカゲザル歯及び口蓋ヒダ発生への影響に関する研究

分担研究者 安田 峯生 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 安田 以久 広島大学大学院医歯薬学総合研究科)

**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、アカゲザル母体に 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。これらの母体から得られた対照群 4 例、30 ng/kg 群 8 例、300 ng/kg 群 8 例の死産児と生後 100 日以内に死亡した乳児について、上下顎を切り出し、歯を実体顕微鏡及び X 線で観察した。対照群及び 300 ng/kg 群では特に異常は認められなかったが、300 ng/kg で 3 例に上顎切歯の早期萌出、動揺、歯根形成不全、欠如などの異常が認められた。また、口蓋の口腔面にあるヒダの形態を実体顕微鏡で観察したところ、これらの個体では口蓋ヒダの肥厚、分断、走行の乱れなどの異常も見られた。これらの結果から、300 ng/kg の TCDD 母体負荷は児の歯・口蓋の形成に悪影響を及ぼすことが示唆された。

#### A. 研究目的

歯はダイオキシン類の発生毒性に感受性の高い組織であることがげっ歯類で報告されている。本研究の目的は、妥当なダイオキシン類の耐容一日摂取量 (TDI) 決定のための基礎的なデータを得ることである。妊娠アカゲザルに 30 または 300 ng/kg という微量の 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ているが、その一環として、死産児、生後死亡児の歯を観察した。また、口蓋ヒダの形態変異は化学物質の発生毒性作用の敏感な評価指標となることがげっ歯類で知られているので、あわせて口蓋ヒダを観察した。

#### 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 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。これらの母体から得られた死産児と生後 100 日以内に死亡した乳児、対照群 4 例、30 ng/kg 群 8 例、300 ng/kg 群 8 例について、上下顎を切り出し、歯の萌出状態をを実体顕微鏡 (Olympus SZX12) で観察した。次に携帯用 X 線装置 (朝日レントゲン工業 Handy Ray KX60) と CCD センサー (Gendex Visualix) を用いて歯の X 線画像を観察した。また、口蓋の口腔面にあるヒダの形態を実体顕微鏡で観察した。

#### 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 及び X 線からの悪影響を受けないように配慮した。

#### C. 研究結果

観察した個体の性別、死産、生後死亡の別、死産日齢 (交配日を妊娠 0 日として算出)、生後死亡日齢 (出産日を生後 0 日として算出)、歯異常所見、歯異常の発生率を表 1 に示す。また、肉眼観察所見を図 1 に、X 線観察所見を図 2 に示す。歯の観察で、対照群及び 300 ng/kg 群では特に異常は認められなかったが、



300 ng/kg で3例に上顎切歯の早期萌出、歯根形成不全、欠如などの異常が認められた。これらの個体では口蓋ヒダの肥厚、分断、走行の乱れなどの異常も見られた。

#### D. 考察

歯はダイオキシンの発生毒性に感受性の高い組織であることがげっ歯類の実験で明らかにされている。ヒトの疫学調査でダイオキシン類に暴露された集団で歯の異常の頻度が高まるとの報告があり、300 ng/kg 群死亡児の8例中3例とかなりの頻度で歯の異常が見られたことは、注目に値する。X線CT画像の3次元観察で、より詳細かつ定量的な異常の解析を進めつつある。今後、生存児も観察の予定である。また口蓋ヒダの形態変異はげっ歯類で発生毒性検出指標として有用であることが知られているが、アカゲザルでは対照群でも口蓋ヒダの形態にはかなりの個体差があり、生存児での観察を合わせて評価する必要がある。

#### 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の母体内負荷に暴露され、死産あるいは生後間もなく死亡したアカゲザル児で、300 ng/kg群のみに歯の異常が認められ、この負荷量では児の歯発生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。

#### F. 健康危惧情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし。

##### 2. 学会発表

なし。

#### H. 知的財産所有権の出願、登録状況

なし。

表1 各群における観察標本とその所見

対照群

番号	性別		死亡日齢	異常所見	発生率
10a	♂	死産	妊娠 146 日	—	0/4
13a	不明	死産	妊娠 156 日	—	
49a	♀	死産	妊娠 147 日	—	
58a	♀	死亡	生後 98 日	—	

30 ng/kg 群

番号	性別		死亡日齢	異常所見	発生率
20a	♀	死産	妊娠 163 日	—	0/8
28a	♀	死産	妊娠 158 日	—	
29a	♀	死産	妊娠 157 日	—	
50a	♀	死産	妊娠 172 日	—	
16b	♀	死産	妊娠 148 日	—	
17b	♂	死産	妊娠 150 日	—	
53b	♂	死産	妊娠 160 日	—	
59b	♀	死産	妊娠 159 日	—	

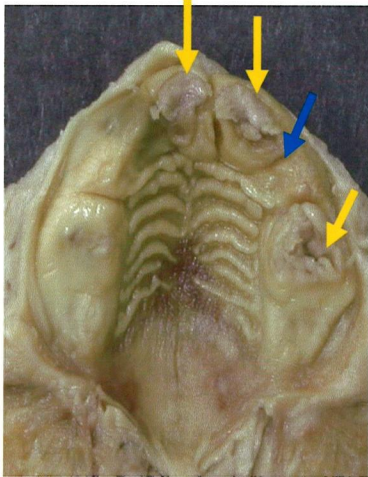
300 ng/kg 群

番号	性別		死亡日齢	異常所見	発生率
34a	♂	流産	妊娠 128 日	—	3/8
37a	♂	死産	妊娠 164 日	A   AD A   A 早期萌出 形成不全、  B 欠如、	
40a	♀	死亡	生後 26 日	A   A 欠如   D 早期萌出	
43a	♂	死産	妊娠 176 日	—	
57a	♂	死亡	生後 1 日	BA   ABD A   A 早期萌出, A   AD 石灰化不全、	
60b	♂	死亡	生後 25 日	—	
66b	♀	死産	妊娠 143 日	—	
103a	♀	死産	妊娠 173 日	—	

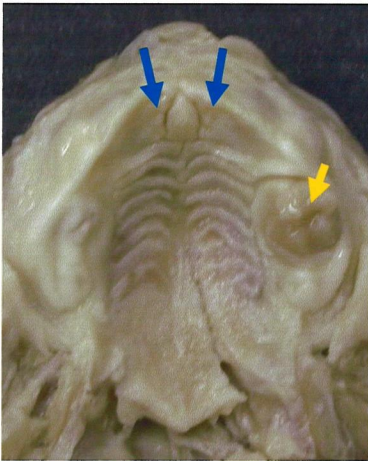


群 動物番号 (受精後日齢)  
所見

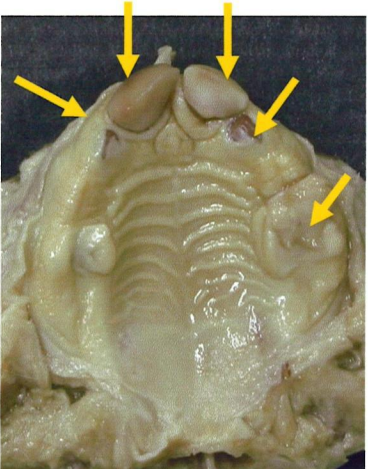
対照群 10a (146)  
正常



300 ng/kg 群 37a (164)  
上顎  
黄：A|AD 早期萌出 形成不全  
青：|B 歯芽欠如  
下顎  
黄：A|A 早期萌出  
口蓋ヒダ肥厚

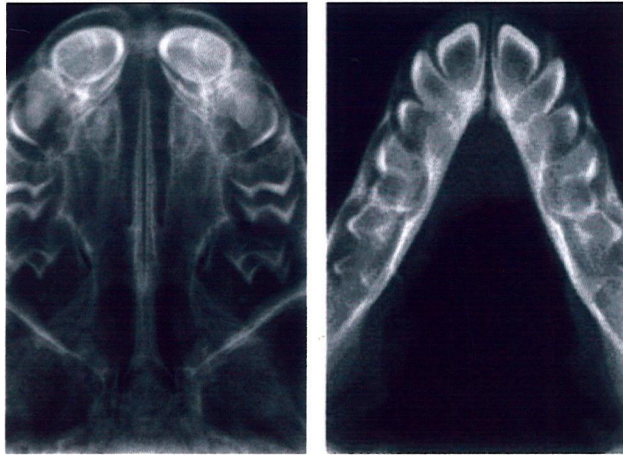


300 ng/kg 群 40a (183)  
上顎  
黄：|D 早期萌出  
青：A|A 欠如  
下顎  
異常なし  
口蓋ヒダ 左6 走行異常  
左7 短小



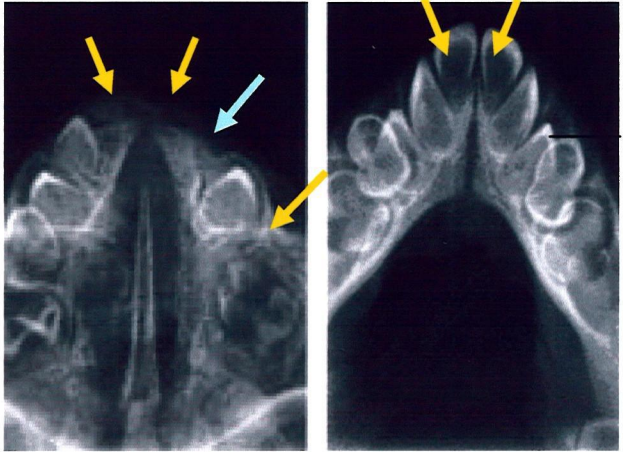
300 ng/kg 群 57a (186)  
上顎  
黄：BD|ABD 早期萌出 形成不全  
下顎  
黄：A|A 早期萌出

図1 死産児・生後死亡児上下顎の肉眼所見：左列 上顎 右列 下顎



群 動物番号 (受精後日齢)  
所見

対照群 10a (146)  
正常



300 ng/kg 群 37a (164)

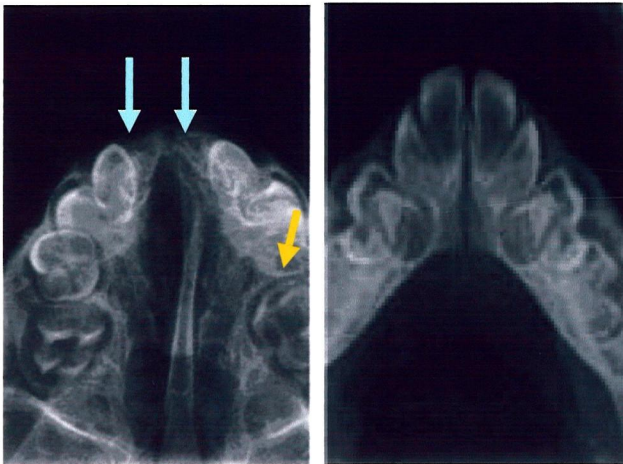
上顎

黄：A|AD 早期萌出 形成不全

青：|B 歯芽欠如

下顎

黄：A|A 早期萌出



300 ng/kg 群 40a (183)

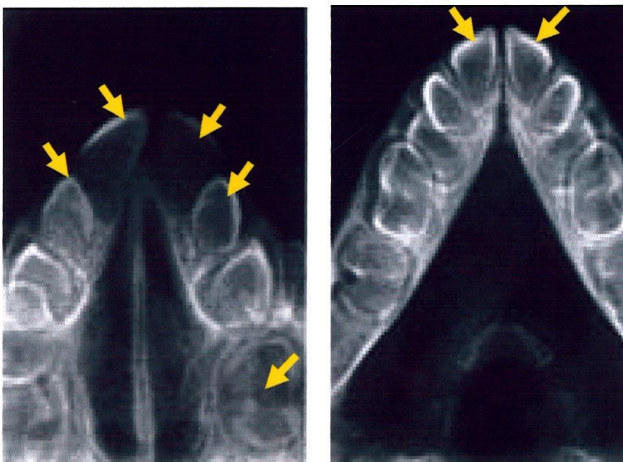
上顎

黄：|D 早期萌出

青：A|A 欠如

下顎

異常なし



300 ng/kg 群 57a (186)

上顎

黄：BD|ABD 早期萌出 形成不全

下顎

黄：A|A 早期萌出

図2 死産児・生後死亡児上下顎のX線所見：左列 上顎 右列 下顎

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

#### 1. 論文発表

- 1) Sugihara K, Yamada T, Kitamura S, Ohta S, Yamashita K, Okamura S, Yasuda M, Fujii-Kuriyama Y, Saeki K, Matsui S, Matsuda T: Ah-receptor-mediated induction of drug-metabolizing enzymes by indirubin and indigo. *Organohalogen Compounds*, 59, 453-456, 2002.

#### 2. 学会発表

- 1) 安田峯生, 隅田寛, 浅岡一雄, 山下敬介, 角崎英志, 井上稔: ダイオキシン胎生期・授乳期暴露のアカゲザル生殖器発育への影響. 環境ホルモン学会第5回研究発表会要旨集, 355 (抄録), 2002. (環境ホルモン学会第5回研究発表会, 2002年11月25-26日, 広島)
- 2) 飯田景子, 釜中慶朗, 鈴木樹理, 渡辺邦夫, 安田峯生, 久保田俊一郎, 浅岡一雄: ダイオキシン類のサル子宮内膜におよぼす影響の DNA チップによる解析. 環境ホルモン学会第5回研究発表会要旨集, 109 (抄録), 2002. (環境ホルモン学会第5回研究発表会, 2002年11月25-26日, 広島)
- 3) 安田峯生, 隅田寛, 角崎英志, 井上稔, 山下敬介: ダイオキシン胎生期・授乳期暴露を受けたアカゲザル児の腎臓異常. 第42回日本先天異常学会学術集会抄録集, 107 (抄録), 2002. (第42回日本先天異常学会学術集会, 2002年7月10-12日, 浜松)
- 4) Yasuda M, Koito A, Sumida H, Tsusaki H, Inouye M, Yamashita K: Renal dysgenesis in rhesus monkeys exposed to dioxin during gestation and lactation. (22<sup>nd</sup> International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, August 11-16, Barcelona, Spain)

## THE Ah RECEPTOR

## AH-RECEPTOR-MEDIATED INDUCTION OF DRUG-METABOLIZING ENZYMES BY INDIRUBIN AND INDIGO

Kazumi Sugihara<sup>1</sup>, Tsuyoshi Yamada<sup>1</sup>, Shigeyuki Kitamura<sup>1</sup>, Shigeru Ohta<sup>1</sup>, Keisuke Yamashita<sup>1</sup>, Saori Okamura<sup>1</sup>, Mineo Yasuda<sup>2</sup>, Yoshiaki Fujii-Kuriyama<sup>3</sup>, Ken'ich Saeki<sup>4</sup>, Saburo Matsui<sup>5</sup> and Tomonari Matsuda<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Japan.

<sup>2</sup>Faculty of Health Sciences, Hiroshima International University, Japan.

<sup>3</sup>Center for Tsukuba Advanced Research Alliance, University of Tsukuba, Japan.

<sup>4</sup>Nagoya City University, Japan.

<sup>5</sup>Department of Environmental Engineering, Kyoto University, Japan.

### Introduction

Indigo and indirubin have been used to dye cloth for denims and blue jeans<sup>1</sup>. Indigo-producing plants have also been used in traditional Chinese medicine<sup>2</sup> and indirubin was identified as an active ingredient against leukemias<sup>3</sup>. Pathways for the endogenous production of indirubin and indigo in the human body were postulated by Gillam *et al.*<sup>4</sup> (Fig. 1). The formation of indoxyl and isatin, which are intermediates in the formation of indirubin or indigo from indole, is catalyzed by human cytochrome P450s. Recently, Adachi *et al.*<sup>5</sup> identified the endogenous ligands of AhR in human urine as indirubin and indigo, using recombinant yeast assay<sup>6</sup>. The ligands were extracted from acid-treated human urine and FBS (fetal bovine serum), and their levels in the body were high enough to activate the AhR, 0.2 nM and 0.07 nM, respectively. Aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a ligand-binding transcription factor which was isolated as a TCDD receptor in the cell, but it remains an orphan receptor. The AhR ligand activity of indigo was about the same as that of TCDD, and the potency of indirubin was 50 times that of TCDD<sup>5</sup>. Thus, they are expected to have an important physiological role *in vivo*. In this study, we examined the physiological effect of indirubin and indigo in mice *in vivo*.

### Materials and Methods

#### *Animals and treatment*

Male C57BL/6J:Jcl mice (5-6 weeks old) from CLEA Japan, Inc. (Tokyo) were housed in the cages at 22 °C with a 12-hr light/dark cycle, with free access to tap water and a standard pellet diet. *Ahr*-deficient mice (*Ahr*<sup>-/-</sup>) were maintained in the Research Facilities for Laboratory Animal Science, Hiroshima University. Male C57BL/6J:Jcl mice were given indirubin or indigo (1-50 mg / kg body weight) dissolved in Panacete 810<sup>TM</sup> (5 mL / kg) by gavage or by intraperitoneal injection for three days. Vehicle control mice were given the same volume of Panacete 810<sup>TM</sup>. Male *Ahr*<sup>-/-</sup> mice (5-6 weeks old) were treated with indirubin or indigo (5 mg/kg body weight) in the same manner as *Ahr*<sup>+/+</sup> (wild : C57BL/6J:Jcl) mice.

#### *Preparation of liver microsomes and enzyme assays*

One day after the last dose, mice were killed and the livers were quickly removed. Microsomes 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<sup>7</sup>.

# THE Ah RECEPTOR

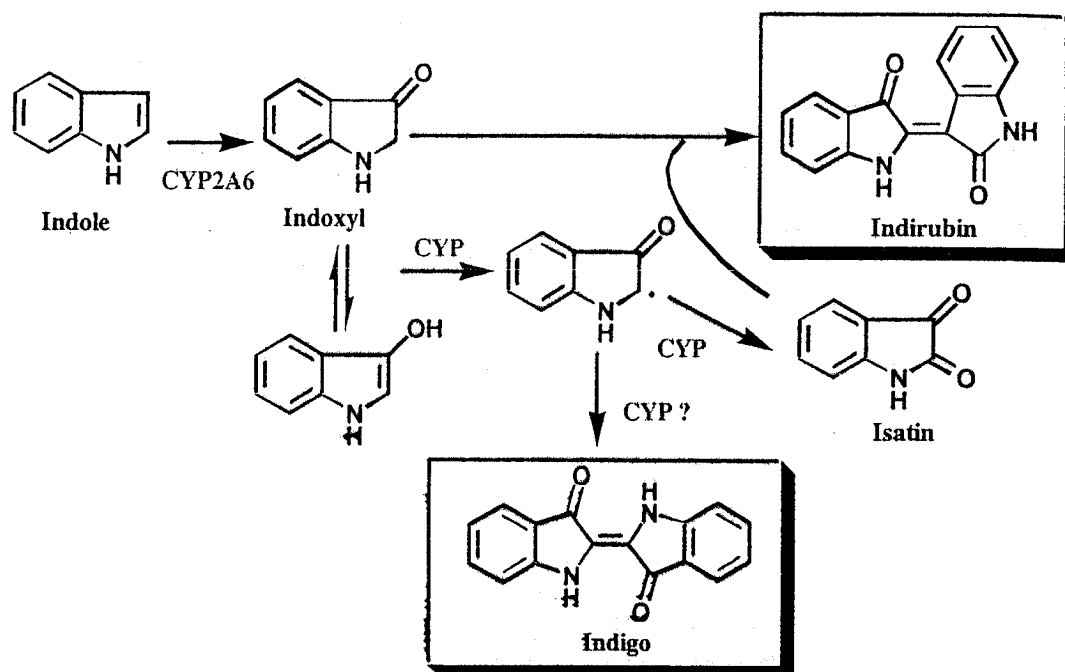


Figure 1. Postulated scheme for the formation of indigo and indirubin

## Histochemical analysis of mouse liver

Liver sections were stained with hematoxylin-eosin or Sudan black.

## Results and Discussion

### Effects of indirubin and indigo on liver microsomal enzyme activities

The microsomal alkoxyresorufin-*O*-dealkylase activities, EROD, MROD and PROD, of male C57BL/6J:Jcl mice after treatment with indirubin or indigo (1, 5, 10 and 50 mg / kg body weight) by gavage for three days were examined. The EROD and MROD activities were increased dose-dependently compared with that of the control mice. Indigo induced the EROD and MROD activities by 1.3- and 1.4-fold, respectively, at 5 mg /kg b.w. which was the most effective dose.

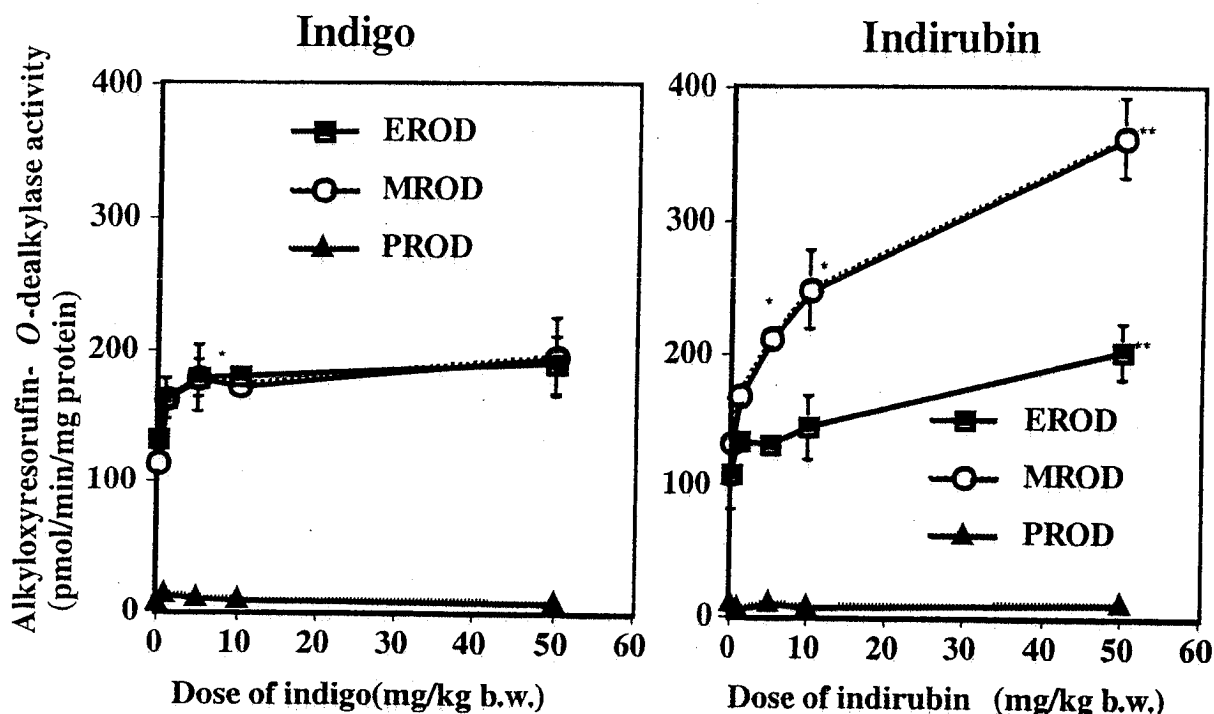
Indirubin induced the EROD and MROD activities by 1.9- and 2.7-fold, respectively. However, the PROD activity, which is due to phenobarbital-inducible cytochrome P450, was not induced by indirubin or indigo (Fig. 2).

### Inductive effect of indirubin and indigo on liver enzyme activities of AhR<sup>-/-</sup> mice

When indirubin or indigo was applied to AhR<sup>-/-</sup> mice, which lack AhR, no inductive effect on EROD or MROD was observed (data not shown). Thus, the induction of the EROD and MROD activities by indirubin and indigo is suggested to be mediated by AhR.

### Histochemical analysis of mouse liver

Livers were obtained from mice after indirubin or indigo treatment, 50 mg / kg b.w., and vehicle control mice. The liver sections were stained with hematoxylin-eosin or Sudan black. Indirubin and indigo caused no significant damage to the liver, and lipid droplets, which are usually observed after TCDD treatment, were not increased.



\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs vehicle control.

Figure 2. Dose-dependent induction of EROD, MROD and PROD in mice by indirubin and indigo

In this study, we demonstrated that indirubin and indigo induce EROD and MROD activities in mice. The induction was mediated by AhR. Although their AhR ligand activities in recombinant yeast assay were the same as or stronger than that of TCDD, the inductive activities for drug-metabolizing enzymes in mice were less than that of TCDD and higher doses of indirubin and indigo were required for the induction. Our preliminary experiments suggest that some hydrophobic compounds as metabolites of indirubin formed by liver microsomes. These compounds should be excreted earlier than TCDD, which persists in the body. In histochemical analysis, no toxicological changes were observed in liver sections from high dose-treated mice compared to vehicle-treated mice. The results suggest that endogenous indirubin and indigo might be physiological ligands for AhR.

#### 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, 14042240) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

#### References

1. Balfour-Pj. (1998) *Indigo*, British Museum Press, London.
2. Wu, L.M., Yang, Y.P. and Zhu, Z.H. (1979) *Common Chinese Herbal Med.*, 9: 6-8.
3. Chen, D.H., Xie, J.X. (1984) *Chinese Trad. Herbal Drugs*, 15: 6-8



## THE Ah RECEPTOR

4. Gillam, E.M., Notley, L.M., Cai, H., DeVoss, J.J. and Guengerich, F.P. (2000) *Biochemistry*.39(45): 13817-24.
5. 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.
6. Miller, C.A. (1999) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 160(3): 297-303.
7. Burke, M.D., Thompson, S., Elcombe, C.R., Helpert, J., Haaparanta, T. and Mayer, R.T. (1985) *Biochem. Pharmacol.* 34: 3337-3345.

## ダイオキシン胎生期・授乳期暴露のアカゲザル生殖器発育への影響

安田峯生<sup>1)</sup>、隅田寛<sup>2)</sup>、浅岡一雄<sup>3)</sup>、山下敬介<sup>4)</sup>、角崎英志<sup>5)</sup>、井上稔<sup>5)</sup>

1) 広島国際大学保健医療学部臨床工学科、2) 同診療放射線学科、3) 京都大学霊長類研究所分子生理、4) 広島大学大学院医歯薬学総合研究科解剖学・発生生物学研究室、5) 新日本科学安全性研究所

われわれは平成 10 年より胎生期に微量のダイオキシン (2, 3, 7, 8-四塩化ジベンゾパラジオキシン、以下 TCDD) 暴露を受けたアカゲザルの発育を観察している。昨年は 300 ng/kg 負荷母体からの F1 オス新生児で肛門-外生殖器間距離が短縮する傾向を示したことを報告したが、例数を増すために同じ母体からの第 2 児 (F1b) を観察したので、その結果を報告する。アカゲザルの妊娠 20 日に 30 または 300 ng/kg の TCDD を皮下投与し、その後 30 日毎に初回投与の 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 (F1a) を保育させた。TCDD 投与は出産後 90 日まで続けた。投与中断後、約 13~16 カ月後に母サルを再度妊娠させ、母体の TCDD 負荷量が 30 または 300 ng/kg となるように、妊娠 20 日に 20 または 200 ng/kg を皮下投与し、その後 1.5 または 15 ng/kg を 30 日毎に維持量として投与した。現在までに F1b は対照群でオス 3 メス 8、30 ng/kg 負荷群でオス 6 メス 4、300 ng/kg 負荷群でオス 8 メス 3 が生まれている。妊娠期間や生下時体重には各群間に差は認められなかった。外生殖器の発育では生後 1 日オス児の肛門-外生殖器 (陰茎基部) 間距離 (mm) 平均値が対照群で  $56.6 \pm 5.2$ 、30 ng/kg 群で  $54.2 \pm 4.8$ 、300 ng/kg 群で  $56.9 \pm 7.2$  と、F1a のような 300 ng/kg 群での短縮傾向は認められなかった。生後 1 日メス児の肛門-外生殖器 (陰核基部) 間距離 (mm) 平均値も対照群で  $21.2 \pm 0.9$ 、30 ng/kg 群で  $21.4 \pm 1.5$ 、300 ng/kg 群で  $22.3 \pm 0.9$  と有意差はなかった。いずれも例数は少ないが、F1a オスでの肛門-外生殖器間距離短縮傾向は成長とともに消失しており、F1b での所見と合わせて、TCDD の 300 ng/kg の母体負荷は児の外生殖器発育には顕著な影響を及ぼさないものと考えられる。(厚生科学研究費補助金による。)

## Effects of in utero and lactational exposure to dioxin on development of genitalia in rhesus monkeys

Mineo Yasuda<sup>1)</sup>, Hiroshi Sumida<sup>2)</sup>, Kazuo Asaoka<sup>3)</sup>, Keisuke Yamashita<sup>4)</sup>, Hideshi Tsusaki<sup>5)</sup>, Minoru Inouye<sup>5)</sup>,

1) Department of Clinical Engineering, Faculty of Health Sciences, Hiroshima International University, 2) Department of Clinical Radiology, Faculty of Health Sciences, Hiroshima International University, 3) Department of Cellular and Molecular Biology, Primate Research Institute, Kyoto University, 4) Department of Anatomy and Developmental Biology, Graduate School of Medicine, Hiroshima University, 5) Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.

Since 1998, we have been investigating effects of prenatal and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on development of young in rhesus monkeys. Last year, we reported that the anogenital distance in male newborns (F1a) from dams with a body burden of 300 ng/kg TCDD was slightly shorter than that in controls. To confirm this observation, we re-mated the dams and examined the second newborns (F1b). About 13 to 16 months after the last maternal administration for F1a, we re-mated the dams, and administered 20 or 200 ng/kg TCDD on day 20 of gestation. For maintenance of body burden at 30 or 300 ng/kg, 1.5 or 15 ng/kg TCDD was given to dams every 30 days. As of September 2002, the following number of F1b young were born: 3 males and 8 females in the control group, 6 males and 4 females in the 30 ng/kg group, and 8 males and 3 females in the 300 ng/kg group. In F1b males, no differences were found in the anogenital distance between the control and TCDD groups. (Supported by Health Science Research Grants for Research on Environmental Health from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.)

## B-3-5

## ダイオキシン類のサル子宮内膜におよぼす影響の DNA チップによる解析

飯田景子<sup>1)</sup>、釜中慶朗<sup>2)</sup>、鈴木樹理<sup>2)</sup>、渡辺邦夫<sup>3)</sup>、安田峯生<sup>4)</sup>、久保田俊一郎<sup>5)</sup>、浅岡一雄<sup>1)</sup>

1) 京都大学霊長類研究所分子生理、2) 同人類モデルセンター、3) 同ニホンザル野外施設、4) 広島国際大学保健医療学部臨床工学科、5) 東京大学大学院医学部代謝生理化学

ダイオキシン曝露による健康影響はマウスの胸腺萎縮や口蓋裂、マウスやラットでの発癌など多様な毒性を示し、ヒトにおいては多部位で多種の健康被害が生じるとする疫学報告があり、ダイオキシンの毒性機構の解明は大切である。ダイオキシンに曝露したサルは子宮に異常をきたし流産や内膜症などの多発する生殖異常が報告される一方で否定する見解もある。ダイオキシンの分子的作用機構として Ahr 依存性が知られるが更なる解明が必要である。このため我々はサルにおける発現遺伝子のクローニングにより得られた多数遺伝子を対象として、サル子宮内膜における遺伝子発現へのダイオキシン影響について DNA チップを用いて解析した。mRNA は雌サルにダイオキシン様作用をもつメチルコラントレンを投与したのち子宮内膜を採取して抽出した。発現変動が検出された分子は RT-PCR によって分子量と配列の確認を行った。メチルコラントレンを投与した雌サルの子宮内膜には CYP1A1 および GST の遺伝子発現の増加が認められ Ahr 機構が作動していることが認められた。同時に c-fos、ウテログロビン、エストロゲンレセプターベータ型、インスリン様グロソファクターレセプターII 型に遺伝子発現の増加が認められ、エストロゲン機構が Ahr 機構と同時に子宮内膜において作動していることが認められた。一方、エストロゲンレセプターアルファ型、インスリン様グロソファクターII 型、アンドロゲンレセプターは発現が低下した。インスリン様グロソファクターI 型、インスリン様グロソファクターI 型レセプター、プロゲステロンレセプター、c-Jun、DNA ポリメラーゼカッパ、Ahr は曝露に影響されずに同一量の発現を示した。これらの結果から、ダイオキシン類はサルの子宮内膜に影響して遺伝子発現を変動させることが示された。サルの子宮内膜においてダイオキシン類は Ahr 機構にくわえてエストロゲン様機構による作用を示すことが見出され、発癌や子宮内膜症を研究する分子の手がかりが得られた。(厚生科学研究費補助金、文部科学省補助金による。)

## Analysis of dioxin effects on monkey endometrium using a DNA chip

Hiroko Iida<sup>1)</sup>, Yoshiro Kamanaka<sup>2)</sup>, Juri Suzuki<sup>2)</sup>, Kunio Watanabe<sup>3)</sup>, Mineo Yasuda<sup>4)</sup>, Shunichiro Kubota<sup>5)</sup>, Kazuo Asaoka<sup>1)</sup>

1) Department of Cellular and Molecular Biology, Primate Research Institute, Kyoto University, 2) Center for Human Evolution Modeling Research, Primate Research Institute, Kyoto University, 3) Field Research Center, Primate Research Institute, Kyoto University, 4) Department of Clinical Engineering, Faculty of Health Sciences, Hiroshima International University, 5) Department of Physiological Chemistry and Metabolism, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo

There is much argument about monkey endometriosis affected by dioxin. We have been investigating the dioxin effects on the gene expression in monkey endometrium using a DNA chip. In the endometrium from monkeys injected with dioxin-like compound, methylcholanthrene, mRNA expressions of CYP1A1 and GST genes were increased. Those of c-fos, uteroglobin, estrogen receptor beta, and insulin like growth factor II genes were also increased in the same tissue. These results show that dioxin affects simultaneously estrogen-like effects adding to gene expression of Ahr molecular mechanism in the monkey endometrium. Those molecular gene mechanisms related to dioxin might be useful to understand dioxin related diseases, i.e. cancer and endometriosis. (Supported by Health Science Research Grants for Research on Environmental Health from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan and by Grants in Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.)

## O-2 ダイオキシン胎生期・授乳期暴露を受けたアカゲザル児の腎臓異常

<sup>1</sup>広島国際大学 保健医療学部 臨床工学科、<sup>2</sup>広島国際大学 保健医療学部 診療放射線学科、<sup>3</sup>株式会社 新日本科学 安全性研究所、<sup>4</sup>広島大学大学院 医歯薬総合研究科 病態探求医学講座

安田 峯生<sup>1</sup>、隅田 寛<sup>2</sup>、角崎 英志<sup>3</sup>、井上 稔<sup>3</sup>、山下 敬介<sup>4</sup>

【目的】本研究はサルでのダイオキシン微量長期暴露の次世代への影響を調べることを目的としている。

【方法】アカゲザルの妊娠20日に30または300 ng/kgの2,3,7,8-四塩化ジベンゾパラジオキシン (TCDD) を皮下投与し、その後30日毎に初回投与量の5%を維持量として投与した。妊娠を維持した母サルは自然分娩させ、児を哺育させた。TCDD投与は分娩後90日まで継続した。

【成績】各群20匹の妊娠動物のうち、生児が得られたのは対照群18匹、30 ng/kg群15匹、300 ng/kg群16匹であった。生後約1年半の間に死亡した児は対照群4匹、30 ng/kg群1匹、300 ng/kg群8匹と、300 ng/kg群での高死亡率が目立ち、その6例は生後360日以後のものであった。これらの死因を追求するために、主要器官の病理組織学的検査を行ったところ、300 ng/kg群の2例(死亡時日齢422日と406日)に両側性の広範な腎異形成が認められた。主な所見は、矮小な糸球体、尿細管上皮の空胞化、間質の増生であった。生後12ヶ月での血液生化学検査で、これらの児の血液尿素窒素(BUN)がそれぞれ98.2、45.3 mg/dlと、対照群での平均値26.9±6.5 mg/dlよりかなり高く、腎機能が低下していたことを示していた。

【結論】これらの結果から、TCDDの胎生期・授乳期暴露が腎臓の発生に悪影響を及ぼす可能性が示唆された。(厚生科学研究費補助金による。)

## RENAL DYSGENESIS IN RHESUS MONKEYS EXPOSED TO DIOXIN DURING GESTATION AND LACTATION

Mineo Yasuda<sup>1)</sup>, Atsuko Koito<sup>1)</sup>, Hiroshi Sumida<sup>2)</sup>, Hideshi Tsusaki<sup>3)</sup>, Minoru Inouye<sup>3)</sup> and Keisuke Yamashita<sup>4)</sup>

1) Department of Clinical Engineering, 2) Department of Clinical Radiology, Faculty of Health Sciences, Hiroshima International University, Hiroshima, 3) Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd., Kagoshima, and 4) Department of Anatomy and Embryology, Programs for Applied Biomedicine, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Hiroshima.

### Introduction

The current tolerable daily intake (TDI) of dioxin and dioxin related compounds has been set at 4 pg TEQ/kg/day<sup>1)</sup>. This value was calculated from the lowest-observed-adverse-effect level (LOAEL) in experimental animals, mostly rodents. Gray *et al.*<sup>2)</sup> 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. Monkeys were also used in dioxin toxicity studies; in female rhesus monkeys given an estimated daily dose of 0.15 ng/kg/day for 4 years, the incidence and severity of endometriosis were significantly higher 10 years after the start of administration<sup>3)</sup>. Technical inadequacies in this experiment were criticized and the data were not utilized in the TDI setting in Japan. This is a preliminary report of a study initiated to evaluate long term effects of prenatal and lactational exposure to dioxin in rhesus monkeys.

### 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 the 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 June 2002, data on 20 dams in each group were obtained. Pre- or postnatally died young were autopsied, and main organs were histopathologically examined.

**Morphometric analyses.** Paraffin-embedded sections of the kidney stained with hematoxylin and eosin were photographed under a light microscope with a digital camera, and the images were stored in a computer. For quantitative evaluation of renal dysgenesis, renal corpuscles were

painted black using Adobe Photoshop, and the painted areas were counted and measured using Scion Image.

**Hemanalysis.** At 6 months of age and every 6 months thereafter, blood was sampled from the femoral vein and subjected to hemocytometry and chemical analyses. Blood urea nitrogen (BUN) was measured by the urease-GDH method.

### ***Results and Discussion***

**Pre- and postnatal deaths.** No maternal toxicity of TCDD was noted except for crust formation at the injection site. Fetal death or stillbirth occurred sporadically, and 18, 15, and 16 live newborns were obtained from 20 each pregnant animals in the control, 30, and 300 ng/kg groups, respectively. Post natal death occurred in 4, 1, and 8 young in the control, 30, and 300 ng/kg groups, respectively.

**Histopathological findings.** Histological observation of major organs in postnatally died young revealed bilateral renal dysgenesis in two cases in the 300 ng/kg group (Fig. 1). These young died at the age of 406 days and 422 days.

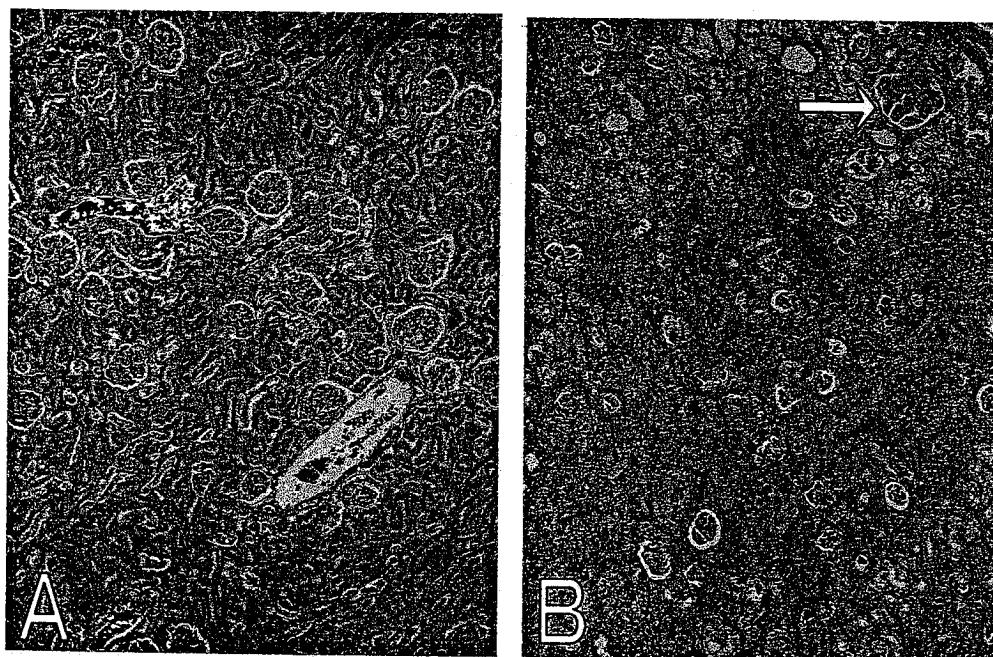


Fig. 1 .A: Control kidney. Renal corpuscles and tubuli are well formed.  
B: Kidney from the 300 ng/kg group. The majority of renal corpuscles are small while some are larger than controls (arrow). In many renal tubuli, vacuoles are noted in the epithelial cells. Interstitial tissue is hyperplastic.

In these kidneys renal corpuscles were mostly hypoplastic while some were hypertrophic, possibly to compensate reduced renal excretion. Vacuolization in epithelial cells of renal tubuli and

hyperplasia of interstitial tissue were also noted. In organs other than the kidney, the liver in some of the died young in the 300 ng/kg group showed slightly enlarged hepatocytes with vacuoles, suggesting accumulation of fat droplets.

**Morphometry of renal corpuscles.** The computer-assisted morphometric analysis clearly showed abundance of smaller corpuscles in the dysgenetic kidneys. Assuming a round shape of renal corpuscles, measurements of sectioned spheres certainly show fairly large variations in their size. In the two cases diagnosed as renal dysgenesis in the 300 ng/kg group, the range of size differences was much larger than controls, and the most frequent size was far smaller than controls (Fig. 2). The number of renal corpuscles per a certain area was not much different between controls and dysgenetic kidneys. These findings suggest that initial branching of ureteric buds in the embryonic period was not much disturbed by exposure to TCDD, but later differentiation and growth of renal corpuscle were affected by TCDD.

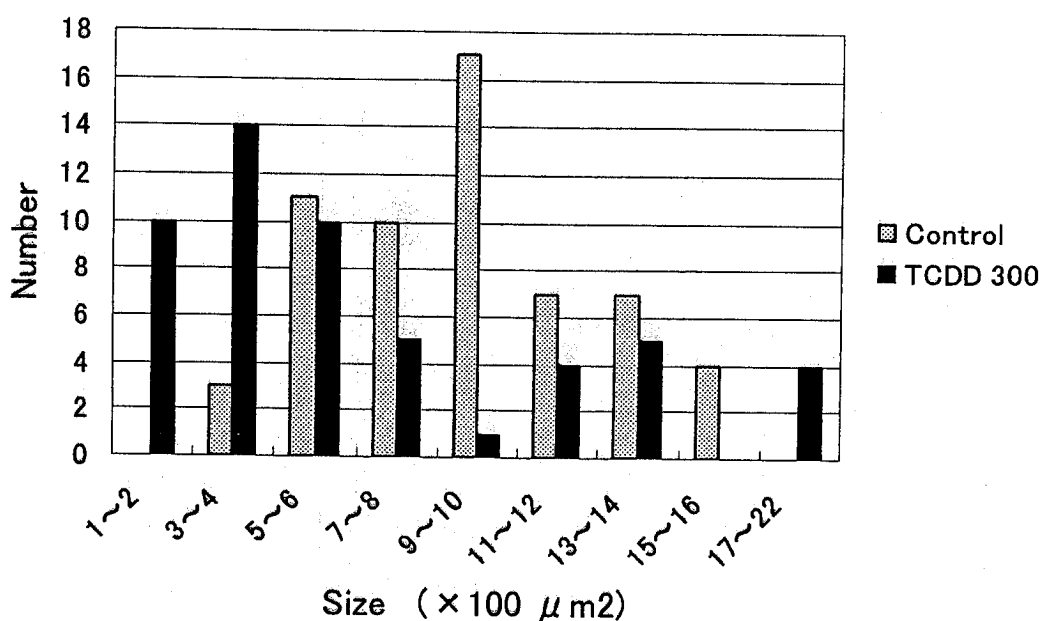


Fig.2. Size distribution of renal corpuscles

Hydronephrosis is the most common abnormality induced by prenatal exposure to TCDD in rodents. But they are not primary dysgenesis of renal parenchyma but secondary degeneration due to accumulation of urine caused by hyperplasia of the ureteric epithelium<sup>4)</sup>.

**BUN levels.** The BUN measured one year after birth in these two cases were 45.3 and 98.2 mg/dl, much higher than the average control level,  $26.9 \pm 6.5$  mg/dl, indicating already lowered kidney function about 100 days before their death.

In this study we demonstrated that the maternal body burden of 300 ng/kg of TCDD during gestation and lactation adversely affects kidney development in the young. Although the number of examined young was small, two cases of bilateral renal dysgenesis among 8 postnatally died

young in the 300 ng/kg group was considered to be TCDD-related pathological changes. To confirm these findings, we remated the dams and examination of the second young (F1b) is in progress. No apparent adverse effects were detected in the 30 ng/kg group, suggesting that there is no urgent need to change the current TDI of dioxins, 4 pg/kg, in Japan.

### *Acknowledgement*

This study was supported by Health Science Research Grants for Research on Environmental Health from the Ministry of Health, Labor 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: 11-20.
3. Rier, S.E., Martin, D.C., Bowman, R.E., Dmowski, W.P. and Becker, J.L. (1984) *Fundam. Appl. Toxicol.*, 21: 433-441.
4. Abbott, B.D., Birnbaum, L.S. and Pratt, R.M. (1987) *Teratology*, 35: 329-344.