独立行政法人　国立環境研究所
環境健康研究領域長

遠山　千春

「　リスク評価のためのダイオキシンによる内分泌かく乱作用の解明　」

研究期間：平成11年1月1日～平成15年12月31日

1. 研究実施の概要

1999 年 1 月から、「内分泌かく乱領域」における戦略的基礎研究がスタートした背景には、ダイオキシンや「環境ホルモン」問題が毎日のようにメディアで取り上げられ、環境庁（現、環境省）による環境ホルモン作用が疑われる物質リスト（SPEED98）の提示、あるいはダイオキシン特別措置法の制定とそれを受けて一日耐容摂取量の設定の動きや焼却炉からの排出基準強化など、国や地方自治体レベルでの対応が社会的にも求められていたことがある。昨今では、先の熱狂状況に対する「反動」として環境ホルモン・ダイオキシンが取るに足らないとする論調も見られるようになった。ダイオキシンや「環境ホルモン」のリスク評価において極めて重要な点は、致死毒性をはじめとする大量曝露に伴う毒性が問題なのではなく、ヒトが食品・環境から摂取するレベルのダイオキシンによって現世代のみならず次世代に悪影響がでるかどうかという問題である。1998 年の世界保健機関によるダイオキシン耐容摂取量の設定を契機としたその後の耐容摂取量を定めるための国内外のリスク評価専門家会合においては、ダイオキシン毒性影響は、主として、次世代における生殖発生毒性、学習・認知機能、免疫能への悪影響であった。

そこで、ライフサイエンスへの寄与のみならずヒトの健康を守るための安全基準に資する基礎データを提供することを目標として、CREST 研究を行ってきた。研究を行うにあたり、我々はフォワード・トキシコロジーのアプローチを採用した。すなわち、ダイオキシン類を実験動物に投与し、生殖、脳機能、免疫に関するエンドポイントに着目をして個体・臓器・細胞レベルへの影響を探り、用量・反応関係を調べた。ダイオキシン類には、最も毒性が高い 2,3,7,8-四塩素化ジベンゾ-*p*-ジオキシン（TCDD）をはじめとするダイオキシンの他に、ジベンゾフランやコプラナーポリ塩素化ビフェニル（PCB）が含まれる。本研究においては、主として TCDD を用い、必要に応じてその他のダイオキシン類異性体の影響を調べた。この研究における大部分の実験において、ラットでは妊娠 15 日目、マウスでは妊娠 12.5 日目に、ダイオキシンの中でも最も毒性が高い 2,3,7,8-四塩素化ジベンゾ-*p*-ジオキシン（TCDD）を単回経口投与し、出生後の仔ラットまたはマウスの発育に伴って観察された影響指標を検討した。実験動物は、経胎盤・経母乳で曝露を受けたことになる。その結果、これまでの報告よりも低いレベルの TCDD によって観察される作用や、これまでに観察されていなかった影響指標が明らかとなった。例えば、ホルツマン系ラットにおいて、肛門生殖突起間距離の短縮、前立腺腹葉重量の減少とアンドロゲン受容体発現レベルの減少などである。その際、胎児期 15 日目に臨界時期(Critical Window)があること、この時期の一回の曝露が、生後のアンドロゲン受容体発現レベルに影響をすることなどが明らかとなった。雌の仔ラットにおいては、膣の形態異常を引き起こさない用量の TCDD を胎児期と授乳期に曝露することに伴い、通常は生後、約 40 日目である発情開始時期や排卵時期が 1 週間ほど早まること、さらに片側卵巣を摘出した場合の代償性卵巣肥大が早まることが明らかとなり、視床下部を介した中枢性の早熟化が示唆された。

経胎盤曝露ではなく経母乳曝露の影響が顕著に認められた事象は、甲状腺ホルモン系への作用であった。両者の曝露経路による影響を識別するために、出生後 1 日目に母親を交換する里親養育（cross-fostering）実験を行った。すなわち、経胎盤と経母乳曝露と

もに TCDD 曝露群、経母乳のみ TCDD 曝露群、経胎盤曝露のみ TCDD 曝露群、全く TCDD に曝露していない群の、合計 4 群の解析である。その結果、母乳を介して TCDD 曝露をした 2 つの群において、週齢 21 日目で血清中の甲状腺ホルモン（T4）濃度が下がり、週齢 49 日目で甲状腺濾胞細胞の過形成が生じていた。オランダ研究グループの疫学調査によると、母乳中の PCB 濃度に応じて新生児を 2 群に分けるとダイオキシンと PCB レベルが高いほうが甲状腺ホルモンレベル系への影響があるという、我々の実験結果と同様の結果が得られた。しかしながら、その後のフォローアップにおる学齢期の子供の知能は、出生時点における PCB やダイオキシンのレベル（母親の臍帯血を曝露量の目安として使用）との間に逆相関関係があること、母乳ではなく胎児期曝露の影響が大きいと報告されており、実験動物における学習機能への経胎盤と経母乳影響の検討が緊要なことが示唆された。

免疫機能に関しては、TCDD に曝露した C57Bl/6 マウスに抗原を感作すると、ヘルパーT 細胞の働きが抑えられ抗体産生能が抑制されることが知られている。興味深いことに、胎児期に TCDD 曝露した 3 週齢の雌仔マウスに抗原を曝露すると、対照群よりも IgE 抗体レベルが上昇することを見いだした。アトピー発症への関与についての示唆的なデータと考えている。

上述の雄性生殖器や甲状腺ホルモン系への影響は、アリール炭化水素受容体（AhR）ノックアウトマウスにおいては検出されないことから、AhR に依存性の影響であることが判明した。他方、コプラナーPCB の一種の PCB77 や非コプラナーPCB の PCB153 により、血清中 T4 レベルの低下が生じることから、AhR に依存せず、また水酸化 PCB が関与しない甲状腺ホルモンかく乱メカニズムがあることが示唆された。ダイオキシンの安全基準策定のために用いられている毒性等価係数（TEF）概念から外れる PCB 同族体の影響を評価する必要性があるだろう。

また、ヒトと動物種における感受性の違いの遺伝的背景について、AhR の構造が同一でも胎盤を介した毒性には大きな違いがあることがホルツマン系と SD 系ラットの実験から明らかとなり、さらには、ヒト型 AhR をマウス AhR と置換したマウスにおいては TCDD に対する耐性があることなど、リスク評価の際に、今後、感受性に関わる遺伝要因の解明が極めて重要なことも明らかとなっている。最終年度までに特定の毒性発現条件を絞り込むことができた実験では、遺伝子への作用から毒性の発現プロファイルを調べることを目的とした、いわゆるリバース・トキシコロジーのアプローチによる研究を展開している。

今回の生殖機能、脳行動、免疫機能への影響の指標が生じるダイオキシン用量との関係を、量・反応関係にもとづきまとめた。用量として、生体負荷量を用いた。というのは、ダイオキシンのようにヒトと実験動物とでは、排出速度（生物学的半減期）が大きく異なるために、投与量を用いるとラットやマウスなど実験動物において悪影響が観察される用量は、ヒトが実際に摂取しているダイオキシン用量の 1000 倍以上になり、その値から安全基準を導くことはあまりにも不確実性が大きくなるからである。今回、我々の実験から観察された最小毒性量で最も低かった影響指標は肛門生殖突起間距離であり、生体負荷量が、ヒトが体内に有する 2-6 ng/kg 体重の高々10 倍程度で生じるということが判明した。その他の影響指標は、100-1000 倍のレベルで観察される影響であった。仮に不確実係数の 10 を考慮すると、安全との幅は、10-100 倍というかなり狭

い幅となる。今後、生殖影響はじめ、脳機能・行動、免疫機能の面で、比較的低用量で生じる影響が観察されたことから、ダイオキシンによるメカニズムの解明を行い、環境中に共存する他の物質との複合曝露作用についての知見を集積することが必要と思われる。

2. 研究構想

2-1. 開始時における目標、ならびに研究計画と研究の進め方の概要

世界保健機関（WHO）は、98 年 5 月に「ダイオキシン類の耐容 1 日摂取量に関する見直し」のための諮問委員会を開催した。この見直し作業に参加し感じたことは、第 1 に、リスクアセスメントに使用することができる科学的知見の一層の蓄積が必要であることである。第 2 には、研究面での日本からの発信が極めて不十分であったことである。将来、ダイオキシンリスク再評価を行う際に、日本からリスク評価に適用することができる学術的価値も高い研究成果の発信を集中的に行う必然的かつ緊急性があろう。第 3 に、国際的には 97 年にG7 サミットにおいて環境有害因子の子どもの健康に及ぼす影響に関する研究の必要性が合意され、感受性要因として個人差に関する不確実係数 10 が当てはまらない、感受性が高い時期の子どもへのリスク評価手法が求められているのである。

それでは、比較的低濃度のダイオキシン類への曝露によって、いかなる健康影響が起こりうるであろうか。これまでの文献によれば、精子形成能の低下、子宮内膜症の発生、性比の異常、内分泌・免疫系（甲状腺ホルモン・リンパ球サブセットなど）の揺らぎ、脳機能・行動への影響など、内分泌攪乱作用を示唆する報告が蓄積しつつある。しかし、ダイオキシンの内分泌攪乱作用の実態とそのメカニズムについては、ほとんど解明が進んでいない。そこで、我々は、今回の研究を、単に学術的関心のみの基礎研究ではなく、学術的水準の高いアウトプットを出すとともに、現実に求められているリスク評価へつながる研究として位置づけた。

内分泌攪乱作用に関わる研究課題として、生殖機能、脳機能・行動、免疫機能の面から研究を行うこととし、3 つの研究グループを編成した。さらに、これらの 3 分野の研究を縦糸とすると、横糸の関係にあるリスク評価を第 4 グループとして位置づけた。リスク評価グループにおいては、ダイオキシンの曝露量や代謝産物の量及び生体負荷量と、上記の生殖機能、脳機能・行動、免疫機能との関係をとりまとめることになる。

具体的には、マウスやラットなどの実験動物を用いて、受精卵から出生までの期間にダイオキシンに曝露させ、内分泌攪乱作用を把握するとともに、そのメカニズムの解明を行うことを目指している。　本研究により、感受性が高い妊娠から出生までの時期におけるダイオキシンの作用メカニズムの解明とそのリスクアセスメントへの適用が大きく進展するとともに、日本からの学術的寄与も期待できると確信している。

2-2. その後の展開から生まれた新たな目標

全体としては、現時点で 39 編に及ぶ原著論文、18 編の総説、約 150 件の学会発表などを行った。これは、当初の目標であった、日本からのダイオキシンリスク評価の

基礎となるデータの発信の目標を、私の予想以上に超えるものであった。

生殖機能、脳機能・行動、免疫機能の各側面において、予期しない興味深い現象や、一見、相容れない現象も見いだされた。

さらにリスク評価に、今回のデータを適用するという観点から、得られたデータを俯瞰すると、重要な問題が残っていることがわかる。一つは、今回は胎児期の特定時期に単回曝露による影響を中心に実験を行ったために、多くの所見が経胎盤・経母乳の影響であることである。観察された影響のうち、脳機能・行動や免疫機能への作用など、経胎盤の影響か経母乳の影響なのかを、in vivo の実験で把握することが重要な点を指摘したい。

個別の問題については、紙幅の関係ですべてを網羅できないが、主要な点を以下に記す。

2-2-1. 生殖発生

＊ 前立腺腹葉や泌尿生殖複合体の発達に及ぼすダイオキシンの臨界時期における作用が、どのような遺伝子発現を介して、生後の泌尿生殖器の発達に影響するかは、用量と作用時期が特定できているので、マイクロアレイを用いて検討をすることにより、特定の遺伝子を発見することが可能であろう。

＊ ホルツマン系と SD 系のラットの AhR の構造に違いが無いが、胎盤に対する組織学的異常を介した胎児への作用の実験系が特定できたことから、AhR を介したダイオキシン毒性を修飾する遺伝的背景を調べることが可能となった。これにより、糖代謝や胎盤機能を介した胎児への影響についての新たな知見が得られる可能性がある。

2-2-2. 脳機能・行動

＊ Long Evans 系ラットにおいて、母体の生殖器に奇形を生じないレベルのダイオキシンによる、雌の仔の発情期の促進や中枢性の排卵機能の促進は、ホルツマン系ラットにおけるこれまでの知見とは一見、相反する。ダイオキシンがエストロゲン受容体に作用をしている可能性など、メカニズムを検討することが必要だろう。

＊ 経母乳曝露が甲状腺ホルモンやレチノイド代謝のかく乱を引き起こすことが確認された。その場合の脳機能への作用を検討することが極めて重要となる。

2-2-3. 免疫機能

＊ 生後におけるダイオキシン曝露は、抗体産生を抑制するが、経胎盤曝露・経母乳曝露による雌の仔において、抗原感作による IgE の昂進が観察された。経胎盤か経母乳のどちらが影響しているか、また、雌雄で影響が異なることの意味などを明らかにし、アレルギー発症との関係の基礎的な情報をさらに蓄積することが必要だろう。

＊ T 細胞に特異的に恒常的活性化型 AhR を発現しているマウス及び細胞系が確立できた。ダイオキシンが T 細胞の AhR を直接活性化した場合における影響を明らかにするモデルとなり、また毒性発現における AhR の役割を解明する新たな手段となろう。

2-2-4. リスク評価

＊ 冒頭で記したように、経胎盤と経母乳の毒性発現への寄与を、明確に把握することがリスク評価のためには、不可欠だろう。

＊ TCDD のように AhR に依存して発現する毒性以外に、PCB77 のようなコプラナーPCB や、あるいは非コプラナーPCB（PCB153 など）が示した甲状腺ホルモン系やレチノイド代謝のかく乱については、毒性等価係数（TEF）による毒性評価が可能かどうかを、影響が出ている用量を勘案して、今後、さらにデータを蓄積する必要があろう。

2-3. サブグループが担った役割

2-3-1. 生殖機能グループ

(1) 受精卵から胚盤胞にいたるまでの各段階の初期胚にダイオキシンを曝露させ、その後仮親に戻して発生過程、雌雄の受精卵の生存率と着床率、胎仔から成体までの成長過程に及ぼす影響と DNA メチル化を検討した（大迫・呉ら）。

(2) ダイオキシンの雄の外部生殖器および副生殖腺の発達阻害機構を明らかにするためにテストステロンとその合成酵素，受容体等の変動、その影響の臨界時期、ならびに前立腺発育遅延への AhR 依存性を検討し、さらに原因遺伝子の探索を行った（大迫ら）。また，ダイオキシン類の精子発生ならびに生殖細胞の分化への影響のメカニズムを生殖細胞の培養系を用いて検討した（福澤・大迫ら）。

(3) ダイオキシン類の胎盤機能への影響を明らかにするため，ダイオキシンを様々な条件で投与し，胎児および胎盤に生じる影響を、組織学的、生化学的、及び遺伝子レベルの変動を解析した。さらに、ラット系統による感受性要因の検討を開始した（石村ら）。

2-3-2. 脳機能・行動グループ

(1) TCDD 曝露による新生仔の脳における性ホルモンレベルの変化が性特異的に肝臓で発現している CYP2C11（雄）や 5α-reductase（雌）の酵素の誘導に及ぼす影響を検討した（石塚、曽根）。

(2) TCDD 曝露による新生仔の脳における AhR 応答遺伝子の発現に及ぼす影響（座波、鈴木、曽根）、ならびに ER 応答遺伝子の探索を行った（久寿米木、曽根）。

(3) 脳の性分化時期にダイオキシン投与し、脳の形態形成過程ならびに甘味摂取実験により、脳の性分化を検討した（池田・富田ら）。

(4) ダイオキシンの高次脳機能に及ぼす影響を、性行動や記憶学習試験により検討した。とくに、NMDA 受容体の発現レベルなど、各種の遺伝子発現レベルの検討を行った（掛山ら）。また、海馬が関与する contextual fear conditioning 学習機能と雌雄差についての検討を行った。（前田ら）。

(5) ダイオキシン類の経胎盤・経母乳曝露によって、甲状腺ホルモン系がどのような影響をこうむるかを明らかにするため、ラットやマウス（TTR 欠損マウスを含む）における影響を検討した（西村ら）。

(6) 脳の発達過程におけるダイオキシンの遺伝子発現レベルに及ぼす影響を Differential Display 法で調べ、sfrp2 遺伝子の組織局在性と発現レベルについて検討した（前田、座波ら）。

(7) TCDD のサイクリック AMP 誘導性のグリオーマ細胞の分化への影響の検討した（青木、高永ら）。

2-3-3. 免疫機能グループ

(1) 低用量 TCDD の経胎盤･経母乳曝露が仔の免疫臓器に及ぼす影響や胸腺および末梢 T 細胞に及ぼす影響、胸腺萎縮のメカニズムを検討した。細胞表面分化マーカー、サイトカイン産生、アポトーシス関連蛋白質などをマーカーとて、ダイオキシンの経胎盤曝露が胸腺における T 細胞の分化に及ぼす影響の量-反応関係を検討した（野原、九十九ら）。

(2) TCDD による抗体産生抑制のメカニズムを、高親和性抗体産生への影響（井上、野原)、T 細胞由来サイトカイン産生に対する影響（伊藤、野原)、T 細胞の反応性（野原）ならびに経胎盤・経母乳曝露による免疫反応への影響（井上、野原）の観点から検討した。

(3) AhR の活性化が T 細胞の増殖に及ぼす影響を､T 細胞特異的恒常的活性化型 AhR トランスジェニックマウスを用いて検討すると共に（野原)、恒常的に活性化した AhR を発現する Jurkat T 細胞を用いて細胞増殖への AhR の影響を検討した。（伊藤、野原ら）。

(4) アレルギーおよび感染抵抗性に及ぼす影響の検討を行った。具体的には、アトピー性皮膚炎自然発症マウス（NC/Nga) においてアレルギーの発症・増悪に対するダイオキシン経胎盤曝露の影響の量-反応関係と、メカニズムを検討した（藤巻ら）。さらに、低用量ダイオキシンによる感染抵抗性に及ぼす影響を、インフルエンザウィルス感染性について種々のマウスの系統を用いて検討した（野原ら)。

2-3-4. 内分泌攪乱作用に基づいたダイオキシンのリスク評価手法の提示

上記 2-3-1 から 2-3-3 までの研究課題から得られた、初期胚から新生仔のおけるダイオキシン類への曝露量とその反応・影響の質的・量的な関係をとりまとめ、感受性の高い時期におけるリスク評価手法の提示を行った。

(1) 曝露量については、標的臓器、肝、血液、脂肪組織ダイオキシン濃度を GC-MS により測定した。また、経胎盤曝露と胎仔へのダイオキシンの移行、ダイオキシン量と反応との関係を検討した （宮原、米元）。

(2) 反応については、上記 2-3-1、2、3 の各・サブテーマの標的臓器を中心とした病理組織学的検索を行った（西村、米元）。

(3) 上記の研究によって明らかになった各サブテーマにおける曝露量と各反応（エンドポイント）との関係を整理し、ダイオキシン毒性の特徴を、低用量、臨界時期、AhR 依存性、さらに感受性因子の観点から検討した（米元、遠山）。

3. 研究成果

3.1　生殖機能への影響

1996 年 Theo Colborn らの著作「奪われし未来」が多くの読者の環境問題への共感を呼んだ理由のひとつには、環境汚染物質の中には成熟個体に悪影響を起こすだけではなく、生殖機能、特に初期発生や生殖巣内の配偶子形成に障害が生じ、我々の感知しない間に次世代の人類の存続が危ういことになるという警告を発したことにあるだろう。1998 年の世界保健機関におけるダイオキシンおよびその関連化合物のリスク評価に関する専門家会合においては、ダイオキシンによる影響指標として、発がんや慢性毒性よりは、生殖機能、学習機能、免疫機能などが主要な影響指標として取り上げられた。

過去 50 年間にヒトの精子数が半減しているとの Carlsen らのメタ解析による指摘もある。この研究を開始した後に発表されたイタリア・セベソにおける出生性比が女児に偏ること、父親側にあるの要因であることなど、ダイオキシン汚染による受精から胎児発生さらに出産に及ぼす影響は、極めて重要な研究課題である。

我々は、初期胚から妊娠後期にわたりダイオキシンを曝露した際の生殖機能に関わる各種エンドポイントに関して、主に受精卵への直接曝露による胚仔発生、胎仔期曝露による雄性生殖機能への影響、雄生殖細胞への影響、胎盤・胎仔への影響とその作用メカニズムについて検討した。

3.1.1　受精卵、初期胚への影響（呉 慶）

(1) 研究内容および成果

1. マウス着床前胚への TCDD 直接曝露による胚発生と遺伝子発現に対する影響

ダイオキシン類を哺乳類の受精卵や初期胚に直接曝露した場合、これら細胞集団がどのような反応を示すか詳細に検討した報告は少ない。ここでは、マウス受精卵の体外培養系において着床前胚に対する TCDD 曝露を行い分化レベルや遺伝子発現に対する影響を観察した。過排卵処理した ICR マウスを交配後に受精卵を採取し、1 細胞期、2 細胞期および 8 細胞期胚を TCDD（0 , 0.01, 0.1 , 1 , および 10 nM）を含む培養液中で 12 時間および 24 時間培養した。その結果、2 細胞期、8 細胞期および胚盤胞胚の形成率は、

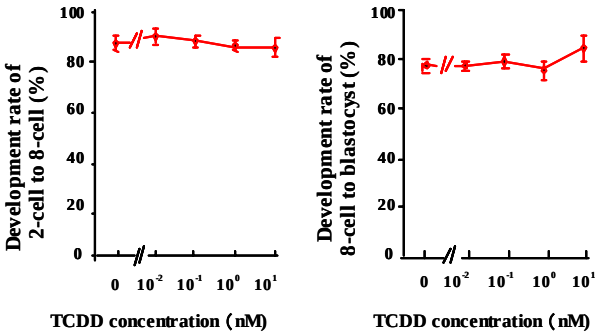


図 1.　マウス受精卵体外培養系において TCDD を様々の濃度で曝露し、2 細胞期胚から 8 細胞期への形成率、8 細胞期胚から胚盤胞胚の形成率を測定したが、各群の形成率はどちらにおいても約 80%で、TCDD 曝露による影響はみられなかった。

各群 80%以上で、TCDD 曝露による影響はみられず、以前の報告と異なりその後の培養胚の分化率に影響は無いことが示された(図 1)。また、各培養胚から RNA を抽出し、各種遺伝子の発現を半定量的 RT-PCR で測定したところ、1 細胞期および胚盤胞においてダイオキシン受容体であるアリールハイドロカーボン受容体（AhR）および AhR 核輸送タンパク（Arnt）の発現は観察されるが、8 細胞期においては発現が観察されないこと、またダイオキシンバイオマーカーである CYP1A1 の誘導は胚盤胞ではあるものの、1 および 8 細胞期胚では TCDD 曝露群においても検出されないことが判明した（図 2)。これらの結果より 1-8 細胞期胚はそれ以降の胚と TCDD に対する感受性に差があることが示唆された（Wu *et al.*, 2002)。

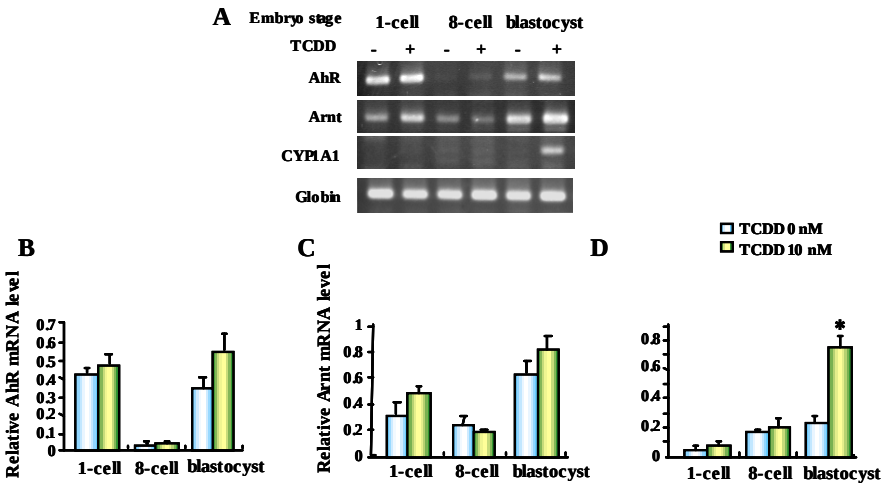


図 2.　AhR および Arnt mRNA は 1 細胞期胚で検出できたが、2 細胞期では検出できず、8 細胞期に再び発現し、胚盤胞期にそのレベルは上昇した（A)。AhR および Arnt mRNA レベルには、TCDD 曝露群と対照群の間に差はみられなかった（B,C)。CYP1A1 mRNA は 1 細胞期から 8 細胞期まで TCDD による誘導はみられなかったが、胚盤胞胚期では顕著な上昇が認められた（A,D)。

2. マウス着床前胚への TCDD 直接曝露が発生胚のゲノムメチル化に与える影響

上記経胎盤・経母乳 TCDD の着床前胚 TCDD 曝露系を用い、1-8 細胞期胚に TCDD を曝露、仮親に胚移植し、GD14 における胎仔重量を測定したところ、TCDD 曝露群で有意な体重減少が観察された。これは 1-8 細胞期胚における TCDD の作用が着床前胚に何らかの影響を及ぼし、その作用が持続的に胎仔発育に影響したためと考えられる。そこで、この胎仔からゲノム DNA を抽出し、胎仔発育に関連するとされる H19-Igf2 遺伝子のゲノミックインプリント領域のメチル化パターンに関する父系母系の頻度解析を Bisulfite genomic sequence 法で行った。対照群では父系母系の比率は 1 対 1 であったが、TCDD 曝露群では父系メチル化 DNA の比率が増加し、さらに部分メチル化パターンが約 20%の頻度で観察された（図 3)。また、曝露した初期胚の DNA メチルトランスフェラーゼ活性を測定したところ、TCDD 曝露群で有意な活性の上昇が確認された。これらの結果は初期胚に対する TCDD 曝露がゲノムメチル化に影響を与えることを示唆している（Wu *et al.*, submitted)。

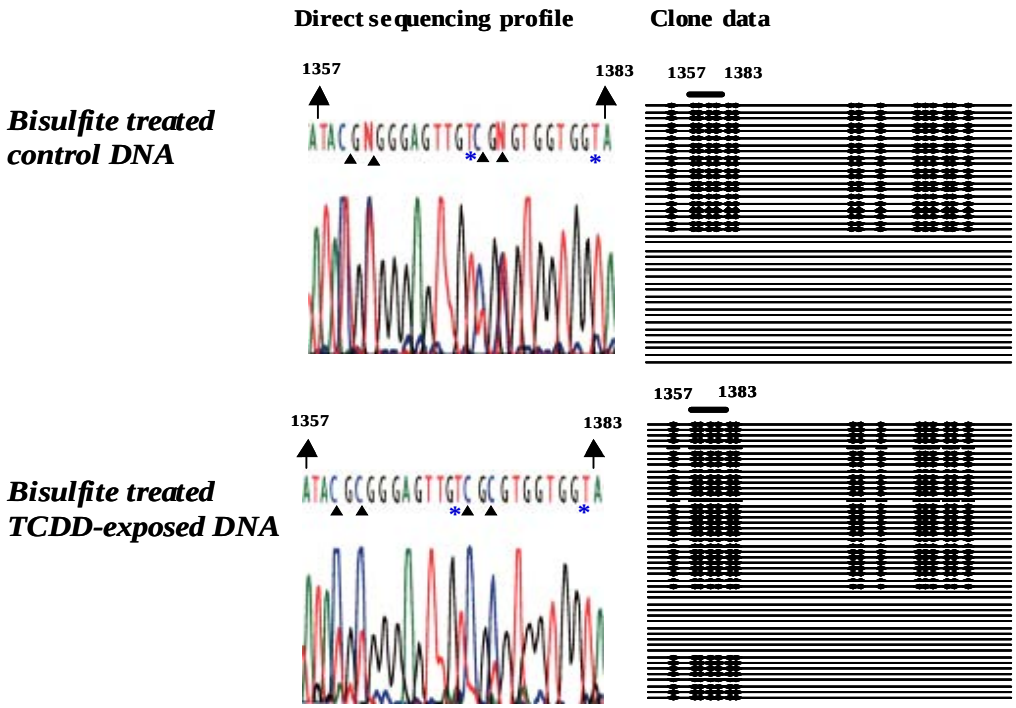


図 3. パネル（上段）は PCR 産物のダイレクトシークエンスのチャート（メチル化 CpG：▲）、パネル（下段）Bはクローニングシークエンスデータ（メチル化 CpG：◆）である。対照群胚では、メチル化 CpG における C-peak と T-peak の高さは同じで、プラスミドクローンのシークエンス結果でも、正常なメチル化パターンを示すクローンが 50%を占めた。一方、TCDD 曝露群では、C-peak は T-peak より高く、メチル化クローンの割合は対照群より多かった。このことから、TCDD 曝露は着床前胚のH19 遺伝子メチル化頻度を上昇させることが示唆された。

(2) 研究成果の今後期待される効果

体外受精系における TCDD 曝露実験を行い、過去の報告と異なり胚の分化レベルでの影響は観察されなかったが、CYP1A1 の解析から初期胚にはダイオキシン特異的に何らかの影響が現れる事が示された。その具体的事例としてゲノム DNA メチル化レベルの変動が関与していることが初めて示唆され、環境汚染物質とエピジェネティクスに関する研究の重要性が本研究により見いだされた。

3.1.2 雄性生殖機能に対する影響（大迫 誠一郎）

(1) 研究内容および成果

1. 経胎盤・経母乳 TCDD 曝露による産仔の雄性生殖器発生影響—低用量実験

ダイオキシン類の母体曝露により生じた仔への影響の中でも、雄性生殖機能への影響（精子数減少・生殖器の大きさの減少）は、実験動物を使用した報告で極めて低用量で起こるとされることから、ヒトの健康リスクを考える上でも極めて重要な現象の一つである。これまで、Peterson ら、Gray らにより胎仔の発生過程における経胎盤的曝露実験が報告されたが、精巣上体における精子数減少以外、特に精巣内の精子形成に及ぼす影響など統一した見解は得られていない。そこで我々は、彼らとほぼ同じプロトコールを

用いることにより、低用量 TCDD の母体曝露による雄性生殖機能の発生影響を再度調べた。妊娠 15 日目（GD15）のホルツマン（Holtzman）ラットに、0, 12.5, 50, 200, 800 ng/kg/BW の TCDD をコーンオイルに溶かして単回で経口投与した。生まれた雄の仔を出生後 49 日齢（PND49）、120 日齢（PND120）において解剖し、肛門生殖突起間距離（AGD）、精巣重量、精巣上体重量、副生殖腺（前立腺・精嚢腺）重量、一日精子産生数（DSP）、精巣上体尾部精子数（SR）等を測定した。その結果、精巣重量と DSP については、PND49 および PND120 ともに今回用いた TCDD 投与用量による変化は認められなかった（図 4）。

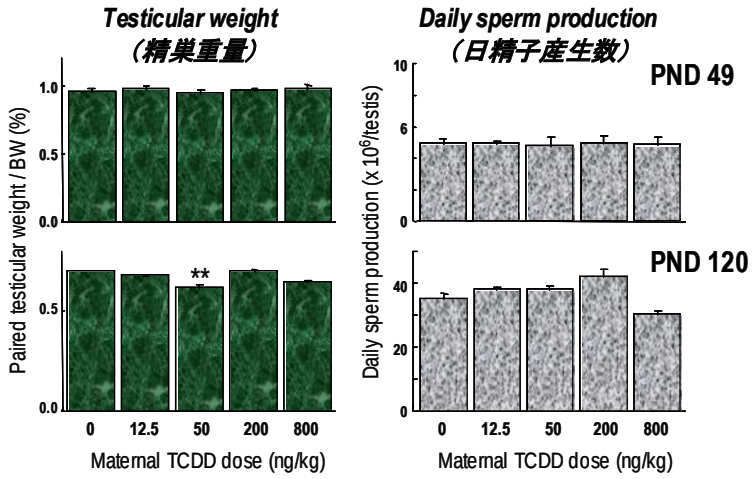


図 4. 胎仔期低用量 TCDD 曝露による産仔の精巣重量および DSP への影響。過去の報告と異なり、どの観測ステージにおいても用量依存的減少は観測できなかった。

また、精巣上体重量および SR にも変化はなかった。さらに血清中ホルモン濃度（Testosterone, LH, FSH）をイムノアッセイで測定したが、TCDD 曝露による変動はなかった。しかし、副生殖腺のうち、前立腺重量は 200 ng/kg および 800 ng/kg 投与群で減少し、精嚢腺にも 800 ng/kg で多少の減少が観察された。肛門生殖突起間距離については、PND49 および PND120 ともに TCDD の用量依存的減少傾向が認められ、特に PND120 では、50 ng/kg 用量以上で統計学的に有意性が認められた。さらに、半定量 RT-PCR によりサンプリングした各組織の種々の遺伝子発現変動を解析したところ、前立腺腹葉内 5α-reductase mRNA の発現が用量依存的に上昇し、Androgen receptor (AR) mRNA は逆に減少することを見いだした（図 5）。その最小毒性量（Lowest Observed Effect Level: LOEL）は 12.5 ng TCDD/kg であった。この結果より、TCDD 胎仔期曝露による前立腺腹葉重量の減少は、AR の減少（アンドロゲン感受性の低下）によることが示唆された（Ohsako *et al.*, 2002）。

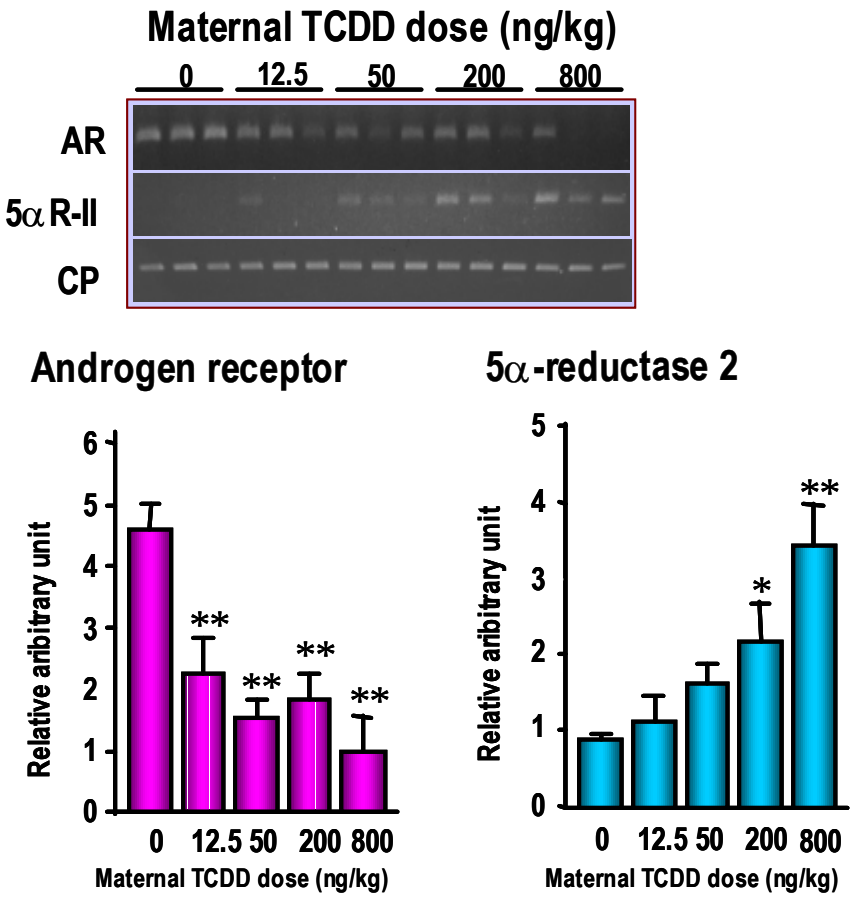


図 5. 胎仔期の低用量 TCDD 曝露による産仔の腹側前立腺内遺伝子発現の変化。PND49 において腹側前立腺から RNA を抽出、半定量 RT-PCR によりアンドロゲン受容体（AR）および 5α還元化酵素（5RD）の mRNA レベルを測定した。AR は用量依存的に減少、5RD は逆に用量依存的に増加することがわかった。

2. 経胎盤・経母乳 TCDD 曝露による前立腺発育遅延の感受性時期に関する検討

上記、第 1 節に記した実験のように母体に対して経口投与した場合、ダイオキシンの胎仔への移行量は胎仔の発育とともに減衰する。しかし、出産後の新生仔は、胎盤を経由して摂取する以上の量のダイオキシンを授乳を介して摂取するため、新生仔体内負荷量は増加する。

そこで、我々は、第 1 節に記した雄性生殖器の発育影響が胎仔および新生仔のどの発育ステージにおけるダイオキシン曝露を最も鋭敏に反映しているのかを検討した。そのために、妊娠 Sprague Dawley（SD）ラットの GD15 または GD18 に 1 μgTCDD/kg を経口投与および PND2 の新生仔に 1 μgTCDD/kg を直接皮下投与し、PND70 において同様の雄性生殖機能指標を観察した。その結果、いかなるステージにおいても精巣重量や DSP には TCDD 曝露による統計学的に有意な差は見られなかったが、GD15 投与で AGD と前立腺腹葉の減少、Androgen receptor mRNA の前立腺内での減少が見られた。しかしながら GD18 と PND2 投与群では変化がなかった。一方、前立腺内に残留する TCDD 濃度は GD15 投与群に比べて、GD18 と PND2 投与群のほうが高かった。以上の結果よ

り、前立腺重量の減少は、GD15 より後の妊娠期間中における曝露では引き起こされないこと、すなわちクリティカルウィンドウの存在が示された（Ohsako *et al.*, 2002）。

3. 経胎盤・経母乳 TCDD 曝露による前立腺発育遅延に関する AhR 遺伝子依存性

TCDD によるこの現象（雄産仔の前立腺発育遅延）がダイオキシン受容体であるアリールハイドロカーボン受容体（AhR）遺伝子依存的であるか検討するため、AhR 遺伝子ノックアウトマウスを用いた検討を行った。AhR ヘテロ(+/-)雌雄を交配し、GD13 に 10 μgTCDD/kg を母体に経口投与、PND14 に雄産仔の AGD を測定、その後、遺伝子型を決定した。その結果、野生型 AhR（+/+）個体およびヘテロ AhR（+/–）個体の AGD は対照群の雄産仔の AGD より 19.6%、22.2%の減少を各々示し、統計学的に有意であったが、ホモ AhR（–/–）個体では有意な減少が見られなかった。また、採取した精巣および尿生殖器複合体（UGC）から、トータル RNA を調整して、各種遺伝子発現を検索した。UGC において AhR(+/+)および(+/-)の TCDD 投与群のみに CYP1A1 および CYP1B1 の著しい発現亢進がみられたが、AhR（–/–）個体では TCDD による亢進はみられなかった。

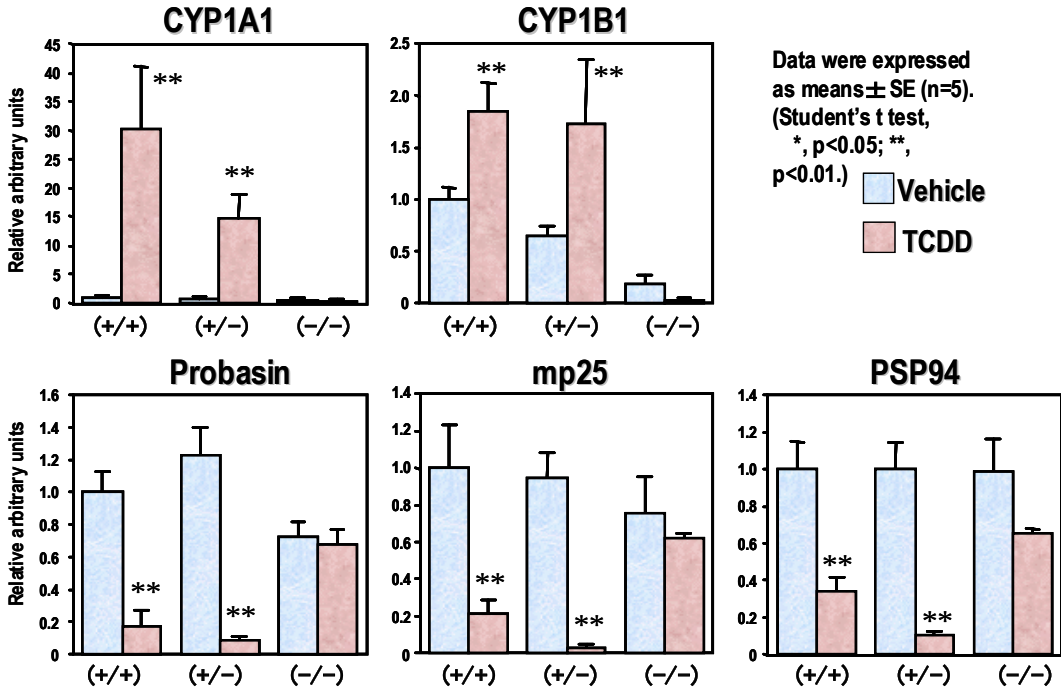


図 6.　AhRKO マウスに対する TCDD の作用。ヘテロ妊娠個体 GD13 に TCDD を投与、GD14 における尿生殖器複合体（UGC）内、各種遺伝子発現を検索した。生まれてきた野生型およびヘテロ個体では TCDD 投与より CYP1A1 および CYP1B1 の著しい発現亢進がみられたが、ホモ個体では TCDD による亢進はみられなかった。前立腺上皮細胞分泌タンパクである Probasin、mp25、PSP94 の発現は、３種の遺伝子型対照群およびホモ個体の TCDD 投与群で十分なの mRNA レベルがあるものの、野生型およびヘテロ個体の TCDD 投与群では著しく減少していた。

逆に前立腺上皮細胞分泌タンパクである Probasin、mp25、PSP94 の発現は、AhR(+/+)および(+/-)の TCDD 投与群のみで消失あるいは著しく減衰していた。3 種の遺伝子型

（AhR(+/+)、(+/-)および（-/-)）の Vehicle 対照群および AhR（–/–）の投与群では、変化がなかった。これは PND14 において AhR(+/+)および(+/-)の TCDD 投与群では前立腺発達が不十分であることを示している（図 6)。これらの結果から、ダイオキシンによる雄性生殖器発生影響は AhR 依存的であることが判明した。

一方、精巣における遺伝子発現を検討したが、ステロイド合成酵素群（P450scc, P450c17, 3bHSDI, 17bHSDIII)、生殖細胞分化マーカー（Calnexin-t, Hsp70-2)、セルトリ細胞分化マーカー（Androgen binding protein）ともに 3 種の遺伝子型マウス間で有意差はなく、TCDD による変動もみられなかった。さらには、CYP1A2 および CYP1B1 などにダイオキシン曝露マーカーにも変動はみられなかった。この結果は、精巣が UGC に比べて TCDD に対して感受性が低いことを示している。

4. マイクロアレイを用いた胎仔期 TCDD 曝露による前立腺発育遅延に関する原因遺伝子探索

この現象を起こす TCDD と AhR に依存性の遺伝子を探索するため、野生型マウスに同一用量 TCDD（10 μg/kg）を GD13 または GD17 に投与し、24 時間後に雄胎仔の全 RNA を回収し、マイクロアレイ解析を行った。その結果、3756 の全遺伝子中、132 遺伝子および 239 遺伝子が GD13-TCDD 投与群で up あるいは down –regulation されていた。そのうち GD17-TCDD 投与群でも up あるいは down –regulation される遺伝子は、それぞれ 14 と 38 遺伝子であった（図 7)。以上の結果は、GD13 のマウス胎仔が GD17 胎仔とは異なる TCDD 応答性遺伝子のセットを発現していることを示唆する。GD17 胎仔への TCDD 曝露は前立腺の発育遅延を起こさないとの報告もあり、今回 GD13 で検出した遺伝子の中に TCDD と AhR に依存性の原因遺伝子がある可能性がある。

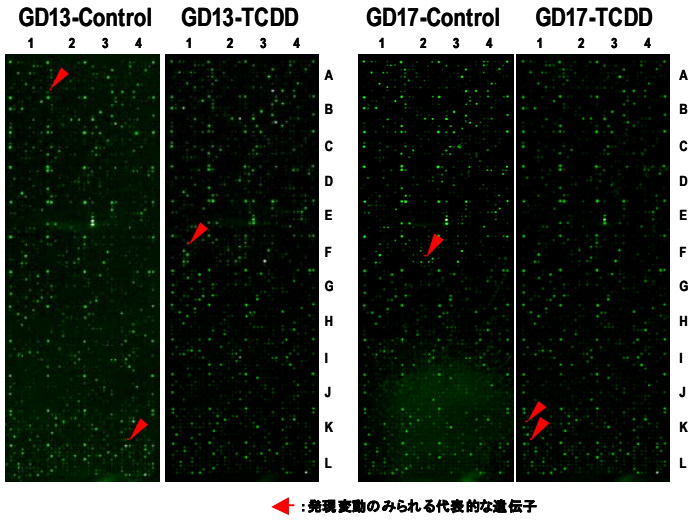


図 7. マイクロアレイ（Atlas Glass Mouse 3.8 I Microarray : 3756 genes）イメージ。

5. 新生仔精巣の器官培養系による生殖細胞分化に及ぼすダイオキシンの影響解析

ダイオキシン類が雄配偶子（精子発生）に対して直接的に影響するのか検討するため、出生直後の ICR マウス精巣を摘出し、コプラナーPCB（co-PCB ; 3,3',4,4'-5 PCB）を 0, 10, 100, 1000 nM を含む培地で 48 時間、器官培養し、各細胞の増殖率および各種の遺伝子発現を解析した。まず CYP1A1 mRNA は co-PCB の用量依存的に上昇した。生殖細胞お

よび支持細胞の BrdU ラベリングインデックスに変化はなく、また細胞マーカーの発現レベルにも影響はなかったため、ダイオキシン類は新生仔精巣の細胞分化に対する影響は少ないものと考えられた（図 8）。一方、ステロイド合成酵素である P450scc mRNA レベルは用量依存的に減少し、P450c17 mRNA レベルは用量依存的に上昇した。この結果はダイオキシン類が新生仔精巣におけるステロイド合成に影響する可能性を示唆している（Fukuzawa *et al.*, 2003）。

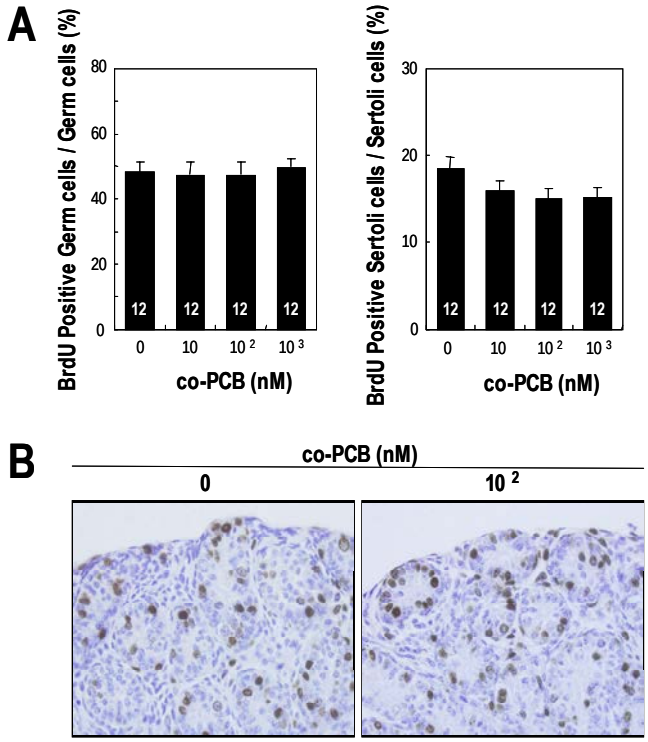


図 8. 新生仔精巣器官培養系における Co-PCB 曝露の生殖細胞とセルトリ細胞の増殖への影響。Co-PCB 添加培養後 BrdU ラベルし、各細胞タイプのラベリングインデックスを測定した。A, Co-PCB 各濃度における生殖細胞とセルトリ細胞の増殖率。B, Co-PCB 100 nM と対照との組織上の比較。Co-PCB 曝露による生殖細胞とセルトリ細胞への増殖率への影響は観察されなかった。

6. 成熟個体における TCDD 投与の精巣への影響—Estradiol Benzoate との比較

精巣内ステロイド合成酵素遺伝子のダイオキシンによる発現変動を解析し、同時に成熟個体精子発生に対する高濃度ダイオキシン影響を観察するため、野生型（wt）および AhR 遺伝子欠損（AhRKO）成熟雄マウスを用い TCDD 100 μg/kg 投与後 7 日目に解剖した。精巣内テストステロン値は野生型で有意に減少したが、AhRKO マウスでは変化がなかった。また wt のみで P450scc 発現レベルが mRNA およびタンパクレベルで減少した。したがって、テストステロン産生抑制と P450scc 発現抑制は AhR 遺伝子依存的であることが明らかとなった。また、TCDD 投与群の下垂体内 LHβサブユニット mRNA レベルを、陽性対照のエストラジオールベンゾエート(EB) 100 μg/kg 投与群と比較解析したが、TCDD 投与では EB の様な LHβサブユニット mRNA の消失は無く、Vehicle 投与群との差は認められなかった（図 9）。上記の結果は、TCDD による精巣内ステロイド酵素遺伝子（P450scc）の down-regulation が下垂体・性腺軸の変調によるものではなく、精巣特異的現象であることを示唆している。また、精子発生に関しては組織学的には TCDD 曝露による生殖細胞分化の変調は全く観察されず、生殖細胞分化マーカーの発現レベルにも変動はなかった。精巣内テストステロン値も前述のように TCDD によ

る減少（50%）が認められるが、その値（39 ng/g testis）は、EB 投与群に見られる測定限界付近の数値（4 ng/g testis）に比べ、その減少レベルが正常成体内の濃度パルス振幅内に留まっており、また P450scc 遺伝子発現抑制も EB による抑制（80%）を大きく下回るものであった。以上の結果から、マウス成熟個体への TCDD 高濃度曝露は、P450scc 遺伝子発現レベルを減少させるものその効果は合成エストロゲン剤の EB ほどではなく、この観測ポイントでは精子発生にほとんど影響しないことがわかった。

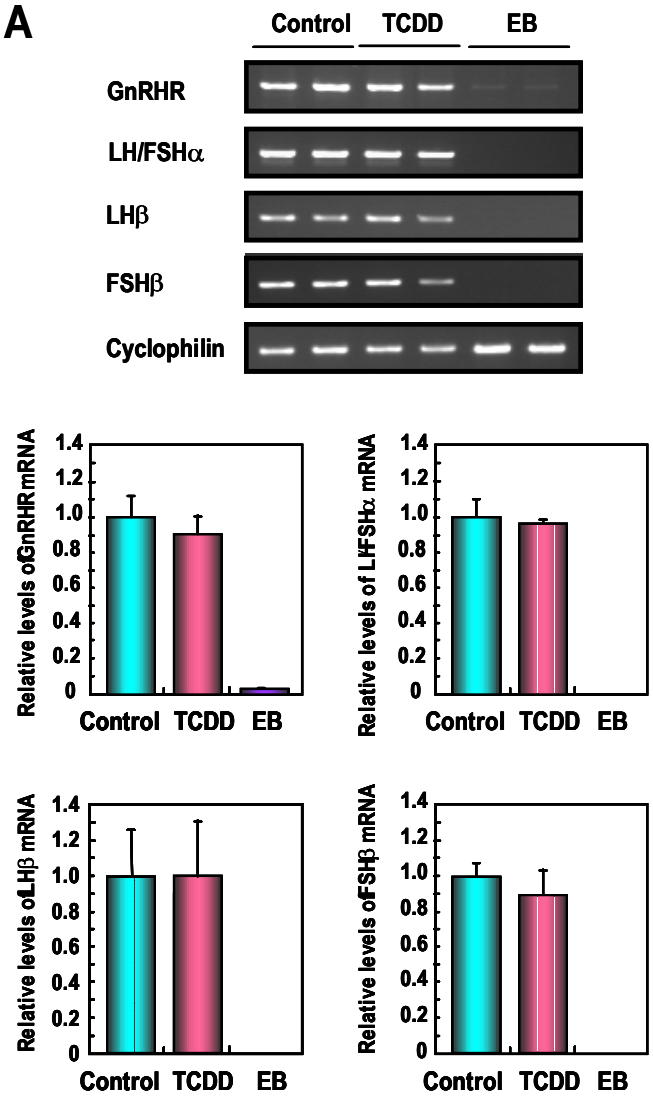


図 9. 野生型マウスにおける TCDD（100μg/kg）投与の下垂体ホルモン・GnRH 受容体遺伝子発現および精巣内下垂体ホルモン受容体発現レベルへの影響とそのエストラジオールベンゾエート(EB) 100 μg/kg 投与群との比較。陽性対照の EB 100 μg/kg 投与群では下垂体において LHFSHαLHβ, FSHβの 3 種のサブユニット mRNA が完全に消失、さらに GnRHR も著しい発現低下を示したが、TCDD 投与ではいずれも Vehicle 投与群との差は認められなかった。

(2) 研究成果の今後期待される効果

上記一連の研究により、胎仔期における低用量ダイオキシン曝露は実験動物レベルにおいて雄産仔の雄性生殖機能に影響を及ぼすことが再確認された。経胎盤・経母乳 TCDD におけるホルツマンラットを用いた実験で、目に見える指標として用いた ADG の短縮で統計学的に有意性の出た 50 ng TCDD/kg は、2001 年の WHO と国連食糧農業機関（FAO）の食品添加物合同専門委員会（JECFA）におけるダイオキシン類の暫定耐容 1 月摂取量（PTMI）算出根拠として使用された。これは我々の研究成果がヒトが曝露する可能性のある低用量でのダイオキシンによる内分泌撹乱作用を精査した論文と

して評価されたことを意味する。しかしながら我々はその論文中で、観測された影響、すなわち雄産仔の前立腺発育不全が悪影響（Adverse effect）であるとは言及していない。この現象がヒト集団内で生じた場合どのような世代影響が出るかは不明であるし、また曝露したすべてのラットやマウスにこのような形質的変化のみで繁殖障害が起きるとは考えられない。逆に、ラットを用いた胎児期および授乳期曝露（第 1 節及び第 2 節）やマウスの実験（第 3 節）でもわかるように、精巣という雄性生殖機能にとって最も重要な器官内での配偶子形成は、他の組織が十分にダイオキシンに反応して変調を起こしているにもかかわらず、如何なるステージ（胎生期、新生仔期、成熟期）においても影響は観察されず、精子発生過程はダイオキシン曝露に対して、後述の他の指標に比べてむしろ耐性であるという点を強調したい。我々の知見やこれまでの疫学的知見から判断する限り、少なくともダイオキシン単独ではヒト集団における精子数減少を誘起するとは考えにくい。

3.1.3 TCDD 曝露の胎盤機能に及ぼす影響 （石村 隆太）

（１）研究内容および成果

ダイオキシン類の多岐にわたる影響の中でも、母体には影響を示さない用量で奇形・死亡など様々な異常を示すことから、子宮内胎仔への影響が最も危惧されている。かりに奇形などの症状が現われなくても、胎仔期にうけた影響はメチル化パターンの変化をとおして個体の一生涯にわたってハンディキャップを負わせる可能性も明らかになってきた。従って、妊娠母体が TCDD に曝露した場合、胎仔が健全に生育できる子宮内環境が保障されているかどうかを見極めることは重要な知見となる。胎盤は、母体から胎仔への酸素や栄養分の供給を始めとして、胎仔が正常に発育するための様々な機能を担っている。すなわち胎盤の機能が低下することは、胎仔の健全な発育が損なわれることを意味している。本研究では、まず TCDD 曝露により胎盤にどのような機能変化がおきるのかを解析し、最も顕著な影響である胎仔死亡との関連を明らかにすることを目的とした。次に、胎盤の機能不全および胎仔死亡が、どのようなメカニズムでおきているかについて解析を行った。

まずホルツマン（HLZ）ラットを用いて、胎盤におきる変化を調べた。HLZ ラットの妊娠 15 日（GD15）に 1.6 μg/kg の TCDD を曝露すると、GD20 に約 13%の胎仔が死亡した（Ishimura *et al.*, 2002a）。このとき、胎盤では、グリコーゲン細胞の退行が遅延した組織像（GC-EM、図 10）の出現、グリコーゲン量の上昇、グルコーストランスポーター3 mRNA の発現上昇を含めたグルコース動態の変化がおきることを明らかにした（Ishimura *et al.*, 2002a）。

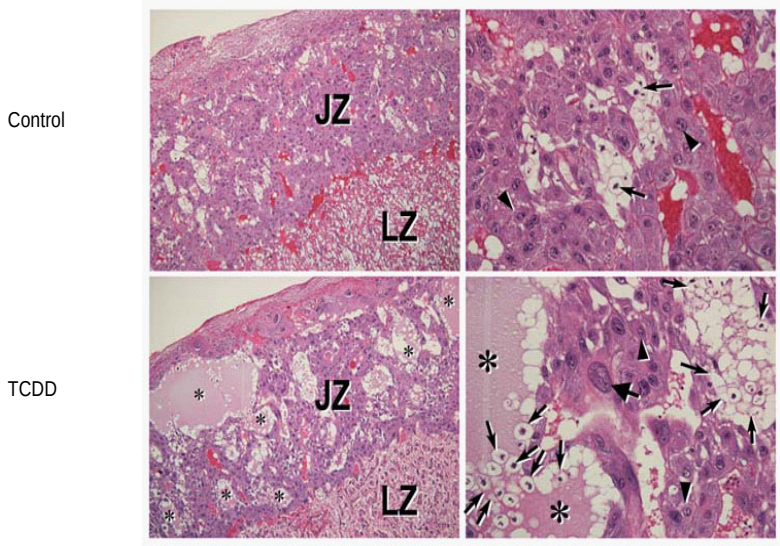


図 10. TCDD 曝露による胎盤結合部（JZ）の形態変化。胎盤の垂直方向の切片（厚さ 5 μm）に対し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。TCDDに曝露した胎盤では、グリコーゲン細胞（矢印）とそれが融解して生じたエオシン好性の部位（GC-EM、星印）が、増大している。矢頭、海綿状栄養膜細胞；LZ、胎盤迷路部。

一方、同様な胎盤グルコース動態の変化は、糖尿病モデルラットやアルコール摂取ラットにおいてもおきることが知られており、TCDD 曝露胎盤およびこれら疾患動物の胎盤とでは、共通した病態メカニズムが存在している可能性が考えられた。これら疾患動物の胎盤では低酸素状態がおきている可能性が指摘されている。そこで我々は、TCDD 曝露胎盤

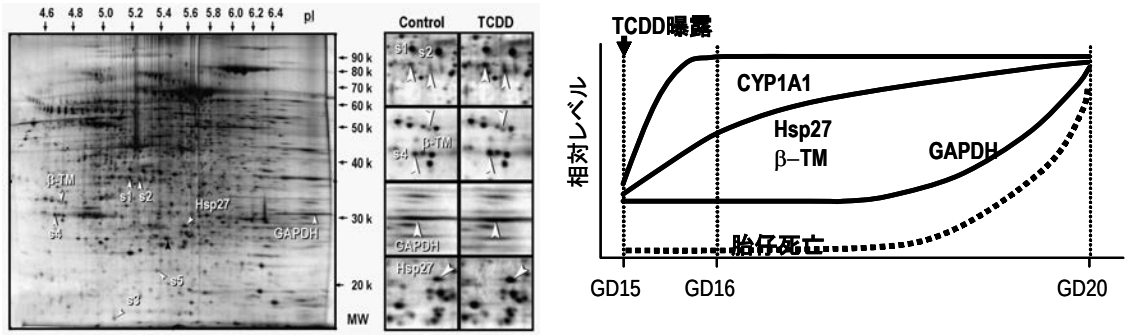


図 11. TCDD曝露胎盤では、heat shock protein 27 (Hsp27)、beta-tropomyosin (β-TM)、glyceraldehyde–3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)のタンパク量が上昇することが明らかになった。また結紮モデル動物を用いた解析により、GAPDH は胎盤の低酸素状態の指標となることを明らかにした。すなわち TCDD 曝露胎盤では、GD20 において低酸素状態になることが考えられた。

と子宮動脈を結紮し人工的に低酸素状態にした胎盤を作成し、TCDD 曝露胎盤と比較を行った。二次元電気泳動法を用いて生化学的に解析したところ、TCDD 曝露胎盤でも低酸素状態がおきていることが明らとなった（図 11）（Ishimura *et al.*, 2002b）。

このことから、TCDD に曝露した胎盤では、血流量に低下をきたす何かしらの組織変化が生じていると予想された。胎盤迷路部の組織を精査したところ、正常動物の胎盤では妊娠後期に胎仔血管および母体血管洞が拡張して成熟することを明らかにし、TCDD 曝露胎盤では、その成熟が阻害されることを明らかにした（図 12）（Ishimura *et al.*, 2003）。この血

管成熟阻害は胎盤の血流量の低下を招くと考えられ、そのため胎盤が低酸素状態になると考えられた。本研究において、TCDD 曝露胎盤では、母子双方の血管の成熟が阻害されていることが明らかとなり、胎仔の死亡リスクを上昇させている原因が初めて示された。

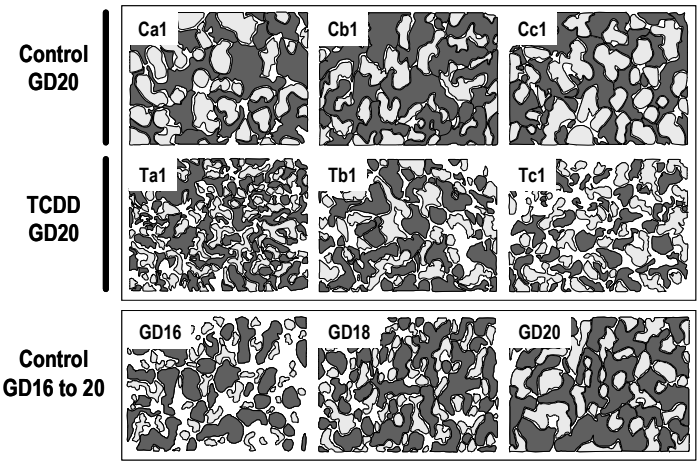


図 12. 胎盤の水平方向の切片を作成し、画像解析により、母体血管洞（MBS、黒色部位）および胎仔血管（FC、灰白色部位）を示した。それ以外のブランクの部位は、栄養膜細胞に相当する。対照群に比べて TCDD 曝露群の胎盤では、MBS および FC ともに拡張していない。また対照群の胎盤では、GD16 から GD20 にかけて、MBS および FC が拡張していた。

次に、この胎盤機能不全と胎仔死亡がどのようなメカニズムでおきているのかについて解析を試みた。TCDD 毒性には動物種や系統間において大きな感受性差が存在する。この特徴を逆手に利用して TCDD 毒性メカニズムが明らかにされた経緯がある。我々は、独自に見出した胎盤機能不全・胎仔死亡の指標をもとに、どれほどの系統差があるのか、またどのようなメカニズムで毒性が生じるのかについて検討することを試みた（Kawakami et al., 2003）。上記のホルツマン（HLZ）ラットと Sprague-Dawley （SD）ラットを用い、HLZ ラットに 1.6 μg TCDD/kg を、SD ラットには 0、2、5、10 μg TCDD/kg を GD15 に曝露し、GD20 に解析した。SD ラットでは HLZ ラットとは対照的に、高用量(10 μg/kg)の TCDD 曝露によっても胎仔死亡は認められなかった（表 1）。また同様に胎盤でも、SD ラットではグルコ

表1 HLZラットおよびSDラットのGD20における胎仔死亡数

	HLZ		SD			
母体TCDD用量 (μg/kg)	0	1.6	0	2	5	10
母体数	5	6	5	5	5	5
胎仔総数	74	81	71	71	67	69
胎仔死亡数	0	10	0	0	0	0
胎仔死亡率（%）	0	13.6±0.95	0	0	0	0

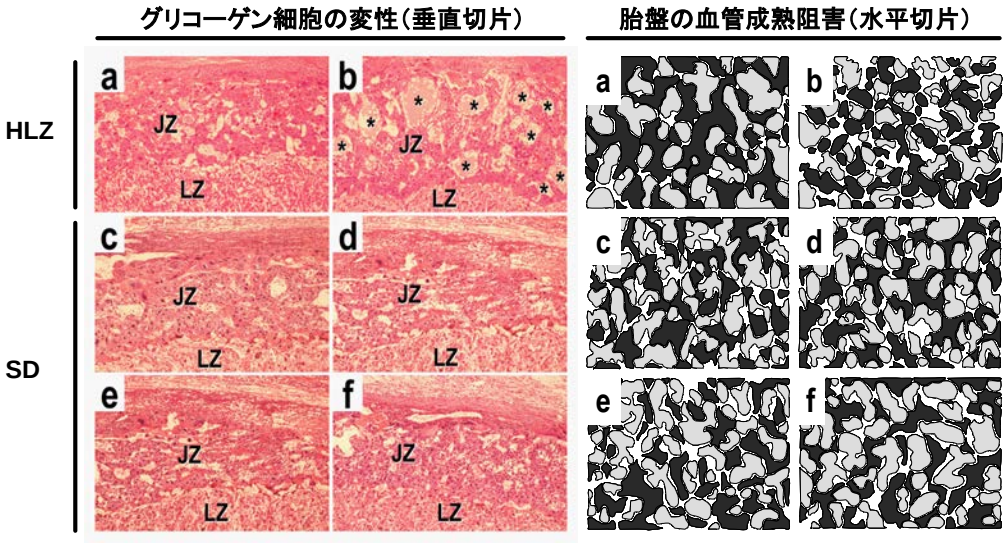


図 13.　胎盤の垂直切片および水平切片を作製し、それぞれ結合部位におけるグリコーゲン細胞の変性（GC-EM、星印）、および迷路部位における血管の成熟阻害について調べた。a) HLZ control、b) HLZ 1.6 μg TCDD/kg、c) SD control、d) SD 2 μg TCDD/kg、e) SD 5 μg TCDD/kg、f) SD 10 μg TCDD/kg。。HLZ ラットにのみ、GC-EM の出現および胎盤血管の成熟阻害が観察され、SD ラットには変化は認められない。

ース動態の変化および胎盤血管の成熟阻害も観察されなかった（図 13）。すなわち、胎盤の機能不全と胎仔死亡は密接な関連があり、HLZ と SD ラットでは TCDD に対して著しい感受性の相違があることが示された。TCDD の生体毒性の強さは、AhR の一次構造ひいては活性の強さに依存すると考えられている。そこで、両系統の AhR の一次構造を調べたが、予想に反し差異は認められなかった。さらに、AhR の活性を測定する目的で、両系統ラットに、0、0.0125、0.05、0.2、0.8、1.6μg/kg の TCDD を曝露し、胎盤での CYP1A1 の誘導能を測定したところ、両系統間では差異はなかった（図 14）。以上のことから TCDD 曝露による胎盤機能不全および胎仔死亡の感受性は、AhR に由来するものではなく、AhR 以外の遺伝的要因によることが示された。

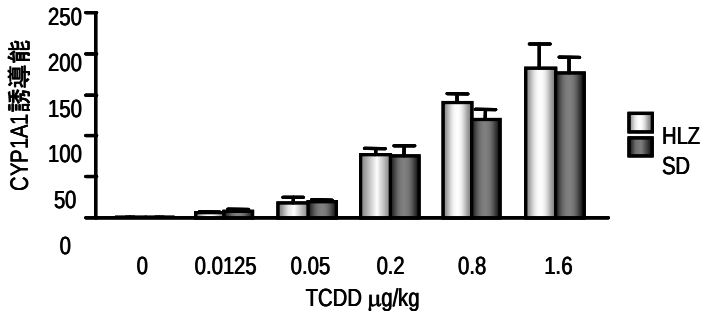


図 14.　HLZ と SD ラット間では、AhR の一次構造に差がないことをうけ、胎盤における CYP1A1 の誘導能を調べた。GD15 に TCDD を曝露し、GD20 に胎盤を回収した。リアルタイム RT-PCR 法により、CYP1A1 mRNA の発現量を測定した。両系統間では、用量依存的な CYP1A1 mRNA の誘導能に差は認められなかった。

（2）研究成果の今後期待される効果

本研究では、まず TCDD を曝露した妊娠ホルツマンラットを実験モデルとして、グルコース動態の変化ならびに胎盤の血管の成熟が阻害されることを含め、胎仔の死亡リスクを上昇させると考えられる胎盤機能不全が TCDD 曝露によりおきることを初めて明らかにした。特に、胎盤血管の成熟阻害は、胎仔死亡の主因となると考えられる。また TCDD 曝露群において胎盤の機能不全がおきていることは、仮に出生できたとしても、胎仔期に低酸素状態等の負荷をうけたことを意味する。TCDD 曝露個体では知能が低下するともいわれているが、胎仔期の大脳皮質の発達は低酸素状態に大きく影響をうけることも知られており、今後因果関係を調べることも重要と考えている。我々は、本研究の今後の展開として、胎盤の血管成熟阻害のメカニズム解明が重要になると考えている。これに対して既に、TCDD 曝露により胎盤細胞のアポトーシス機構が異常になることを見出しており、妊娠後期における胎盤血管の成熟阻害のメカニズムが今後明らかにされると期待している。TCDD 曝露による胎盤機能不全の現象は、糖尿病患者の胎盤でおきている現象と多くの観察項目において一致していることを明らかにしているため、我々の解明したことは、単に TCDD の毒性研究にとどまらず、産婦人科学上極めて重要な知見になると期待される。

また、独自に明らかにした胎盤機能不全の指標をもとに、ホルツマン（HLZ）ラットと SD ラットの系統差を利用した解析を行った結果、胎盤機能不全および胎仔の死亡には、著しい系統差が存在すること、さらに、この系統差が AhR 以外の他の要因に依存していることが明らかとなった。TCDD 毒性には、著しい種差や系統差が存在することがかねてより知られており、その原因は、AhR の一次構造に由来していると解釈されている。このことは C57BL/6 と DBA/2 マウスを用いた解析により、両系統では AhR の一次構造ひいては TCDD に対する結合親和性が異なり、C57BL/6 マウスの方が強い毒性を示したことによる。しかし、HLZ と SD ラットで観察される胎盤機能不全および胎仔死亡の著しい系統差は、AhR には全く関係のない新たな TCDD 毒性メカニズムが内在するモデルであることが判明した。今後、AhR 以外の TCDD 感受性決定遺伝子を同定する研究の重要性が、本研究により見出された。我々は現在、連鎖解析の手法を用いて、その原因遺伝子の探索を行っている。

3.2　脳機能・行動に及ぼす影響

ダイオキシンの健康影響問題の中でも、発達期の低用量曝露影響の問題、すなわち成体では影響がみられないような低用量曝露であっても発達期の個体には影響を及ぼすのではないかという問題が強く懸念される。特に脳機能は個体差が大きいために影響が顕在化しにくいと考えられ、脳の発達に対する影響は「内分泌かく乱物質」問題の重要なテーマの一つといえる。われわれは発達期のダイオキシン曝露が脳機能・行動に及ぼす影響について次の三つの影響パターンを想定し、ラット及びマウスを用いて検討した。すなわち発達期の性ホルモンかく乱作用による脳の性分化影響、そして性分化影響とは異なる神経毒性影響（神経系かく乱）による脳の発達障害、脳の発達に重要な役割をもつ甲状腺ホルモン系のかく乱作用である。この3点について、個体レベルでの影響すなわち脳機能・行動影響を検証すると同時に、分子生物学的、細胞生物学的、生化学的、解剖・組織学的手法を用い、そのメカニズムの解明を目指した。

3.2.1　脳における性決定機構及び性成熟へのダイオキシンの影響とそのメカニズム解析（曽根秀子）

(1)研究内容及び成果

1-1.TCDD 曝露による新生仔の脳における性ホルモン変化が性特異的発現酵素の誘導に及ぼす影響（石塚、曽根）

性成熟したラットの肝臓では cytochrome P450 (CYP) isoform CYP2C11 が雄に、5α-reductase が雌に特異的に発現している。これらの酵素の性特異的発現は生後の成長ホルモンの変動と関係があることが知られている。成長ホルモンの変動のパターンは新生仔期に雄と雌で異なり、性ホルモンの分泌の変動によって制御を受けていることが知られている。しかしながら、新生仔期における性ホルモン分泌の変動が肝臓の性特異的発現酵素の誘導に関わっているという直接的な証明はなされていない。そこで、今回、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) の経胎盤・経母乳曝露による肝臓の性特異的発現の影響と新生仔の脳における性ホルモンレベルを調べ、両者の関係を考察した。Holtzman 系ラット妊娠 15 日目に 0, 200 及び 800 ng/kg の用量で TCDD を投与した。生後 49 日目の雄産仔の肝臓では CYP2C11 タンパク質およびmRNA の発現量が対照に比較して有意に増加した（図 1)。しかし、 雌産仔の肝臓の 5α-reductase 活性については TCDD 曝露による変化は認められなかった（図 2)。出生時の性ホルモンレベルに着目してみると、生後 5 日の血清中のレベルは、雄においてのみ血清テストステロンの上昇傾向は認められるものの、雄雌ともに TCDD 曝露による有意な影響は認められなかった。精巣中のテストステロン量は有意に増加したが、卵巣中のエストロゲンレベルには変化は認められなかった（図 3)。精巣及び血清テストステロンレベルに関して、Haavisto ら（ 2001 ）は、Han/Wistar を用いて類似の結果を示している。さらに、彼らは、TCDD 曝露の精巣では、hCG によってテストステロン産成能が上昇すると報告しており、経胎盤・経母乳曝露された仔の脳では、テストステロンサージが変化している可能性があることを指摘している。本研究において、雄仔脳におけるテストステロン及びエストロゲンレベルが有意に増加した。しかし、雌脳においては性ホルモンの変化は認められなかった（図 4)。これらの結果は、雄の精巣及び脳におけるホルモンレベル

の発育初期の刷込み効果、すなわち新生仔の脳における性ホルモンレベルの変化が、成熟後における肝臓の性特異的発現酵素 CYP2C11 の誘導に影響することを示している。

低用量TCDDの経胎盤･経母乳曝露が脳の性分化に及ぼす影響は、本章3.2.1-2、3.2.2、3.2.3 でも示すように種差や系統差を伴い必ずしも一様ではない。しかし本項に示すHoltzman ラットにおける結果は、低用量 TCDD 曝露は発育初期の脳における性ホルモンレベルを変化させること、さらに成熟後における脳の雌雄差に影響を及ぼしうることを強く示唆するものである。

1-2　TCDD 曝露による新生仔の脳における AhR 応答遺伝子の発現に及ぼす影響（座波、鈴木、曽根）

C57BL/6 系アロマターゼ欠損マウスの妊娠 13 日目に TCDD を 10 μg/kg 投与して妊娠 19 日目及び生後 5 日目の脳におけるアロマターゼ（CYP19）、エストロゲン受容体（ER）及び AhR 応答遺伝子 CYP1A1 の変動を調べたところ、野生型の脳における CYP19 及び ER の発現には曝露による増加傾向は認められたもの、有意な変化は認められなかった。また、TCDD による CYP1A1 の発現も野生型マウスとアロマターゼ欠損マウスとの間に有意な違いが認められなかった。マウス脳においては、TCDD は、エストロゲン産生酵素に及ぼす影響が無いか有っても非常に小さいと考えられた。

上記と同様のプロトコールで Ahr(+/-)マウスを交配し、妊娠マウスに TCDD を投与して仔の脳における CYP1A1 の発現を調べた。その結果、仔動物の Ahr 遺伝子型に応じて CYP1A1 mRNA の発現量が異なること［ (+/+)型 ＞ (+/-)型 ＞ (-/-)型 ］が認められ、マウス脳においても、TCDD の経胎盤・経母乳曝露によって影響されることが明らかになった。

1-3　ER 応答遺伝子の探索（久寿米木、曽根）

上記の項で脳の性成熟に TCDD が影響することを個体レベルで確認できたため、さらに分子レベルでのメカニズムを明らかにするためには、性ホルモンと TCDD の相互作用を明らかにしなければならない。我々は以前にヒトの培養細胞株を用いた実験で TCDD によって誘導される CYP1A1 はエストロゲン受容体の有無によって影響されていることを証明した。そこで、エストロゲン受容体で発現制御を受ける遺伝子群を発見し、TCDD 曝露による影響を調べるために、染色体免疫沈降（chromatin immunoprecipitation）法を用いて anti-ER-αantibody と会合する遺伝子を探索した。組織よりも培養細胞株のほうが純度の高いゲノムライブラリーを調製できるため、材料にはヒト乳癌細胞 MCF 7 を用いた。その結果、知られている遺伝子で 34 種類の候補遺伝子を得ることができた（表 1）。34 個の遺伝子のプロモーター領域にはいずれも 3 個以上の ERE 配列が存在していた。確認のため、ER の発現の高いマウス子宮を用いて候補遺伝子の中の actRIIB 及び BMP7 の mRNAs を調べたところ、エストロゲンの曝露によってそれら遺伝子の発現が変動することが認められた。actRIIB は下垂体ホルモンの分泌変動によっても変化することが知られている。actRIIB は、卵巣のみならず、脳においても大脳皮質，海馬，小脳扁桃及び視床に存在することが証明されている。また、BMP7 は、視神経系の発生に関与していることが知られている。さらに 34 の候補遺伝子の中には、5HT-7 受容体、GABA 受容体 1b、グルタミン受容体サブユニットのひと

つ GRIN1 など神経伝達物質受容体の遺伝子も含まれ、エストロゲンの変動が中枢神経系に分子レベルで影響をおよぼす可能性が予測された。

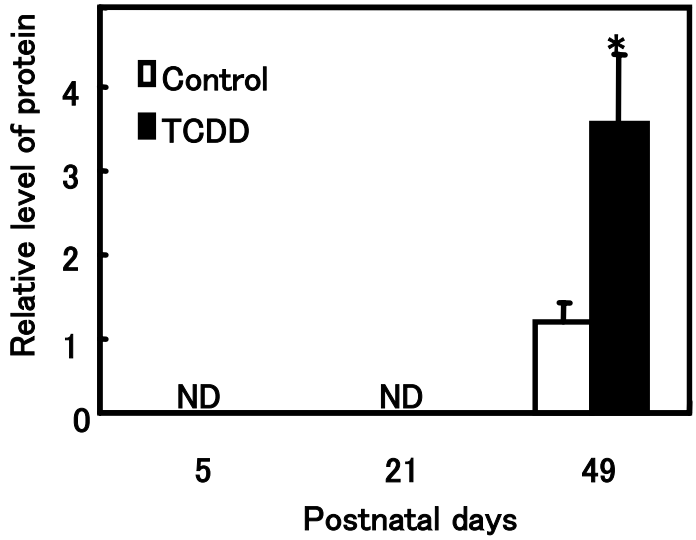


図 1. 雄ラット肝臓における CYP2C11 蛋白質 の誘導
グラフ上の値は、3 サンプルの平均 ± SD. オープンバー: 対照; 黒バー: 800 ng TCDD/kg. *: $p < 0.05$ 。

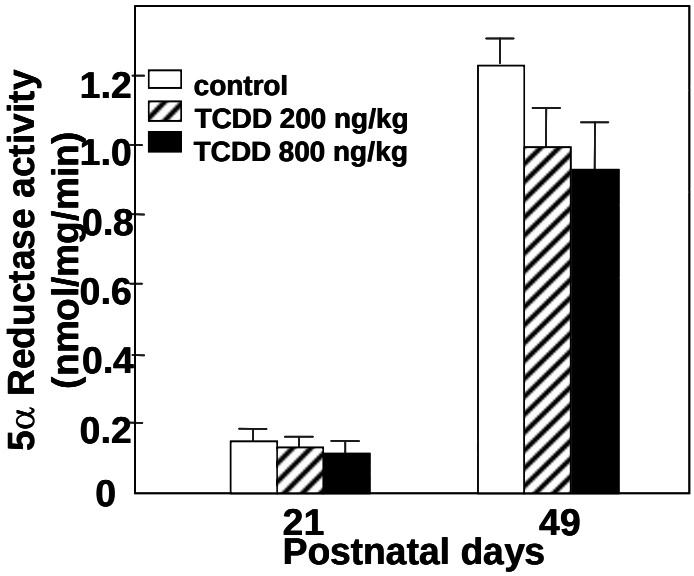


図 2. TCDD 曝露による雌ラット肝臓の 5α-reductase 活性.
3 サンプルの平均 ± SD. オープンバー: 対照; 黒バー: 200 及び 800 ng TCDD/kg。

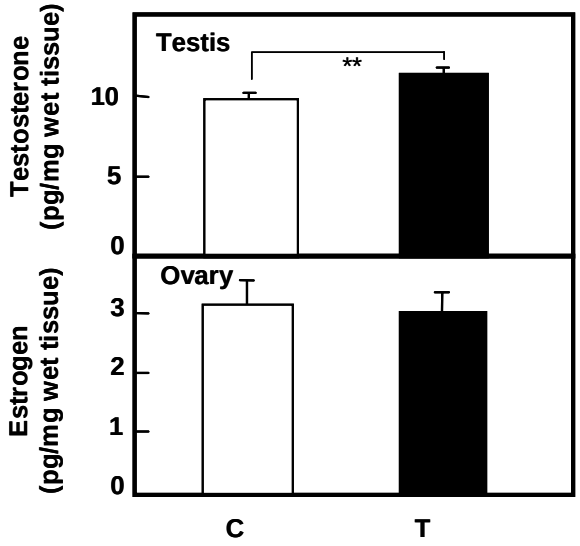


図 3. 生後 5 日目の生殖器における性ステロイドホルモンの変化.
上図：精巣、下図：卵巣 C: 対照, T: 800 ng TCDD/kg。値は3－5サンプルの平均 ± SD 。**: 対照からの有意差P ＜ 0.01.

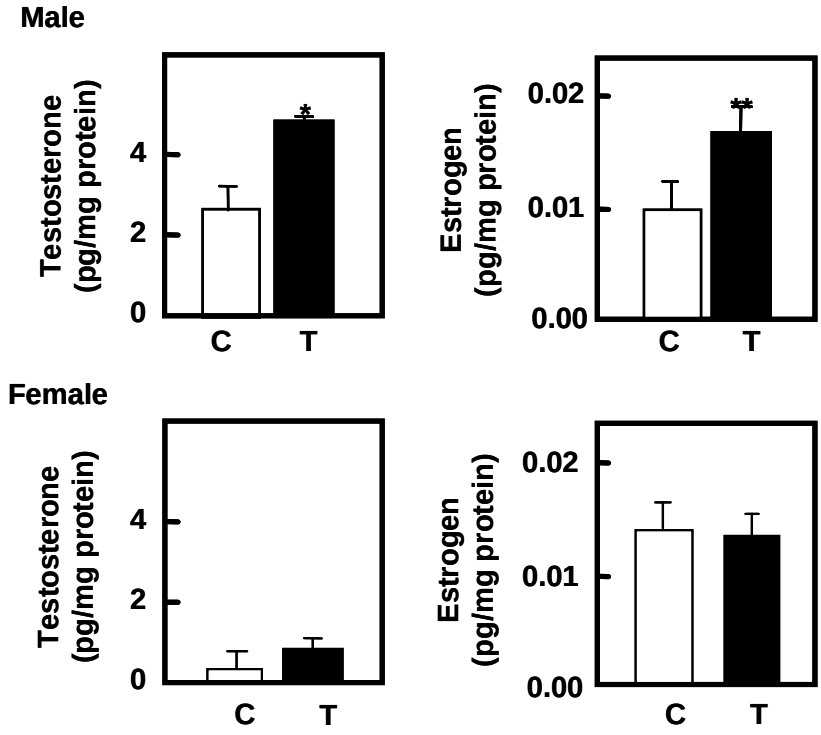


図 4. 生後 2 日目の脳における性ステロイドホルモンの変化.
上図：雄、下図：雌 C: 対照, T: 200 ng TCDD/kg. 値は 4－6 サンプルの平均 ± SD 。
*, **:対照からの有意差 P ＜ 0.05, P ＜ 0.01.

表 1. ChIP によって検出された ER 応答遺伝子候補

	Name	Accession number	Number of ERE-like sequences
1	5-hydroxytryptamine 7 receptor	U68488	4
2	8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) gene	AF521807	5
3	activin receptor IIB	NM_001106	10
4	BMP7	BC008584	5
5	ATPase, Ca++ transporting, ubiquitous (ATP2A3), transcript variant 3	NM_005173	11
6	cathepsin D	NM_001909	12
7	DLM1	NM_030776	7
8	elF-4C	BC000793, NM_001412	12
9	GABA receptor 1b	AF301005	8
10	gene similar to T-lymphoma invasion and metastasis inducing protein 1	AW003835	5
11	glutamine synthase	NM_002065	5
12	helicase-like protein, BRCA1-interacting protein 1 (BRIP1)	NM_032043	10
13	histone deacetylase complex protein 66	BC011684	4
14	JAK3	NM_000215	9
15	keratin 18	NM_000224	9
16	kinesin light chain, kinesin 2 (KNS2),	NM_005552	10
17	killer inhibitory receptor 2-2-1 (KIR221)	AF133901	5
18	mitogen-activated protein kinase 4 (c / ERK3)	NM_002747	6
19	neurexin	NM_004801	7
20	neutrophil oxidase factor (NCF2) gene	U00776, NM_000433	11
21	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 1 (GRIN1)	NM_000832	10
22	origin recognition complex subunit	U40152	7
23	phosphorylase kinase	XM_292194	13
24	pleiomorphic adenoma gene 1 (PLAG1)	NM_002655	3
25	paraneoplastic antigen (PNMA1)	AF320308	4
26	peroxisome proliferative activated receptor (PPAR), alpha	NM_005036	7
27	Ras-like GTPase	XM_208443	6
28	RPTP-RHO	AF043644	8
29	Semaphorin	BC029590	7
30	serine palmitoyl transferase subunit II	Y08686	4
31	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type substrate 1 (PTPNS1)	BC026692, NM_080792	4
32	soluble adenylyl cyclase	AF299350	7
33	translin-associated factor X (TSNAX)	NM_005999	8
34	ubiquitin-like protein	XM_293292, NT_078106.14	10

ERE-like sequences include a half of palindrome of the consensus ERE such as TGACC, TGAGC, TGACG, TGACA, GCTCA, GGTCA or AGTCA.

(2) 研究成果の今後期待される効果

上記の研究結果は、TCDD 曝露による新生仔期の脳における性ホルモンの変動が、その後の、脳の成熟後の雌雄差に影響を及ぼすことを示唆している。そのメカニズムは、マウスを用いた実験からは、エストロゲンの産生酵素の変化に起因するとは完全には説明できない。また、ラットにおいてもエストロゲンホルモンに対する感受性の系統差があるものと考えられ、今後、ヒトに近いモデル動物の選択及び作成が重要であると思われる。遺伝子探索研究からエストロゲン応答遺伝子は多数あり、AhR との相互作用を考慮すると多様なメカニズムの存在が考えられる。今後、TCDD 曝露による多数遺伝子

の網羅的な把握と変動パターンを解析することにより多様な変化を予測して対処すべきと考える。

3.2.2 新生仔の脳アロマターゼ活性と性成熟後の性行動に対する TCDD の影響（池田雅彦）

(1)研究内容及び成果

ラットにおける雄への脳の性分化は、妊娠 16 日頃から生後 5 日頃まで胎仔脳の視索前野に発現が誘導されるアロマターゼにより、精巣から分泌された Testosterone が Estradiol に変換され、Estradiol により雄の脳に性分化すると考えられている。雄の脳の性分化が正常に行われると、性成熟後に雄の行動をとるようになる。また雄の脳の性的二形核(SDN-POA)の神経核の体積が雌に比べ 3〜5 倍ほど大きいことが報告されている。一方雌では Testosterone の分泌が無いため、この時期脳内の Estradiol 量が少なく雌の脳に分化すると考えられている。本研究では胎仔期および授乳期のダイオキシン曝露が雄の脳の性分化に与える影響について検討した。

妊娠 15 日目の Hotzman ラットに、コーンオイルに溶解した TCDD (50, 100, 200, 400 ng/kg)を経口投与した。生まれた仔は生後 2 日（PND2）に産仔数、体重の測定を行い、一部エーテル麻酔下腹部大動脈より採血後、脳および生殖腺を摘出した。残りはそのまま飼育し、4 週齢で離乳した。雌については膣の開口を観察した。生後 12 週齢で甘味嗜好性を指標としたサッカリンテストを実施した。テスト終了後、ラットはエーテル麻酔下腹部大動脈から脱血後、心臓より生理食塩水で脳を灌流し摘出した。脳は 10%中性緩衝ホルマリン液で浸漬固定し、厚さ 30 μm の凍結連続切片を作製した。切片は Nissl 染色後、性的二形核の面積を測定し体積に換算した。

PND2 における産仔数、新生仔の体重に TCDD 曝露による有意な影響はいずれの曝露用量でも認められなかった。また雄において PND2 でも血清 Testosterone 濃度にも TCDD 曝露による有意な影響は認められなかった。一方雌では血清 Testosterone 濃度は TCDD 曝露により有意に低下した。また TCDD 200 ng/kg 曝露群で PND2 での脳アロマターゼ活性が雄で低下傾向を示し、対照群では雌に対する雄の活性性比が約 1.35 であったのが、TCDD 曝露により約 1.15 へと有意に低下した。

雌における膣の開口は対照群では約 35 日であったが、TCDD 50, 100, 200 ng/kg 曝露群では有意な影響は認められなかった。しかし 400 ng/kg 群では約 4.5 日有意に遅延した。また TCDD 400 ng/kg 曝露群では、生後 39 日頃から膣の形態異常（Thread）が認められた。雄の前立腺重量は、TCDD 曝露用量依存的に減少し、400 ng/kg 曝露群では対照群に比し有意に減少した。これらの影響は TCDD 曝露用量依存的に大きくなることが示唆された。

12 週齢において、体重には雌雄とも TCDD 曝露による有意な影響は認められなかった。サッカリンテストにおいて、0.25%サッカリン水の飲水量は雌に比し雄で有意に低値を示した。雄において 0.25%サッカリン水の飲水量は、TCDD 曝露により 100 ng/kg 曝露により増加傾向がみられ、200 ng/kg 曝露群では対照群に比し有意に増加した。しかし 400 ng/kg 群では飲水量は減少し対照群と同程度であった（図 5）。

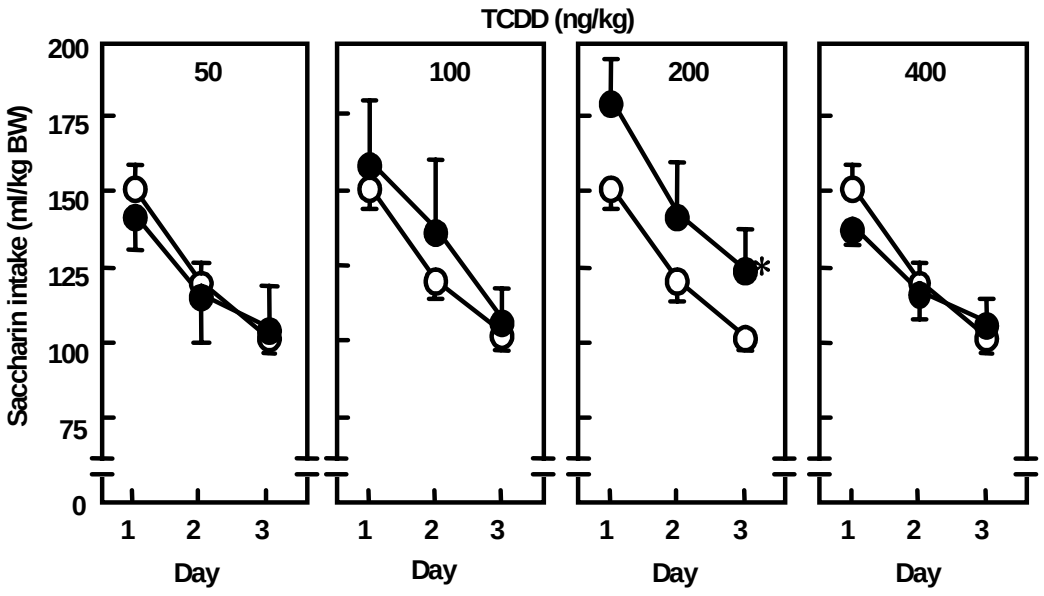


図5　雄ラットの甘味嗜好性に対するTCDDの経胎盤および経母乳曝露の影響
妊娠15日にTCDDを曝露したラットから生まれた仔を4週齢で離乳し、生後12週齢でサッカリンテストを行った。片方のボトルを0.25%サッカリン水に変えた後3日間の1日ごとの飲水量を測定した。○：対照, ●：TCDD曝露
各データは 9-14 匹の平均±標準誤差で示した。有意差（*P<0.05）検定は一元配置分散分析とBonferroni/Dunnのポストホックテストで行った。

雄においてSDN-POAの体積は、TCDD 50 ng/kg曝露群では変化はなかったが、100, 200 ng/kg曝露により用量依存的に有意に減少した。しかし400 ng群では減少は認められず、むしろ対照群より増大した（図 6）。雄においてSDN-POAは胎仔期、新生仔期に視索前野でアロマターゼによりTestosteroneから生成したEstradiolにより発達することが知られている。このことからこの時期でのEstradiolの生成量の低下、あるいはEstradiolの作用の抑制が考えられる。

以上のことから、TCDDの経胎盤・経母乳曝露により、雄の脳の性分化が障害されることが示唆された。またその影響のTCDD曝露用量依存性は生殖腺に対するものとは異なり、比較的低用量の極限られた用量でのみ影響が表れることが明らかとなった。

（2）研究成果の今後期待される効果

妊娠ラットにアルコールやニコチンを摂取させると、生まれた雄の甘味嗜好性が脱雄性化することが報告されている。また妊娠ラットにストレスを与えると同様に甘味嗜好性の脱雄性化がおこることが報告されている。これはストレスにより脳内カテコールアミンが上昇するが、カテコールアミンがin vitroでアロマターゼ活性を抑制することから、脳内エストラジオール量が減少して脳の性依存的行動障害が起きると考えられている。また妊娠ラットにPCBを含む餌を与えると、生まれた雄の甘味嗜好性が脱雄性化することが報告されている。

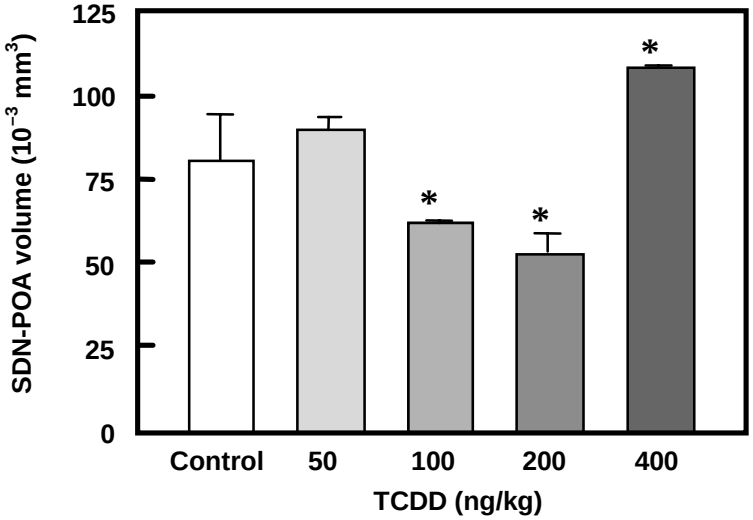


図6　雄ラット脳の性的二形核の体積に対するTCDDの経胎盤および経母乳曝露の影響
サッカリンテスト後のラットから脳を摘出し、凍結切片を作製した。ニッスル染色後、性的二形核の面積を算出し、体積に換算した。各カラムは3匹の平均±標準誤差で示した。有意差（*P<0.05)検定は一元配置分散分析とTukey-Kramer のポストホックテストで行った。

TCDDの雄の脳の性依存的行動に対する影響の用量－作用曲線は、単調増加ではなく、いわゆる逆U字曲線を示すことが明らかとなった。この結果はダイオキシンの脳機能-中枢への影響を考える上で、曝露用量が非常に重要であること、特に低用量での影響を注意する必要があることを示している。このことから個々の新生仔（胎仔）への　曝露量や各組織への分布を測定し、影響との関連を明らかにする必要がある。

また、雄の甘味嗜好性の脱雄性化に関する作用機構の1つとして、胎仔期、新生仔期において視床および視床下部におけるエストラジオール生成量の減少が考えられる。しかし、3.2.1の項で石塚らは、生後2日目の雄仔の全体の脳におけるテストステロン及びエストロゲンホルモン量の増加を示した。この相違点の説明のためには、新生仔期からのホルモン及びエストロゲン産生酵素群の経時変化､用量依存性や分布など詳細な検討が必要であろう。さらに近年、エストロゲン受容体（ER）とダイオキシン受容体（AhR）の相互作用が報告されている。雄のSDN-POAは、エストラジオールにより発達が制御されていると考えられているので､エストロゲン産生酵素及び代謝酵素の変化だけではなく､受容体どうしの相互作用による結果の可能性も考えられ、この点の検討が今後必要である。

3.2.3　ダイオキシン曝露が脳の性的発達に及ぼす影響（掛山正心）

（1）研究内容及び成果

ダイオキシン曝露が脳の性的発達に及ぼす影響について調べた。まず雄脳における発達のエンドポイントとして雄性行動に着目し2,3,7,8-tetrrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)の経胎盤・経母乳曝露が成熟後の雄仔ラットの性行動発現に及ぼす影響について調べた。妊娠15日目のLong-Evansラットに対して0または200、800 ng/kgのTCDDを単回経口投与し、雄仔動物の性行動について調べたところ、TCDD曝露によりマウント数、挿入数が有意に減少した（図7）。

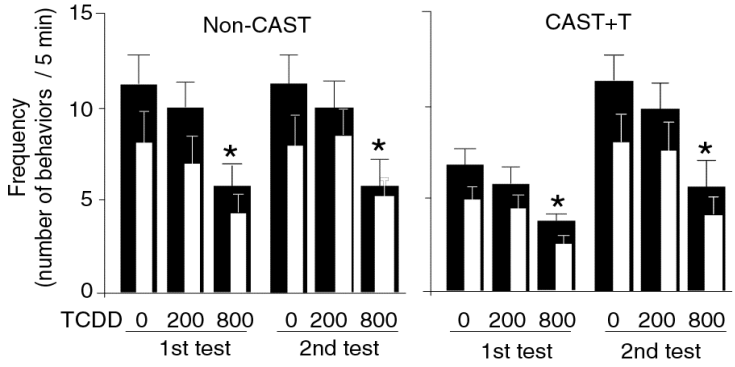


図7　発達期ダイオキシン曝露による雄性行動変化．単位時間当たりのマウント数（黒）とイントロミッション数（白）
*p<0.05

しかし行動潜時には影響がみられなかったことから、TCDD曝露の影響は、単純な性行動抑制というよりは、性行動を制御する神経ネットワークの発達障害である可能性さが示唆された。そこで交尾行動に伴って変動する遺伝子発現変化についてin situハイブリダイゼーション法を用いて検証したところ、性行動に伴い、対照群の視索前野ではc-fos mRNAが、前頭皮質ではBDNF mRNAの発現誘導が見られた（図8）。一方TCDD曝露により行動変化がみられた動物では、対照群と比べて視索前野c-fos mRNAの発現には変化が見られなかったが、前頭皮質のBDNF mRNA発現誘導が少なかった（図8、図9）。以上の結果から、発達期のTCDD曝露は前頭皮質の発達に影響を及ぼし、その結果として成熟後の性行動発現を変化させることが示唆された。

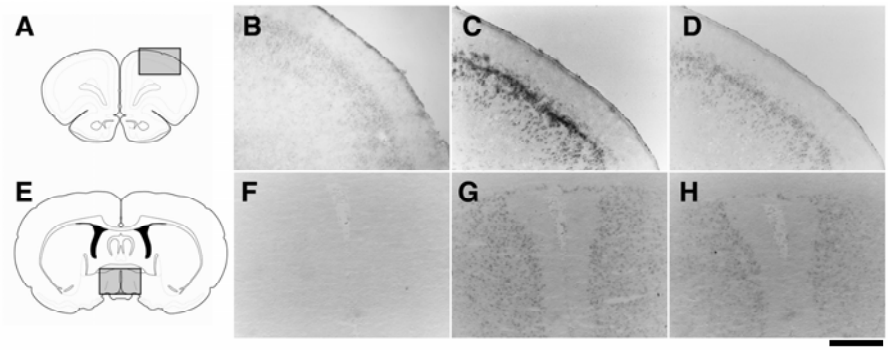


図8　性行動に伴う、前頭皮質BDNF mRNA、視索前野c-fos mRNAの発現変化Aの灰色部分はB-D（前頭皮質）の、Eの灰色部分はF-H（視索前野）の測定部位を示す。B, Fは性行動前の非曝露動物、C,Gは性行動1時間後の非曝露動物、D, Hは性行動1時間後の800 ng/kg TCDD曝露動物の例。Bar=500μm。

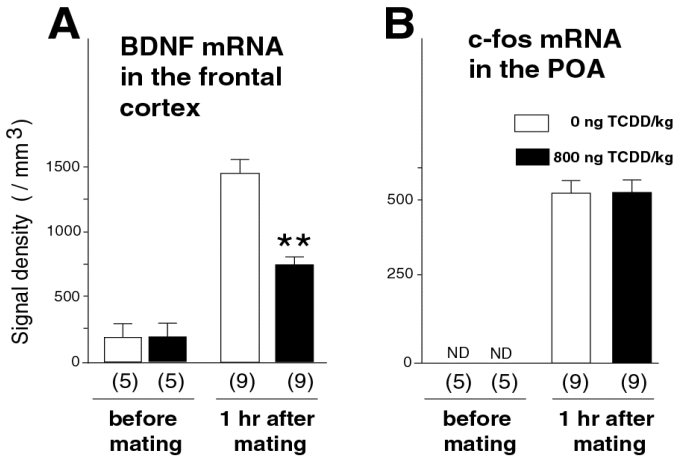


図9　性行動に伴う、前頭皮質BDNF mRNA 視索前野c-fos mRNA発現の組織学的半定量
**p<0.01

次に雌脳における発達のエンドポイントとして､排卵機能の獲得(性成熟)に着目し、TCDD 曝露の影響を調べた（曝露方法は性行動実験と同じ)。TCDD 曝露は、曝露用量依存的に膣開口、性周期発來、初発排卵の時期を早め、800 ng/kg の TCDD 曝露では、雌仔動物の膣開口が平均で約 6 日､初回発情期が約 7 日早くなっていた(図 10)。また、卵巣重量は、対照群では生後 25 日頃から急激な増加をみせるが、TCDD 曝露により重量増加の時期が早くなり､800 ng/kg 曝露群では生後 15 日以降から急激な卵巣重量増加が認められ、25 日齢には対照群の 35 日齢にあたる大きさに達していた。

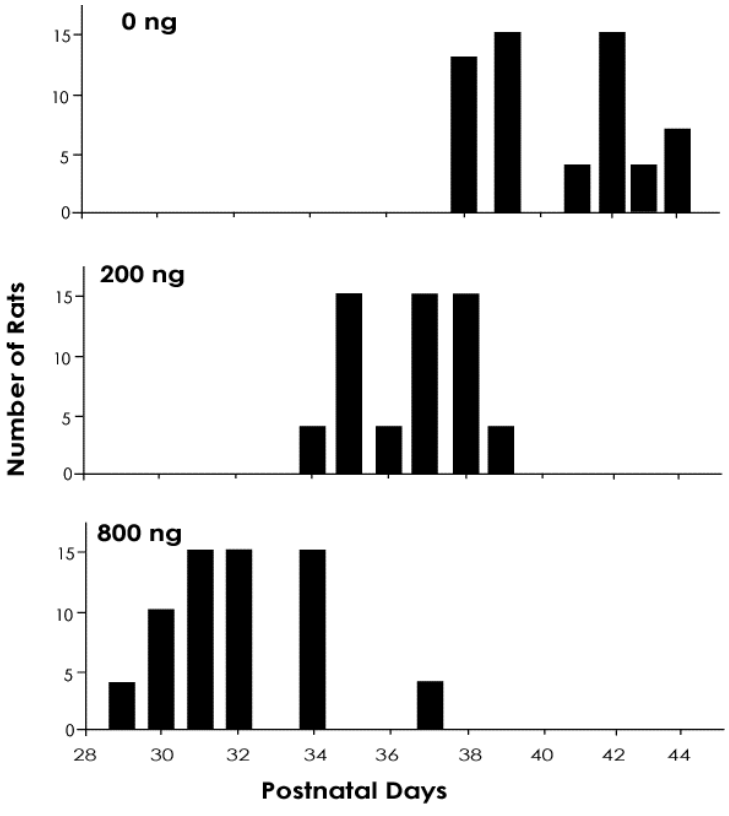


図10　初回発情期（First Estrus）の生起に対する胎仔期/授乳期期TCDD曝露の影響

横軸に生後日数、縦軸にはその日に発情期を初めて示した動物数を示した。グラフ
上から 0 ng、 200 ng 、800 ng TCDD/kg曝露群(n=59, 54 and 63)。

次に視床下部･下垂体系の性成熟の指標として発達時期における代償性卵巣肥大の生起について調べた。その結果、胎仔期/授乳期期の TCDD 曝露により、代償性卵巣肥大の生起時期も用量依存的に早くなっていることを確認した（図 11）。以上の結果から、TCDD 曝露による性成熟亢進は、卵巣の発達異常や末梢性のホルモン分泌異常による生殖器性の早熟化ではなく、視床下部の早熟化も含めた中枢性早熟化であることが示唆された。

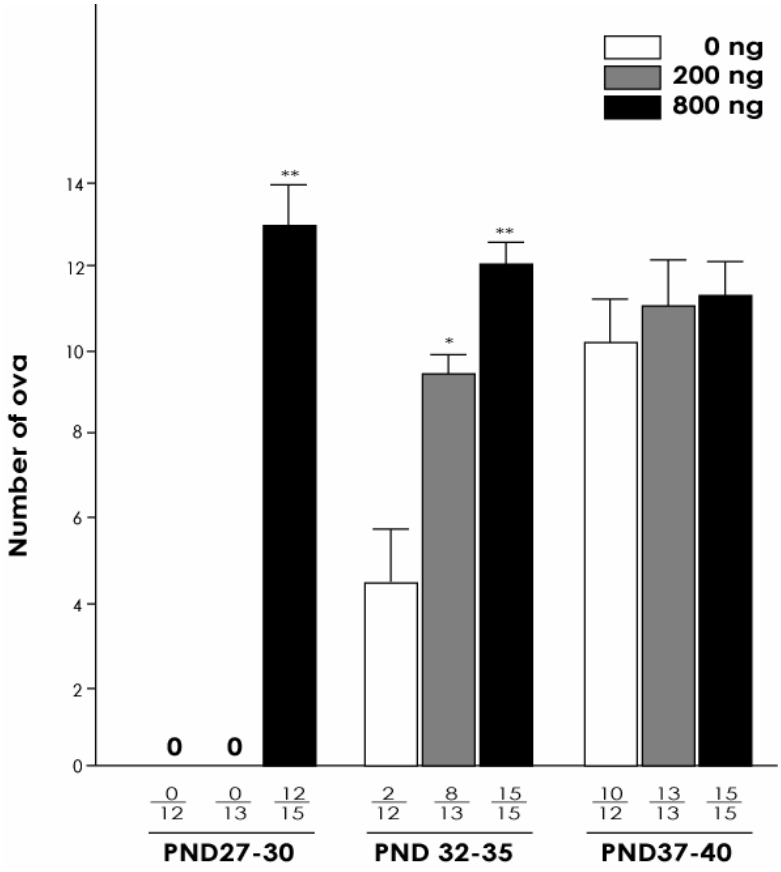


図 11. 発達期の代償性卵巣肥大に対する胎仔期/授乳期期 TCDD 曝露の影響
片側卵巣を摘出してから 7－10 日後（横軸）に排卵数を調べた。*p<0.005、**p<0.001。

これまで、比較的高濃度の TCDD(1μg/kg)曝露では膣形成に異常が生じ、膣開口も遅延することが報告されている。本研究チームでも、Holtzman ラットにおいて 400 ng/kg 曝露により膣開口が遅延する結果を得ている（3.2.2 参照）。しかし本実験の Long-Evans ラットでは、膣開口だけでなく初回発情、代償性卵巣肥大の生起時期も含めた雌性成熟のすべての指標に促進がみられた。本実験では膣の形態異常はまったく確認されなかったので、膣開口遅延影響は、系統差等により生じる可能性があるものと考えられる。また、たとえ膣開口遅延が見られる個体であっても、卵巣の発達や視床下部の発達は、早熟化を示すとも考えられる。すなわち、低用量ダイオキシン曝露が性成熟に及ぼす影響としては、中枢性早熟化であるといえよう。

（2）研究成果の今後期待される効果

本研究では、仔動物が成熟期に示す個体レベルでの表現系を指標として、曝露影響を解析した。胎仔期/授乳期期の TCDD 曝露により、雄仔動物では性行動発現に変化があらわれること、この行動変化は前頭皮質の刺激応答性反応が障害された結果生じるものであることを示した。一方雌仔動物では性成熟の促進が見られ、それは中枢性の早熟化であり、すなわち TCDD が脳の発達に影響を及ぼす結果現れるものであることを示した。

研究を開始するにあたり、ダイオキシンはステロイド様作用あるいは抗ステロイド作用により脳の性分化に影響を及ぼすことを想定し、また国内・国外でもこの仮説が主流を占めていた。しかし本研究の Long-Evans ラットにおける結果は、ダイオキシンは性ホルモン系を撹乱した結果として脳機能に影響を及ぼすとは別に、それとは異なる機序で脳の発達に影響を及ぼし、脳の発達を障害するであろうことを示している。脳機能は個体差も大きく、化学物質曝露の影響も顕在化しにくいことが推測される。本研究で得られた個体レベルでの影響指標と、ダイオキシン毒性の分子基盤とを対応づけ、その毒性メカニズムを明らかにすることがダイオキシンの健康影響を評価するための重要な課題である。

3.2.4. 甲状腺ホルモン代謝への影響およびそのメカニズムの解明（西村典子）

（1）研究内容及び成果

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin（TCDD）はダイオキシン類の中でも最も毒性が強く、発ガン性、生殖毒性、免疫抑制などさまざまな生体影響を及ぼす化学物質であることが知られている。特に周産期における曝露は、器官や機能の形成される時期だけにその毒性影響は不可逆的な形態異常をもたらす可能性が高い。なかでも甲状腺は機能的にも形態的にもダイオキシン毒性に敏感な器官であり、胎児期から乳児期における甲状腺ホルモンレベルの低下は子の発育及び脳の発達に影響を及ぼす。また胎児期は TCDD 毒性に対する感受性も高い時期でもある。そのため、妊娠時にダイオキシンに曝露した場合、次世代に影響するか否か、また影響するとすればどの程度の曝露量でその毒性がどのように発現するかを明らかにする必要がある。本研究はダイオキシンの標的器官である甲状腺に焦点を当て、胎児期および授乳期に TCDD に曝露した場合の、甲状腺機能への影響とその毒性メカニズム、またその最低毒性量を明らかにすることで、ダイオキシンの生体影響へのリスク評価を行うことを目的としたものである。

ダイオキシンの毒性は動物種のみならず、系統によっても感受性が大きく異なることが知られている。先に我々の研究グループは、系統が異なるラットを用いてダイオキシン誘導性タンパク質 Cytochrome P4501A1(CYP1A1) 遺伝子誘導能を調べたところ、Holtzman ラットが、ダイオキシン毒性に感受性が高いことが分かった。このため Holtzman ラットを本実験に用いることにした。

投与量及び投与方法は、妊娠 15 日目の Holtzman ラット（10 週齢、各群 5 匹）に、コーンオイルに溶かした 2 段階濃度の 2,3,7,8,tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin（TCDD）（200、800 ng/kg body weight）を胃内に一回投与した。コーンオイルのみを同量投与したラットを対照群とした。生後 21 日目および 49 日目、エーテル麻酔下で、血液と甲状腺、下垂体および肝臓の組織を採取し、分析材料とした。

血清、脂肪組織および肝臓の TCDD の濃度を高分解 GC-MS 法で分析した。 血清中甲状腺ホルモンの Thyroxine（T4）と Triidothyronine（T3）の測定はラジオイッムノアッセイ（RIA）キットを用いて測定した。血清中甲状腺刺激ホルモン（Thyroid-stimulating hormone: TSH）濃度は ELISA 法で測定した。肝臓中 UDP-glucuronosyltransferase-1（UGT1）および Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) 遺伝子発現の解析を行った。TCDD は AhR (arylhydrocarbon receptor あるいはダイオキシンレセプターとも呼ばれる）を介して CYP1A1 の合成を誘導する。CYP1A1 は肝臓中で有機塩素化合物曝露により合成誘導され薬物代謝に重要な役割を演じている。肝 UGT1 は TCDD による AhR を介して肝臓で合成誘導される。血中 UGT1 は T4 とグルクロン酸胞合し、T4 の胆汁への排泄を促進する結果として血中 T4 レベルの低下をおこす。そこで TCDD の影響を調べるために肝臓中の RNA 分画を分離して、UGT1 および CYP1A1 の遺伝子発現を Reverse-transcriptase-polymerase chain reaction（RT-PCR）法を用いて検討した。T4、PCNA および TSH の免疫組織染色および病理組織学的検査を行うために、下垂体、甲状腺、肝臓の各組織を固定後、常法によりパラフィン包埋した。T4、Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)および TSH の抗体を用いて甲状腺および下垂体の免疫染色を行い、甲状腺ホルモンの局在性の変化および甲状腺濾胞細胞の増殖を調べた。また、甲状腺組織切片を Hematoxylin and Eosin (H-E)染色を行い、病理・組織学的変化を比較検討した。

TCDD による産仔数、性差および仔の体重への影響について、産仔数は対照群に比べて 800 ng TCDD/kg 投与群で有意に減少した。仔の性差および出生 2 日目の体重は TCDD 投与による影響は認められなかった（表 2）。

表 2. 妊娠ラットの TCDD 曝露による産仔数と仔の出生時体重への影響

Dose of TCDD	Litter size		Pup birth weight (g)		
(ng/kg b.w.)	Total	Male	Female	Male	Female
0	11.0 ± 1.7	4.6 ± 2.1	6.4 ± 2.3	9.3 ± 1.5	9.1 ± 1.1
200	11.8 ± 1.9	7.3 ± 3.2	4.5 ± 3.1	8.7 ± 0.9	8.1 ± 1.0
800	4.3 ± 0.5*	2.0 ± 0	2.3 ± 0.6	8.7 ± 1.2	8.2 ± 1.2

値は平均値 ± 標準偏差 （n = 5 rats）
（$p < 0.01$）

組織中 TCDD 濃度を測定すると、仔ラットの血清、肝臓、脂肪組織に比較的高濃度の TCDD の蓄積が認められた。組織中 TCDD 濃度は投与量に依存しており、21 日齢では肝臓中に最も多くの TCDD が検出されたのに対し、TCDD 投与後 49 日齢ラットでは肝臓中の TCDD 濃度は 21 日齢の 1/50 に激減していた(図 12)。

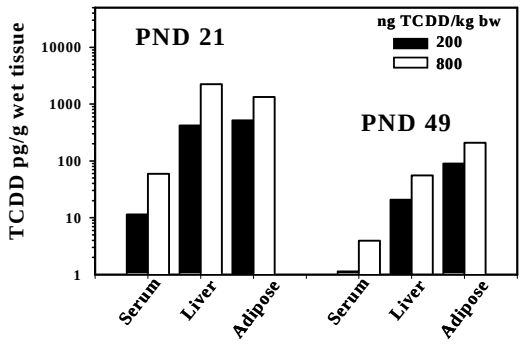


図 12　生後 21 日および 49 日の出生仔臓器中の TCDD 濃度

肝臓のミクロソーム酵素の UGT1 は甲状腺ホルモンの分解に深く関与している。つまり T4 はグルクロン酸抱合により、胆汁中に排泄される。今回妊娠 15 日目ラットに TCDD の一回経口投与を行い、生後 21 齢および 49 日齢の仔ラットの肝における CYP1A1 および UGT1 遺伝子の発現量に及ぼす TCDD の影響を RT-PCR 法により判定量的に調べた。21 日齢の雌雄ラットの肝で CYP1A1 および UGT1 遺伝子の有意な発現誘導が 200 ng/kg 投与群から認められ、その効果は TCDD 投与量に依存していた。生後 49 日では TCDD による CYP1A1 遺伝子の有意な誘導が認められたが、UGT1 遺伝子は対照群のレベルであった（図 13)。このことから、妊娠ラットへの TCDD 一回経口投与が、T4 のグルクロン酸抱合による胆汁中への排泄を亢進することを示唆した。本実験の TCDD 分析結果によると肝 1g 当たりの TCDD 量は 21 日齢仔ラットで最も高い値を示し離乳後の 49 日齢ラットではその量の 1/50 に低下していた。49 日齢ラットで UGT1 遺伝子誘導への影響が見られなかったことは、肝の TCDD 量が激減したことによるものと考えられた。

TCDD による甲状腺ホルモンへの影響を調べると、200 ng TCDD/kg 投与群の雄、および 800 ng TCDD/kg　投与群の雌雄仔ラットにおいて対照群と比較して 21 日齢仔ラットの血清 T4 値は有意に低下した。しかしながら 49 日齢仔ラットでは 800 ng TCDD/kg 投与群の雄ラットで有意な上昇が認められ、その他は対照群のレベルに回復していた。血清 T3 値は 800 ng TCDD/kg 投与群の雌ラットにのみ対照群と比べて有意な上昇が認められたが、その他は対照群のレベルに回復していた (図 14A, B)。TSH は 21 日齢および 49 日齢雌雄ラット共に 800 ng TCDD/kg 投与群で対照群の約 2 倍に上昇した (図 14C)。

甲状腺における T4 の免疫染色では、800 ng TCDD/kg 投与群で対照群に比べて、濾胞内に T4 の比較的強い染色性が認められた（図 15)。このことから TCDD は T4 の合成を促進することが明らかとなった。血清 T4 濃度は脳下垂体レベルにおけるネガティブフィードバック機構により TSH により調節されている。下垂体における TSH 分泌への TCDD の影響を調べるために免疫染色を行った（図 16)。その結果、対照群および TCDD

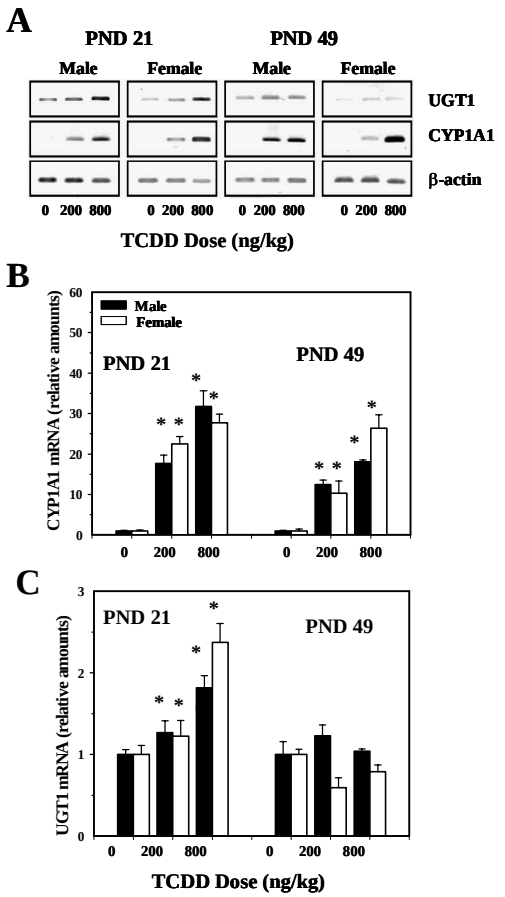


図 13　妊娠中および授乳中の低用量 TCDD 曝露が仔ラット肝ミクロゾーム酵素遺伝子発現に与える影響
(A)　UGT1 および CYP1A1 の RT-PCR 産 物
(B)　21 日齢および 49 日齢における CYP1A1 mRNA の発現量
(C)　21 日齢および 49 日齢における UGT1 mRNA の発現量

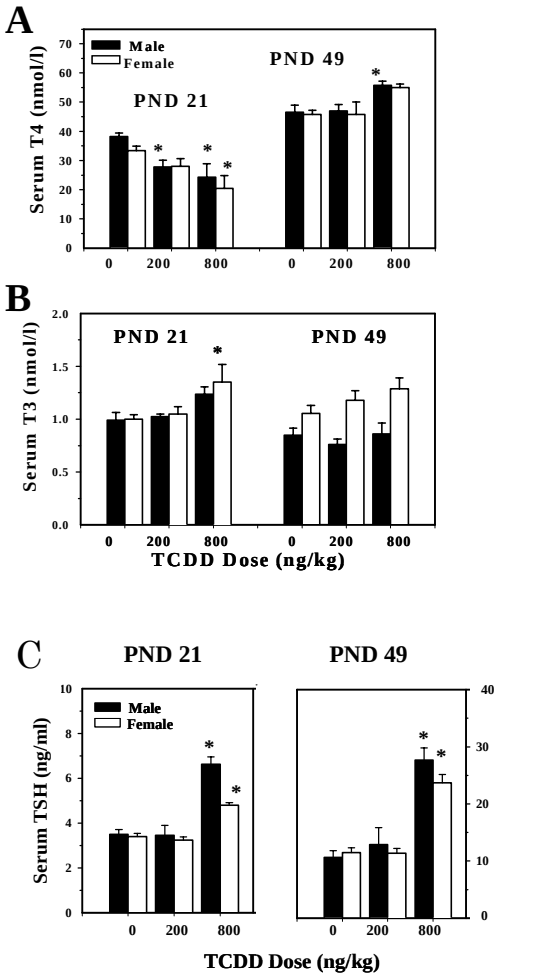


図 14　妊娠中および授乳中の低用量 TCDD 曝露が仔ラット甲状腺ホルモンに及ぼす影響
(A)　21 日齢および 49 日齢における血清 T4 濃度
(B)　21 日齢および 49 日齢における血清 T3 濃度
(C)　21 日齢および 49 日齢における血清 TSH 濃度

投与群で21日齢および49日齢仔ラットの下垂体前葉TSH細胞の細胞質にTSH陽性反応が認められた。しかしながらTCDD投与群ではTSH陽性細胞の細胞数の増加および染色性の増強が認められた。

妊娠ラットに TCDD を曝露すると仔ラットは主として母乳を介して TCDD に曝露される。今回行った実験結果から 21 日齢ラットで T4 の低下が見られ、49 日齢では T4 の低下が見られないにもかかわらず、組織学的に甲状腺過形成が認められた。このことから、妊娠時の TCDD 一回曝露 (800 ng/kg) が仔の甲状腺機能に不可逆的な影響を与えることが明らかとなった。21 日齢では、図 2 に示したように肝 UGT1 mRNA が TCDD により有意に誘導されたことから、UGT1 による T4 のグルクロン酸抱合が促進され、胆汁への排泄が亢進することにより血中 T4 濃度が低下すると考えられた。一方、TCDD により T3 濃度が低下しなかった事実に対しては、T3 の主要な排泄経路がグルクロン酸抱合では無く、硫酸抱合により行われるためであると説明づけられるかも知れない。生

後 49 日目において T4 の低下が見られなかった理由に対し我々は次の 2 つの可能性がほぼ同時に発生したものと考えている。第 1 に、先に生じた血清 T4 レベルの低下により、ネガティブフィードバック機構により下垂体前葉の TSH の分泌が促進され、T4 分泌も上昇したこと。このことは免疫組織学的所見により確認されている（図 15,16）。第二の可能性としては、肝の TCDD 蓄積量が激減したために(21 日目の 1/50 量)、UGT1 合成が低下した結果、T4 の排泄が減少したことである。

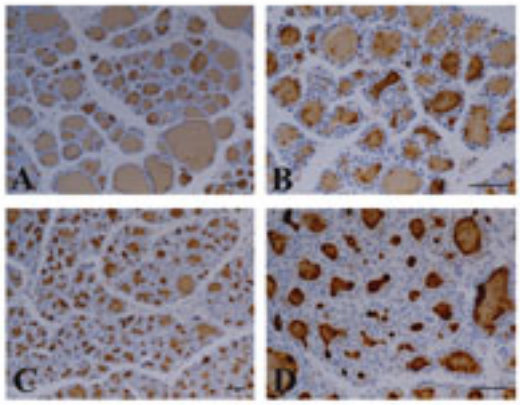


図 15　妊娠中および授乳中に低用量 TCDD に曝露した仔ラット甲状腺組織内 T4 の局在
(A、B) 対照ラット甲状腺
(C、D) 800 ng TCDD/kg 投与群ラット甲状腺
Bar = 50 μm

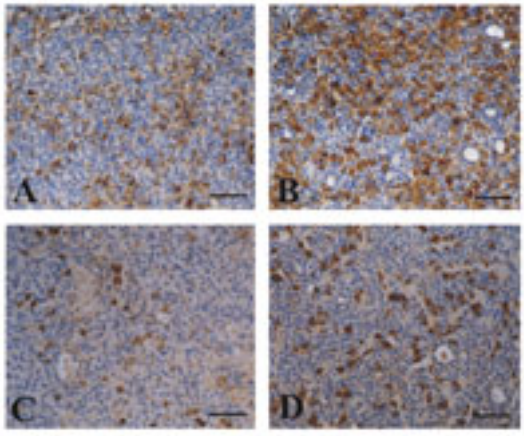


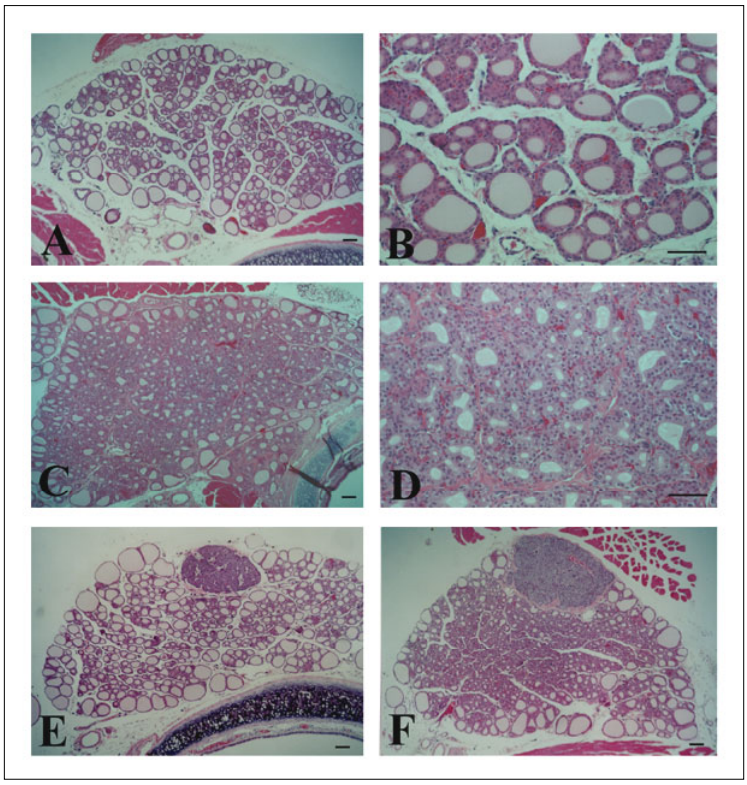
図 16　妊娠中および授乳中に低用量 TCDD に曝露した仔ラット脳下垂体組織内 TSH の局在
(A)　対照ラット脳下垂体(21 日齢）、
(B)　800 ng TCDD/kg 投与ラット脳下垂体（21 日齢）
(C)　対照ラット脳下垂体(49 日齢）、
(D)　800 ng TCDD/kg 投与ラット脳下垂体（49 日齢）

妊娠 15 日目に TCDD を曝露した場合、800 ng TCDD/kg 投与群の 49 日齢仔ラットで甲状腺過形成が認められた。甲状腺は全体的にコロイドの乏しい小型の濾胞となり、上皮は立方ないし円柱状を呈し、核もやや大きくなっていた。濾胞上皮の局所的な乳頭状の増殖がみられ、濾胞の形がやや不規則になっていた。さらに小葉間結合組織の繊維化がみとめられた（図 17A、B、C and D）。

しかしながら、49 日齢の雌ラットではコロイドに乏しい小型の濾胞が多数認められたが、雄ラットで見られたようなよく発達した甲状腺過形成の像は認められなかった（図 17E、F）。　Parenchymal area 対 Luminal area の割合を画像解析により計算すると 800 ng TCDD/kg bw 投与群で雌雄ラットともに有意な増加が認められた（図 17 G）。さらに興味深い事に 800 ng TCDD/kg bw 投与群では雌雄ラットで性差が認められ、雌ラットよりも雄ラットの方が TCDD に対する感受性が高いことが明らかとなった。

ヘマトキシリン・エオジン染色で甲状腺濾胞細胞の増殖像が観察されたので、PCNA 抗体をもちいて、増殖期の細胞の免疫染色を行った。対照群においても PCNA 陽性細

胞が認められたが、TCDD 投与群では PCNA 陽性細胞数が増加していたことから、TCDD は甲状腺濾胞細胞の顕著な増殖効果を持つことが明らかとなった（図 18 A,B）。



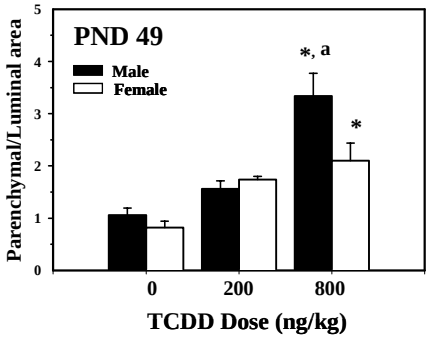
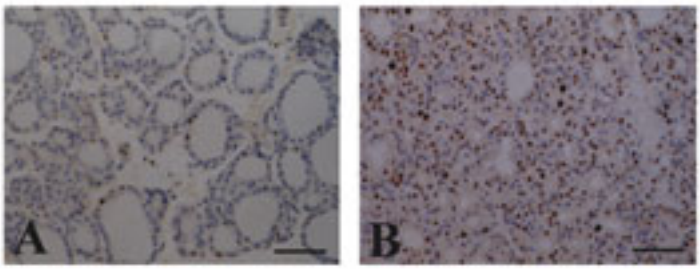


図 17　妊娠中および授乳中に低用量 TCDD に曝露した仔ラット甲状腺組織（HE 染色）
(A and B) 対照群 49 日齢雄ラット甲状腺
(C and D) 800 ng TCDD/kg 投与 49 日齢



C

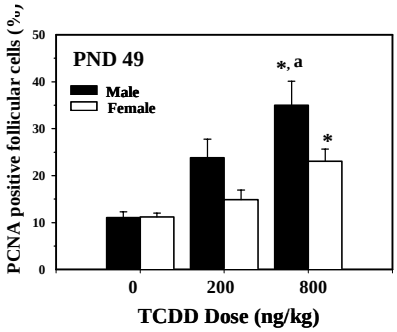


図 18　妊娠中および授乳中に低用量 TCDD 曝露に曝露した仔ラット甲状腺の PCNA 染色
(A)　49 日齢対照雄ラット甲状腺の PCNA 陽性細胞
(B)　49 日齢 TCDD 投与{800 ng/kg}雄ラット甲状腺の PCNA 陽性細胞
(C)　全細胞数に対する PCNA 陽性細胞数の割合（%）
Bar = 50 μm

（2）研究成果の今後期待される効果

妊娠期における低濃度TCDD単回投与が新生仔ラットの血清T4レベルの低下および血清TSHの上昇を引き起こし、その後に甲状腺過形成を起こすことが明らかとなった。このことは肝に蓄積されたTCDDによる肝UGT-1の誘導とそれによるT4の排泄促進によるものと考えられた。

T4は胎盤を通過するので、母体の甲状腺機能低下症は仔の成長と発育に影響を及ぼすといわれている。甲状腺ホルモンの作用を最も強く受ける中枢神経部位は大脳皮質と大脳基底核である。従って発育過程における甲状腺ホルモンの欠乏は、仔の発育遅延、運動の硬直を引き起こす。胎児期の脳の甲状腺ホルモンはT3ではなくT4に由来するので、脳の発生過程におけるT4の減少は脳の障害を引き起こすと考えられる。このように、ダイオキシン類は甲状腺ホルモンの代謝への影響を介して中枢神経系の発達へ影響を及ぼす可能性があると考えられる。

3.2.5. ダイオキシンの脳の発達過程における毒性発現機構（前田秀一郎）

（1）研究内容及び成果

ダイオキシンの脳の発達や高次機能への影響とその毒性発現機構を実験動物(マウス、ラット)を用いて解析する。このため先ず、TCCD を妊娠マウスに投与し、体内の胎仔脳のmRNAの量や種類を、非投与妊娠マウス体内のそれらとmRNAデイファレンシャルデイスプレイ（DD）法で比較解析し、差異のあるcDNAクローンを単離、同定する。そして、この遺伝子を手がかりに、TCDDの胎仔脳の発達への影響を分子レベルで明らかにする。さらに、TCDDは脳の高次機能に影響を与える可能性が示唆されており、特に周産期に曝露を受けた胎児の成長後の学習､行動への影響が懸念されている。そこで、TCDD の経胎盤・経母乳曝露が仔ラットの成熟後の記憶、学習へ及ぼす影響を、contextual fear conditioning test を用いて検討し、脳の高次機能への影響を解析した。

体重当たり5μg/kgのTCDDを妊娠12.5日目のC57BL/6Nマウスに単回経口投与し、6日後の胎仔脳の mRNA の量や種類を、等量のコーンオイルを投与した（TCDD 非投与）対照妊娠マウス体内の胎生18.5日目の胎仔脳のそれらと DD 法で比較解析し、差異のある cDNA クローンを単離するため、TCDD 投与及び非投与妊娠マウス体内の胎生18.5日目の雌胎仔､それぞれ2匹の脳を混合して抽出したRNA標本を2種類ずつ作成し、9種類の下流プライマーと24種類の上流プライマーを用い、計216種類のPCR反応で比較解析した。次に、TCDD 曝露及び非曝露の胎生 18.5 日目の雌胎仔、生後 5日目及び21日目の雌マウス各2匹の脳から抽出したRNA中の種々のmRNA量を、ノーザンブロッテイング法やReal-time RT-PCR法で解析した。さらに、TCDD曝露及び非曝露の胎生18.5日目の胎仔脳中のglycogen synthase-3βの量とリン酸化レベルをウェスタンブロッテイング法で、β-catenin の細胞内分布を免疫組織化学的手法で、secreted frizzled-related protein 2(SFRP2) mRNAの局在を*in situ*ハイブリダイゼーション法で比較解析した（図19）。

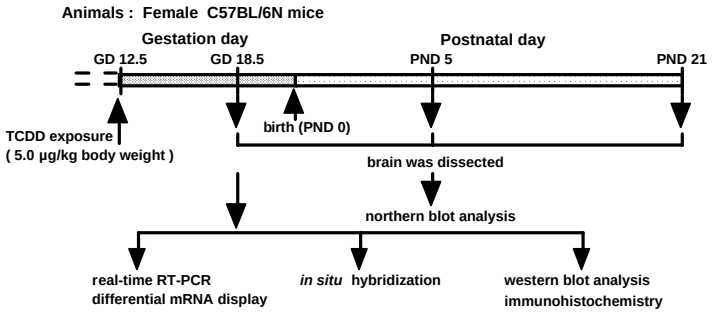


図 19　実験計画（1）
体重当たり 5μg/kg の TCDD を妊娠 12.5 日目の C57BL/6N マウスに単回経口投与し、胎生 18.5 日目の胎仔脳および TCDD 非曝露対照胎仔脳の遺伝子発現の差異を、DD 法で比較解析した。次に、TCDD 曝露及び非曝露の胎生 18.5 日目の雌胎仔、生後 5 日目及び 21 日目の雌マウス各 2 匹の脳から抽出した RNA 中の種々の mRNA 量を、ノーザンブロッテイング法や Real-time RT-PCR 法で解析した。さらに、TCDD 曝露及び非曝露の胎生 18.5 日目の胎仔脳中の glycogen synthase-3βの量とリン酸化レベルをウェスタンブロッテイング法で、β-catenin の細胞内分布を免疫組織化学的手法で、secreted frizzled-related protein 2(SFRP2) mRNA の局在を in situ ハイブリダイゼーション法で比較解析した。

TCDD 曝露及び非曝露の胎生 18.5 日目の胎仔脳 RNA 中の CYP1A1 mRNA 量を、Real-time RT-PCR 法で調べたところ、TCDD 投与によって約 30 倍に誘導されていた。この事から、妊娠マウスに投与した TCDD が胎仔脳の遺伝子発現を変化させることが確認された。

DD 法による解析の結果、TCDD 曝露群（図 20; T）と対照群（図 20; C）で濃さに差異を認めた数種の cDNA バンド（図 20）をクローン化し、これをプローブにノーザンブロッテイング法で差異を確認したところ、TCDD 投与により約 2 倍に mRNA 量が増加する 480 bp の cDNA クローンを見出した。この cDNA は、約 2.3 kb 大の mRNA に対応し、その塩基配列は、Wnt シグナル伝達系の調節に関与する SFRP2 に完全に一致した。そこで、SFRP2 mRNA 量の変化をマウスの発生、成長の段階を追って、経時的にノーザンブロッテイング法で調べた。このため、先ず TCDD 曝露及び対照非曝露の胎生 18.5 日目（図 22A; GD 18.5）の雌胎仔、生後 5 日目（図 21A; PND 5）及び 21 日目（図 21A; PND 21）の雌仔マウスそれぞれ 2 匹ずつ（TCDD 曝露、図 21A; T1&T2、対照非曝露、図 21A; C1&C2）の脳から抽出した全 RNA を混合した標本、ならびに異なる TCDD 投与及び非投与妊娠マウス由来の雌仔マウスからも同様に各 2 匹ずつの脳から抽出した RNA を混合した標本を作成した。そしてこれら、各日齢あたり合計 4 匹ずつの TCDD 曝露及び対照非曝露雌仔マウスから作成した 2 種の RNA 標本中の SFRP2 mRNA 量をノーザンブロッテイング法で比較解析した。この結果、SFRP2 mRNA 量は、胎生 18.5 日目では、TCDD 投与により 2.3 倍に、また生後 5 日目では、1.4 倍に増加することを見出した。生後 21 日目では、TCDD 曝露仔マウス脳にのみ、SFRP2 mRNA を認めた（図 21A）。さらに、SFRP には 5 種類あることが報告されているので、胎生 18.5 日目の胎仔脳について、他の SFRP mRNA 量も調べたところ、SFRP1 と 3 mRNA 量が曝露群において非曝露群に比べ、約 2.5 倍に増加していた。

上記のように SFRP2 mRNA は、Wnt シグナル伝達系の調節に関与する。そこで、Wnt シグナル伝達系の標的遺伝子の 1 つ、*c-myc* の発現変化をノーザンブロッテイング法で

調べたところ、c-MYC mRNA 量が SFRP2 mRNA と同様に、非曝露群に比べ曝露群において増加していた。また、その増加程度と経時的変化も SFRP2 mRNA と類似していた（図 21B)。

上記研究結果は、TCDD が Wnt シグナル伝達系を介して、脳の発生分化に重大な影響を及ぼし、その毒性を発現している可能性を示唆している。そこで、胎生 18.5 日目の TCDD 曝露群と非曝露群のそれぞれ雄胎仔 2～4 匹と雌胎仔 2～4 匹ずつの脳を用いて、TCDD が Wnt シグナル伝達系に及ぼす影響について解析した。これらの試料では CYP1A1 mRNA 量の TCDD による誘導は約 8 倍であった。先ず、Wnt シグナル伝達系の標的遺伝子、connexin-43 と c-jun の mRNA 量を、ノーザンブロッテイング法で比較したが両群間で差異はなかった。また、Wnt シグナル伝達系関連タンパク質、Wnt-1、-4、-7B の mRNA 量にも差異を認めなかった。また、β-catenin の mRNA 量にも Real-time RT-PCR 法で差異を認めなかった。さらに、glycogen synthase-3β のタンパク質量及びリン酸化レベルの変化を、ウェスタンブロッテイング法により解析したが、曝露群と非曝露群の間に差異を認めなかった。一方、Wnt シグナル伝達系の発現促進には、β-catenin の核内への移行が必須であるので、現在、β-catenin タンパク質の細胞内分布を免疫組織化学的に調べている。以上の結果は、全て胎生 18.5 日目の胎仔脳を用いて得たもので、今後、Wnt シグナル伝達系の種々の遺伝子発現の、TCDD 曝露による変化を、胎生のより早い時期より経時的に解析する必要があると考えられる。

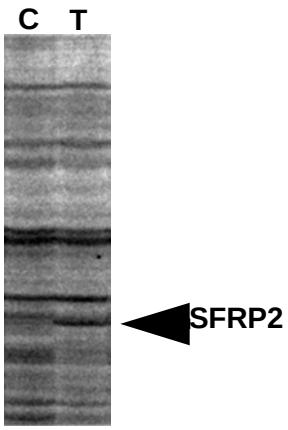


図 20. DD 法による解析
TCDD 曝露胎仔脳(T)と対照非曝露胎仔脳(C) mRNA 由来の cDNA。矢印で示したのは、SFRP2 mRNA 由来のバンド。

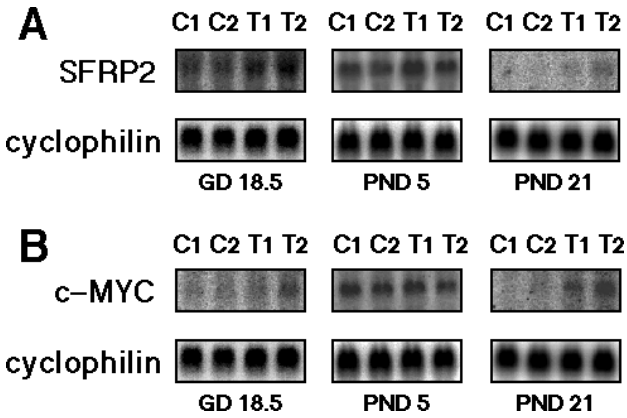


図 21　TCDD 曝露による SFRP2 及び c-MYC mRNA 量の経時的変化―ノーザンブロッテイング法による解析
TCDD 曝露胎仔脳 (T1, T2) と対照非曝露胎仔脳 (C1, C2) の RNA を cyclophilin mRNA を内部標準として解析した。A：SFRP2 mRNA 量の経時的変化。
B：c-MYC mRNA 量の経時的変化。

母親 2 匹から得た TCDD 曝露及び非曝露胎仔、雌雄各 3 匹ずつの脳内の SFRP2 mRNA の局在を *In situ* hybridization 法により解析した。SFRP2 mRNA は、胎生 18.5 日目の胎仔脳の第三脳室の周辺部位に認められたが、TCDD 非曝露群では左右対称的（図 22B）であるのに対して、曝露群においては顕著に非対称的に分布していた（図 22C)。この変化は、雌雄胎仔においてともに認められたが、雌において、雄に比べ、より顕著であった。

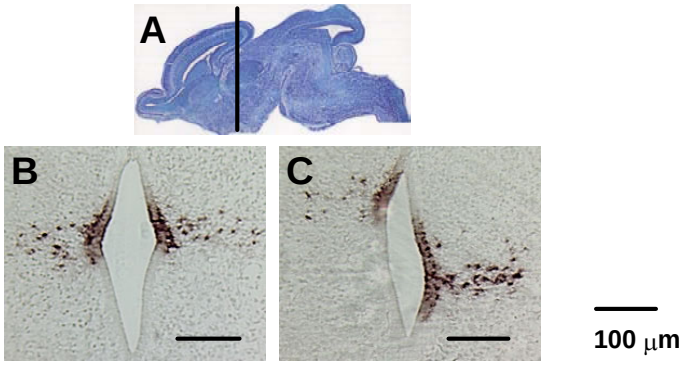


図 22　TCDD 曝露による、SFRP2 mRNA の胎生 18.5 日目の雌胎仔脳内局在の変化―in situ ハイブリダイゼーション法による解析
A：垂直線は、B 及び C の断面を示す。B：TCDD 非曝露胎仔脳。C：TCDD 曝露胎仔脳

上記 SFRP2 mRNA の脳内局在の変化は、TCDD が脳の発生分化、特に左右軸の決定に重大な影響を及ぼして、その毒性を発現している可能性を示唆している。そこで、TCDD による CYP1A1 mRNA 量の誘導が約 4 倍である胎生 18.5 日目の TCDD 曝露及び非曝露胎仔脳について、体の左右軸の決定に関与している遺伝子群、Pitx2c、ActRIIB、Lefty2、Nodal、Fgf8、Sonic hedgehog の発現の差異を、Real-time RT-PCR 法で調べたが、変化を認めなかった。以上の結果は、全て胎生 18.5 日目の胎仔脳を用いて得たもので、今後、体の左右軸の決定に関与する種々の遺伝子発現の、TCDD 曝露による変化を、胎生のより早い時期より経時的に解析する必要があると考えられる。

次に、TCDDの経胎盤・経母乳曝露を受けた仔ラットの成熟後の記憶、学習へ及ぼす影響を検討するため、海馬が関与する学習行動について検討した。体重当たり1.0 μg/kgのTCDDを妊娠15日目のWistar/STラットに単回経口投与し、4週齢で離乳し、11週齢で雌雄ともに生殖腺を摘出し、12週齢でcontextual fear conditioning testを行った（図23）。

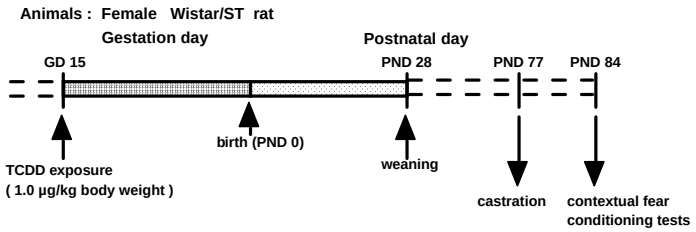


図 23　実験計画（2）
体重当たり 1.0 □ g/kg の TCDD を妊娠 15 日目の Wistar/ST ラットに単回経口投与し、4 週齢で離乳し、11 週齢で雌雄ともに生殖腺を摘出し、12 週齢で海馬依存性学習行動への影響を contextual fear conditioning test で検討した。

contextual fear conditioning には著明な雌雄差があるので、胎仔期における TCDD への曝露が、雌雄の contextual fear conditioning にどのような影響を与えるかを調べた。ラットを特別のチャンバー（条件刺激）に入れ、3 分後に 2 秒間の電撃ショック（無条件刺

激）を足に 5 秒間隔で 3 回与える。この時ラットは、この特殊な状況下に置かれると電撃ショックが来ることを学習し、次にこのチャンバーに入れられると、電撃ショックが与えられなくても、運動停止（freezing）、血圧上昇、脱糞等の恐怖反応を示す。そこで我々は恐怖条件付けの後、1 時間後に 5 分間の freezing 時間を測定した（図 24）。

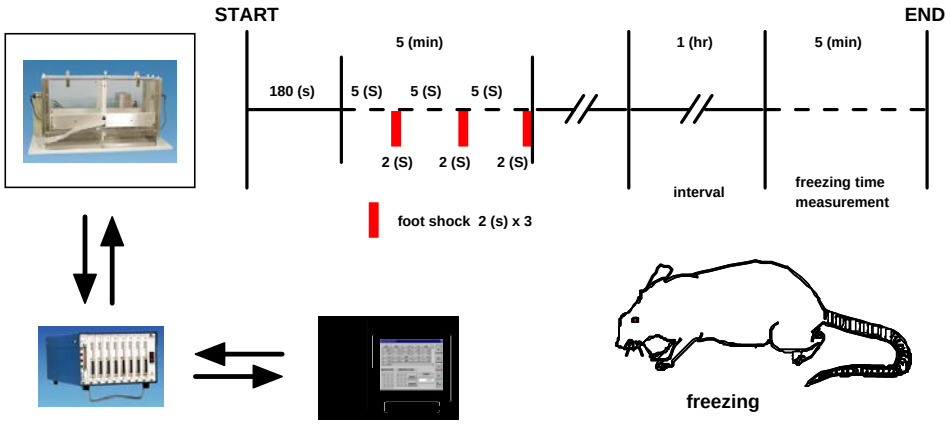


図 24　Contextual fear conditioning test を用いた検討
ラットを特別のチャンバーに入れ（条件刺激）、3 分後に 2 秒間の電撃ショックを足に 5 秒間隔で 3 回与え（無条件刺激）、1 時間後に 5 分間の freezing 時間を測定した。

この結果、非投与群では、雄は雌の約 1.5 倍の freezing を示し、著明な性差が認められた。一方、TCDD 投与群の雄は非投与群の雄に対して約半分の freezing を示し、有意に freezing 時間が減少した。また TCDD 投与群の雌も非投与群の雌に対して freezing 時間の減少傾向がみられた（図 25）。

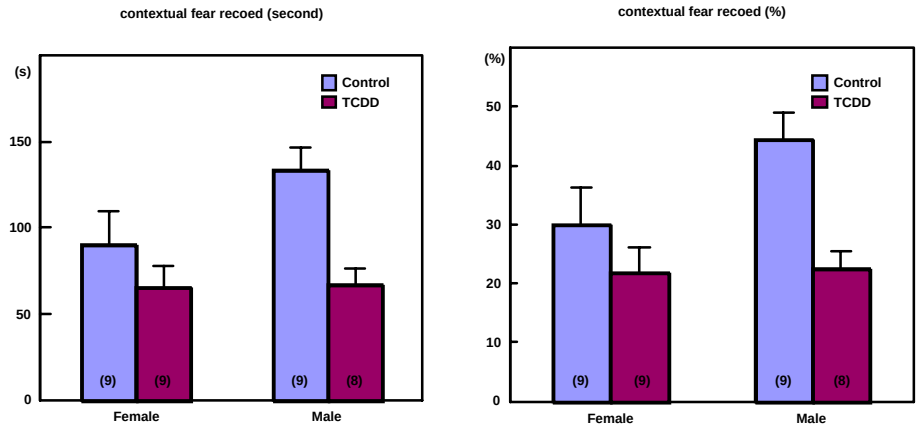


図 25　TCDD への周産期曝露が学習行動へ及ぼす影響
5 分（300 秒）間当たりの freezing 時間（秒）（左）。
5 分（300 秒）間当たりの freezing 時間（%）（右）。
（）内はサンプル数を示す。

このことから、TCDD の経胎盤・経母乳曝露は、成熟後の学習行動に影響を及ぼす可能性が示唆された。contextual fear conditioning の雌雄差には海馬における cyclic AMP response element binding protein (CREB)と呼ばれる転写因子のリン酸化による活性化が関与することが示唆されている。そこで現在、新鮮凍結切片による免疫組織化学的方法

により、海馬における CREB のリン酸化について検討中である。このような方法により今後、周産期の TCDD 曝露が成熟後の学習行動に影響を及ぼす分子機構を明らかにしたい。

（2）研究成果の今後期待される効果

本研究では、妊娠 12.5 日目の C57BL/6N マウスに TCDD を投与すると、胎生 18.5 日目の胎仔脳の第三脳室周辺において、Wnt シグナル伝達系の調節に関与する SFRP2 mRNA の局在が、非曝露群と異なり、非対称的に局在することを見出した。既に、妊娠ラットへの TCDD 投与が胎仔脳の形態や成長後の行動に影響することが報告されている。しかし、TCDD 投与により、特定遺伝子の mRNA の量と局在が変化することは、これまでに見出されていない。

本研究結果は、TCDD が脳の発生分化に重大な影響を及ぼして、その毒性を発現する可能性を示唆している。しかし、この毒性発現に Wnt シグナル伝達系が関与するかどうかは、未だ明らかでない。また TCDD 曝露により、先ず脳の形態形成に異常をきたし、この結果、SFRP2 mRNA の局在が変化した可能性も否定できない。そこで今後、TCDD への曝露により、Wnt シグナル伝達系の種々の遺伝子や脳の形態形成に関与する他の遺伝子の発現がどう変化するかを、胎生のより早い時期より経時的に解析し、TCDD の脳毒性発現機構を明らかにしたい。

一方、海馬が関与する学習行動である contextual fear conditioning には著明な雌雄差があるが、TCDD の経胎盤・経母乳曝露により、この雌雄差が認め難くなることを見出した。

以上の結果は、周産期の TCDD への曝露は、胎仔の脳の分化発達に深刻な傷害を惹起する可能性を示唆する。ヒトでも TCDD は脳の高次機能に影響を与える可能性が示唆されており、特に周産期に曝露を受けた胎児の成長後の学習、行動への影響が懸念されている。本研究成果は今後、TCDD による脳神経毒性惹起の分子機構を理解するための重要な手がかりとなることが期待される。

3.2.6. アストロサイト分化モデル細胞に及ぼすダイオキシンの影響———サイクリックAMP誘導性ラットC6グリオーマ細胞株分化へのTCDDの阻害作用（青木康展、高永博実）

（1） 研究内容及び成果

ダイオキシンは中枢神経系の発生に有害な影響を及ぼすと考えられている。我々はラットC6グリオーマ細胞株（以下、C6細胞）を用いて、ダイオキシンがアストロサイトの分化に及ぼす影響の解明を進めている。アストロサイトはニューロンの機能維持を図るなどして、中枢神経系の機能維持に重要な働きをしている。C6細胞は、アストロサイトの前駆体細胞としての性質を持ち、グリア細胞の発生・分化を研究する上でのモデル細胞としてしばしば用いられている。C6細胞をサイクリックAMP（cAMP）誘導体やcAMPの細胞中含量を増加させる薬剤で処理すると、細胞は平板な形態からアストロサイト様の突起を持つ形態に変化し、GFAP、glutamine synthetase、S100-βなどのアストロサイトに特異的なタンパク質を発現するようになる。また、C6細胞をベンゾ[a]アント

ラセンで処理するとシトクロムP450（CYP）が誘導されことが知られ、この細胞株はCYPによる一酸素添加酵素系を保持していると考えられる。

PCDD、PCDF、PCBといったダイオキシン類の中でも、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin（TCDD）の最も強い毒性を発揮する。ダイオキシン類の生物学的影響は、ダイオキシン受容体として働くリガンド依存性転写因子であるAh受容体（AhR）を介した遺伝子発現に依存して発現することが明らかになっている。ダイオキシン類の遺伝子発現機構は主に肝臓で調べられている一方、TCDDは神経毒性を持つことを示す証拠も集まりつつある。本研究では、アストロサイトの分化にダイオキシン類が及ぼす影響を明らかにするために、cAMPが誘導するC6細胞の形態変化やGFAPやAhRの遺伝子発現に及ぼすTCDDの影響を調べた。

C6細胞は10%牛胎仔血清を添加したD-MEM培地を用いて、5% CO2インキュベーターにて培養した。C6細胞の分化を誘導するにあたっては、凍結保存した細胞を2日間培養した後、5 x 105個の細胞を100 mm径のプラスチック製培養皿に播種し、さらに2日間培養した細胞を用いた。この細胞をphsphate buffered salineで洗浄し、血清無添加D-MEM培地で1時間培養した後、1 mMジブチリルcAMP、0.25 mMテオフィリンを添加して細胞分化を開始した。生細胞数はクリスタルバイオレット染色により計数した。

アストロサイト様細胞への分化は、細胞から伸張した突起の長さにより定量化した。細胞を1%グルタルアルデヒドで15分間固定し、クマシーブリリアントブルーで20分間染色して、さらに3回洗浄した。3枚の培養皿についてそれぞれ100個以上の細胞について、突起の長さをNeuroZoomソフトウエアにより測定し、定量化した。

mRNAの発現量およびタンパク質の発現量は、それぞれノーザンブロッティング法とイムノブロッティング法により定量した。

cAMP処理したC6細胞内で発現しているAhRの発現量に及ぼすTCDDの影響を調べたところ、TCDDの濃度に依存してAhRの発現量は低下した（図26）。このとき、CYP1A1の発現は24時間のTCDD曝露により著しく増加し、AhR系がCYPを誘導しうるよう有効に機能していることが示された。cAMPにより分化誘導の最も大きな特徴は、形態的変化である。血清非存在下で72時間cAMP処理すると、C6細胞は長い突起をもつアストロサイト様の形態に分化した。図27に示すように、0.1–10 nM TCDDで24–72時間処理しても細胞数に有意な変化は認められなかったが、それぞれの細胞の突起の長さは1 nM TCDDで有意に減少した（図28）。

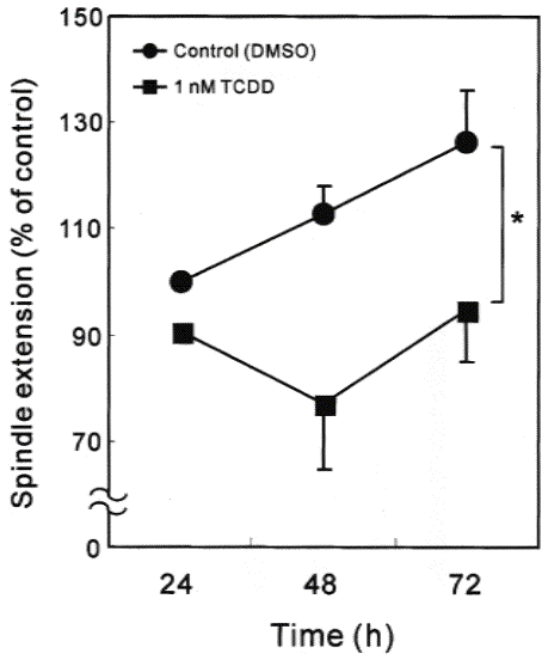


図26　C6細胞中のAhRとCYP1A1の発現に及ぼすTCDDの影響。cAMP処理したC6細胞をTCDD非存在下（lane 2）あるいは存在下（lane 3-5）で24時間培養した後、AhR (A)およびCYP1A1 (B)の発現量をイムノブロッティング法で定量した。cAMP無処理対照はlane 1に示す。代表的なイムノブロッティングの結果を上図に、AhRとCYP1A1の発現量をGAPDHの発現量で標準化した値を下図に示す。
＊ P ＜ 0.05

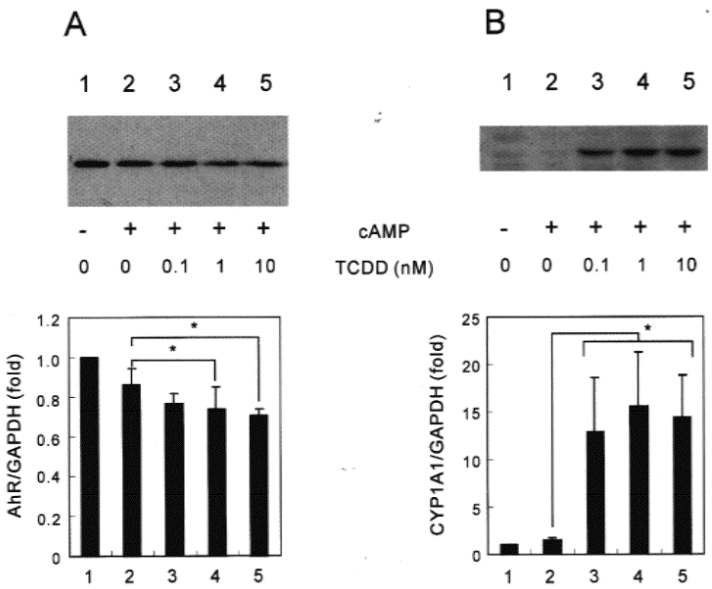


図27　生細胞数に及ぼすTCDDの影響。C6細胞をcAMP存在下で0.1 – 10 nM TCDD存在下で72時間培養した。

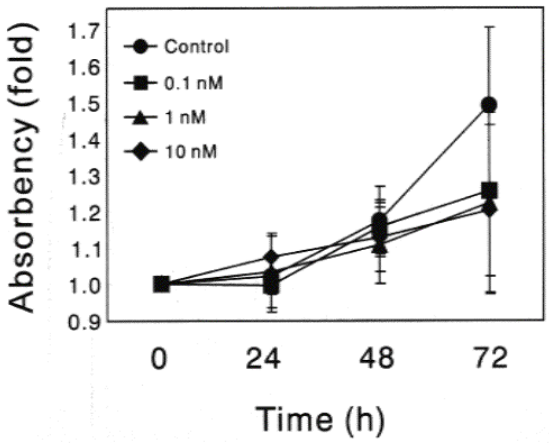


図28　アストロサイト細胞様突起の伸張に及ぼすTCDDの影響。＊ P ＜ 0.05

C6細胞の形態変化に伴う様々の遺伝子の発現が知られているが、GFAPはヒト・アストロサイトの分化に伴って発現することが知られている。また、C6細胞の形態がGFAPの過剰発現により大きく変化することも報告されている。TCDDによるアストロサイト様突起の伸張の阻害がGFAPの発現の変化により引き起こされている可能性が考えられた。GFAP mRNAの発現に及ぼすTCDDの影響を調べたところ、cAMP非存在下で培養した細胞ではGFAP mRNAの発現は殆ど見られなかったが、cAMP存在下では24時間のTCDD処理によりGFAP mRNA量は濃度依存的に低下した（図29A）。同様にGFAPタンパク質の発現量もTCDD処理により濃度依存的に低下した（図29B）。TCDDによるGFAPタンパク質の発現抑制はTCDD処理72時間でも継続し、10 nM TCDDで阻害は40%に及んだ（図30）。

多くのTCDDに対する生体反応はAhRを介していることが知られている。TCDDのGFAP発現に及ぼす影響にAhRが関与しているか明らかにするか否かをAhRのアンタゴニストであるα-ナフトフラボン（α-NF）を用いて調べた。図31のように、1μM α-NFはGFAPの発現を抑制しない一方（lane 1, 2）、1 nM TCDDによるGFAP発現阻害作用を抑制した（lane 3, 4）。10 nM TCDDによるGFAP発現阻害作用を1μM α-NFは充分に抑制出来なかった。

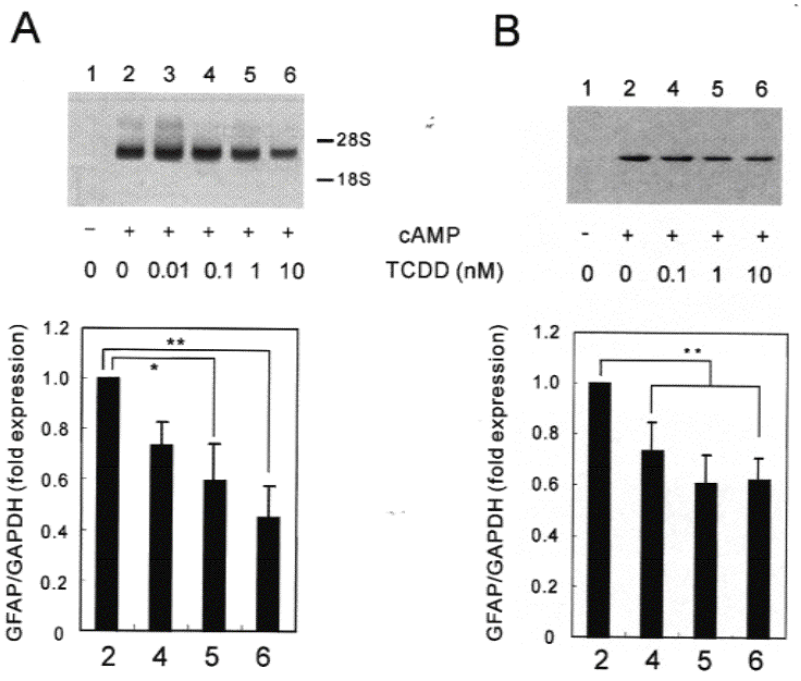


図 29　C6 細胞における GFAP の発現に及ぼす TCDD の影響。C6 細胞を cAMP 非存在下（lane 1）、あるいは存在下（lane 2 – 6）で 0.01 – 10 nM TCDD で処理した。A. 上図は典型的なノーザンブロッティングの結果、下図は GAPDH mRNA の発現量で標準化した GFAP mRNA の発現量を示す。18S と 28S はリボゾーム RNA の泳動位置。B. 上図は典型的なイムノブロッティングの結果、下図は GAPDH タンパク質の発現量で標準化した GFAP タンパク質の発現量を示す。＊P＜0.05、** P ＜ 0.01

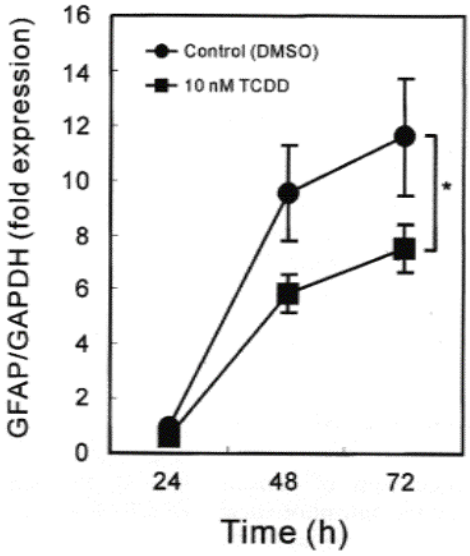


図 30　TCDD に曝露した細胞でのGFAPたんぱく質の系時変化。GFAP タンパク質発現量はGAPDHタンパク質発現量で標準化して示した。＊ P ＜ 0.05

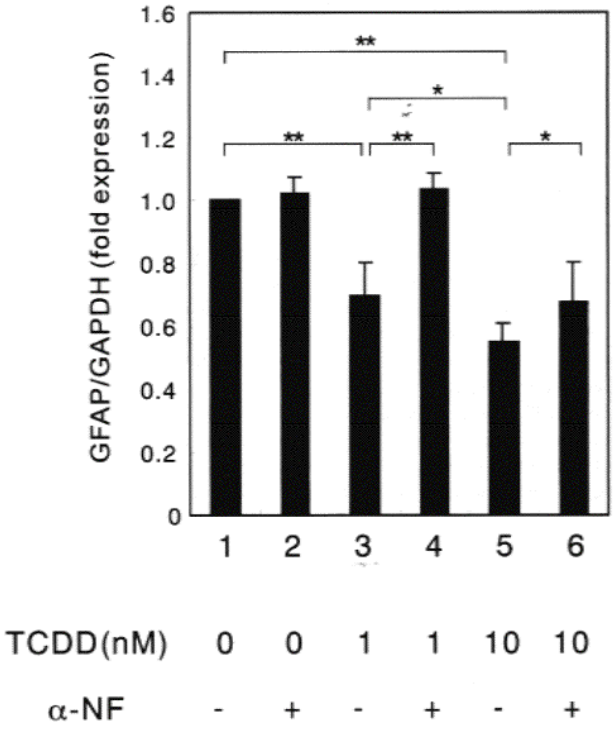


図31　TCDDによるGFAP発現阻害作用の α-NF による抑制。C6細胞を α-NF で2時間前処理した後、cAMP 及び TCDD で 48 時間処理した。GFAP タンパク質の発現量はGAPDHタンパク質発現量で標準化した。＊ P ＜ 0.05、** P ＜ 0.01

(2)　研究成果の今後期待される効果

鉛やPCBを妊娠中あるいは授乳中の母ラットに投与すると、ラット新生仔脳のGFAP発現に影響が現れる。しかし、これらの化学物質が脳細胞でのGFAP発現に及ぼすのか、あるいは中枢神経の発達がGFAPの発現に影響を及ぼすのかは明らかにされていない。有害化学物質がGFAP発現に影響を及ぼすメカニズムの解明することにより、有害化学物質が中枢神経系に及ぼす影響を評価することが可能になると考えた。この研究でGFAPの発現をTCDDが阻害することが明らかになり、また、この阻害がAhRに依存することが示唆された。C6細胞のアストロサイト様分化をTCDDが阻害することから、ダイオキシン類は脳中でのアストロサイトの発生・分化を阻害する可能性が想起される。

cAMPによるC6細胞の形態変化は、中間系フィラメントの再配置と中間系フィラメントとマイクロチューブの相互作用の消失により引き起こされる。これら細胞骨格系の変化は、cAMPが細胞中でアクチンの脱重合を引き起こし、細胞が収縮した結果であると考えられている。C6細胞をTCDDで処理したときに見られるアストロサイト様突起の伸張不全には、多くの細胞骨格構成成分が関与していると思われる。その中で、アストロサイト特異的な中間系フィラメントであるGFAPの細胞内蓄積量がTCDDの作用により少なくなることは、TCDDによる形態の変化を説明するに十分な現象である。

しかしながら、TCDDがどの様にGFAP発現を阻害するかは疑問のままである。一つの原因として、TCDDによる転写の制御が考えられる。AhRと転写因子AP-1は相互作用し、そのため、TCDDは遺伝子発現を阻害することが知られている。GFAP遺伝子のプロモーター部分にはAP-1結合領域が存在していることから、TCDDにより活性化されたAhRがAP-1と相互作用してGFAPの発現に影響を及ぼすことが示唆される。

また、cAMPによるC6細胞のアストロサイト様分化が細胞内カルシウムの枯渇によっても誘導されることから、ダイオキシンの影響が細胞内カルシウムを介して引き起こされる可能性も考えられる。例えば、フォスフォ・イノシチジンの代謝回転を促進することにより細胞内カルシウムを増加するエンドセリンやATPは、C6細胞でイソプロテレノールにより促進されるcAMP合成を阻害する。一方、TCDDは細胞内カルシウム濃度を増加することが知られている。TCDDのC6細胞の分化への阻害作用は、TCDDが細胞内カルシウム濃度を低下し、その結果細胞内cAMP濃度を低下することにより起こるとも考えられる。

本報告はC6細胞の分化にダイオキシン類が影響を及ぼすことを初めて報告するものである。C6細胞はダイオキシンの神経毒性の機構を明らかにする上で有用なモデルであることが示された。

3.3　免疫機能への影響

免疫系はダイオキシン（TCDD）に対して感受性の高い器官の一つで、TCDD によって胸腺萎縮や抗体産生の抑制がおこることが以前より報告されていた。そこで免疫機能グループでは、*in vivo* での影響を詳細に解析するとともに、免疫機能の抑制において標的となる細胞を明らかにすること、および抑制の分子メカニズムを明らかにすることを主たる目標の一つとした。これらの研究の成果として、T 細胞が TCDD による抗体産生抑制の標的細胞であることが示唆された。そこで T 細胞株を用いた分子レベルでのメカニズム研究を行い、TCDD が T 細胞に対してアポトーシスや細胞周期抑制を誘導することを明らかにした。また TCDD の毒性を仲介する分子である Ah レセプター（AhR）の恒常的活性化型変異体を T 細胞特異的に発現させたトランスジェニックマウスの作製へ研究を進展させた。

本研究では、TCDD 曝露の時期によってアレルギーの誘導・増悪に関与する IgE 産生への影響が全く異なることも明らかとなった。すなわち、これまで TCDD をマウスに直接曝露すると IgM, IgG および IgE クラスの抗体産生がいずれも抑制されることが報告されてきたが、本研究で妊娠中に TCDD 曝露した母親から生まれた仔では IgE 産生が増加することが明らかとなり、アレルギーとの新たな関連が示唆された。

またこの研究を開始する時点では、実際にダイオキシンがアレルギー反応に及ぼす影響に関しては実験的な知見が全く得られていなかった。このことから、アトピー性皮膚炎自然発症マウスに対するダイオキシン曝露の影響に関しての研究を行った。その結果、あらかじめ皮膚症状をおこしたマウスへの TCDD 曝露が皮膚症状を悪化させるという新たな知見を得た。

その他、TCDD による胸腺萎縮作用が末梢の T 細胞構成に及ぼす影響や、TCDD の胸腺細胞への影響に関して胎仔胸腺器官培養系（FTOC）を用いたメカニズム研究、WHO の TCDD の耐容一日摂取量の見直しに関連する追試研究などを行った。

これらの研究は、TCDD による免疫抑制のメカニズムおよび影響に関しての理解を大きく進めるものであると考える。

3.1.1　TCDD が免疫臓器に及ぼす影響とメカニズム

1-1. 低用量 TCDD の経胎盤・経母乳曝露が仔の免疫臓器に及ぼす影響　（野原）

(1)研究内容および成果

低用量の TCDD の経胎盤・経母乳曝露にともなう免疫機能への影響に関する基礎的知見を得るために、妊娠中の Holtzman ラットに 12.5 –800 ng/kg の TCDD を単回経口投与し、生まれた仔（雄）の免疫臓器について臓器重量、細胞構成、TCDD 含量、および CYP1A1 mRNA の誘導を生後経時的に測定した。

妊娠 15.5 日目に TCDD を経口投与した母親から生まれた仔（雄）の胸腺および脾臓重量は、生後 5 日から 120 日のどの時点でも対照群と変わらなかった。これらの臓器における TCDD 含量は常に胸腺で脾臓より高く、生後 21 日以降、生後 49 日までに速やかに減少するという特徴が明らかとなった（表 1）。また胸腺と脾臓の CYP1A1 mRNA の発現量を competitive RT-PCR 法によって定量した。その結果、生後 5 日の仔の胸腺では、50-800 ng TCDD/kg 投与群で用量依存的な CYP1A1 mRNA の誘導が観察され、この誘導はその後 21、49 日で経時的に減少することが示された（図 1）。胸腺に比べて脾臓の CYP1A1 mRNA の誘導は 20 分の 1 程度とごく弱いことも明らかとなった（図 1）。脾臓の CYP1A1 mRNA の誘導が弱いことに関しては、脾臓では TCDD 存在量が胸腺よりも少ないことが関与すると考えられたが、存在量の差はおよそ 1/2 程度であるのに対して、CYP1A1 mRNA の誘導の程度は大きく異なることが特徴的であった。一方、胸腺で

は細胞数や細胞構成に生後 120 日まで対照群と曝露群で差がなかったのに対して、脾臓では 49 日のみに TCDD の用量依存的な細胞数の減少が観察された（図 2）。

表 1. 妊娠中に TCDD 曝露したラットから生まれた仔（雄）の胸腺および脾臓の TCDD 濃度 [a]

Tissue	Maternal TCDD dose (ng/kg)	TCDD concentration (pg / g tissue)		
		PND 21	PND 49	PND 120
Thymus	0	N.D.[b]	N.D.	0.4
	200	61.4	11.1	5.5
	800	102.0 [c]	28.0 [c]	11.5
Spleen	0	0.2	N.D.	0.1
	200	28.0	1.7	1.0
	800	62.7 [c]	22.4 [c]	1.7

[a] 1 群 5 匹の動物からの組織を合わせて、TCDD 濃度を測定した。[b] 検出限界以下。 [c] 2 回の実験の平均値。

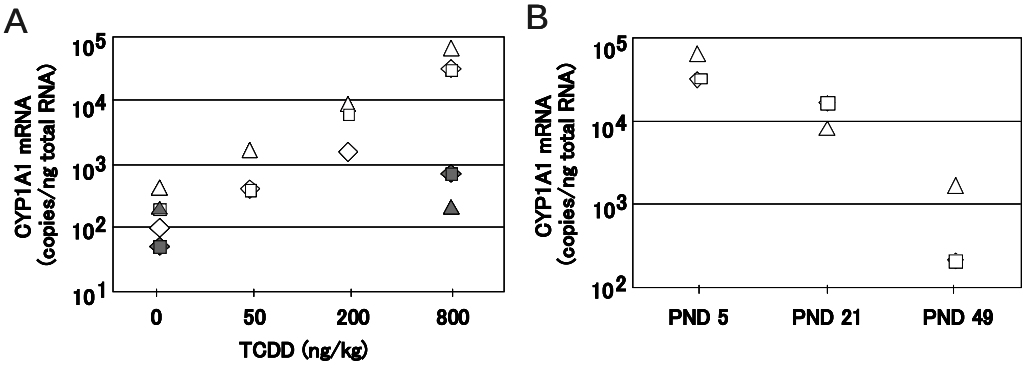


図 1. 胸腺および脾臓での CYP1A1 の誘導

TCDD に経胎盤・経母乳曝露した仔（雄、n = 3）の胸腺および脾臓の CYP1A1 mRNA 量を定量的競合 RT-PCR によって定量した。（A）生後 5 日の胸腺（白い記号）および脾臓（黒い記号）の CYP1A1 mRNA 量。（B）800 ng TCDD/kg 曝露後の胸腺の CYP1A1 mRNA 量の経時的変化。

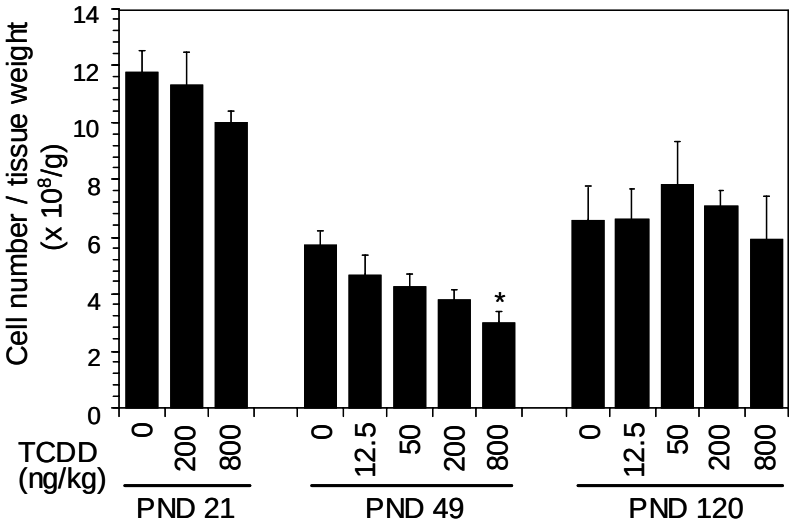


図 2. TCDD の妊娠中曝露が、仔の脾臓細胞数に及ぼす影響
結果は平均値 ± 標準誤差であらわした。

以上の結果から、低用量 TCDD の経胎盤・経母乳期曝露が思春期前後に特異的に、免疫臓器である脾臓に影響を及ぼすことが示された。また、脾臓では TCDD による AhR の活性化の指標となる CYP1A 1 の発現が胸腺より弱かったにもかかわらず、脾臓でのみ影響が見られたことから、AhR を介した直接的な影響というよりは、脾臓特異的な要素が関与する影響であることが考えられた。

(2) 研究成果の今後期待される効果

本研究では、妊娠中のラットに TCDD を投与した場合の、仔の免疫臓器における TCDD の存在量、CYP1A1 mRNA の発現量の定量、およびその影響について研究を行い、それらの関係を明らかにすることができた。この結果は、これまで研究が行われていた肝臓などでのデータとの比較によって、免疫臓器の TCDD 感受性を明らかにし、TCDD の毒性を総合的に評価するための基礎的データとなるものである。得られた結果で特に重要な点は、TCDD の経胎盤・経母乳期曝露の免疫系への影響が急性影響として顕れるというよりは、ある時期に特異的に発現する影響として発育初期段階でインプリントされるという点であった。そのメカニズムは全く不明であり、免疫系が TCDD によるその他の未知の影響を受けている可能性も考えられた。本研究は、免疫反応が起こっていない免疫臓器への影響を調べたものであるが、今後はさらに、実験動物に免疫反応を誘導し、その免疫反応に対する授乳期曝露の影響について研究が必要と考えられた。

1-2. 低用量 TCDD 曝露が胸腺および末梢 T 細胞に及ぼす影響　（野原）

(1)研究内容および成果

TCDD による胸腺萎縮については、従来かなり高い用量の TCDD 曝露で影響やメカニズム研究が行われていた。そこでより低用量の TCDD 曝露の影響について、SD ラットで検討した。また TCDD による胸腺萎縮が末梢の T 細胞構成やその機能に影響を及ぼすと考えられているものの、それを支持するデータはこれまでほとんど得られていない。そこで、胸腺から末梢へ供給される recent thymic emigrant (RTE)の比率を含め、末梢の T 細胞構成について検討した。

1 または 2 μg /kg の TCDD を SD ラット（雌）に一回経口投与し、7 日後に胸腺への影響を調べた。両群の動物で、TCDD による AhR の活性化の指標となる CYP1A1 の発現が胸腺で確認された。なお、TCDD による胸腺萎縮の原因となることが報告された $p27^{kip1}$ 遺伝子の誘導は認められなかった。従来、高用量の TCDD 曝露で報告されていた影響については、胸腺重量の減少および胸腺細胞中の CD8 T 細胞の割合に対する CD4 T 細胞の割合の減少が観察された。しかし、胸腺細胞の約 90%を占める CD4+CD8+(double positive, DP)細胞の比率には有意な変化は見られず、低用量の TCDD 曝露は、胸腺の DP 細胞の比率を低下させることなく胸腺重量を低下させることが明らかとなった。

また末梢の T 細胞への影響を調べるために、腸間膜リンパ節のリンパ球構成を調べた。その結果、Thy1+CD45RC-の表面抗原で識別される recent thymic emigrant (RTE)の比率が有意に減少していることが明らかとなった。

以上の結果から、低用量 TCDD 曝露が胸腺に影響を及ぼすことが示され、DP 細胞の増殖よりも、DP 細胞から CD8 または CD4 T 細胞への分化の過程の方が TCDD に対する感受性が高いことが示唆された。また TCDD による胸腺への影響が、末梢の T 細胞構成に影響を及ぼしていることが明らかとなった。RTE は末梢 T 細胞の反応多様性の維持に働いていることから、TCDD が RTE を減少させることによって免疫機能に悪影響を及ぼす可能性が示唆された。

(2) 研究成果の今後期待される効果

これまで、TCDD による胸腺萎縮が末梢の T 細胞構成やその機能に影響を及ぼすことが考えられていたが、実際にはそれを支持するデータはほとんど得られていなかった。そこで、近年末梢の T 細胞の機能との関連から注目されていた recent thymic emigrant (RTE)について測定を行った。その結果、TCDD 曝露による免疫臓器での RTE の減少が検出され、胸腺萎縮が実際に末梢の T 細胞に影響を及ぼしていることを示すことができた。この結果は、さらに TCDD が T 細胞の機能にも影響を及ぼしているかどうかの検討の必要性を指摘している。

1-3. TCDD による胸腺萎縮のメカニズム （九十九、野原）

(1)研究内容および成果

TCDD 曝露によって胸腺萎縮、および CD4+CD8+（double positive, DP）細胞から CD8 または CD4 T 細胞への分化が CD8 側に偏ることが明らかにされている。extracellular signal-related kinase (ERK)経路は、胸腺細胞の分化やアポトーシスにおいて重要な役割を果たすことが知られている。そこで本研究では、in vivo における TCDD の影響を再現するよい実験系であることが明らかにされているマウスの胎仔胸腺器官培養系（FTOC）を用いて、TCDD による胸腺細胞の変化における ERK 経路の関与について検討した。

C57BL/6 マウスの FTOC に TCDD を添加して培養すると、対照群と比較して培養 4 日および 6 日目で DP 細胞の数が有意に低下し、CD8 T 細胞は増加傾向を示した（図 3）。CD8 T 細胞をさらに CD3 抗原で識別すると、CD3 陽性の成熟 CD8 T 細胞（$CD3^{high}CD8$ T 細胞）が TCDD 曝露群で有意に増加していることが確認された（図 3）。この実験系に ERK 経路のインヒビターである U0126 を添加して培養したところ、TCDD による総細胞および DP 細胞の減少は U0126 添加の影響を受けなかったが（図 5）、一方、TCDD による CD8 T 細胞の増加は見られなくなった（図 4）。また U0126 は TCDD による CYP1A1 の誘導を阻害しないことを確認した（図 5）。以上の結果から、ERK 経路の活性化は TCDD による総細胞および DP 細胞の減少には関与しないが、CD8 T 細胞の分化に関与することが示唆された。

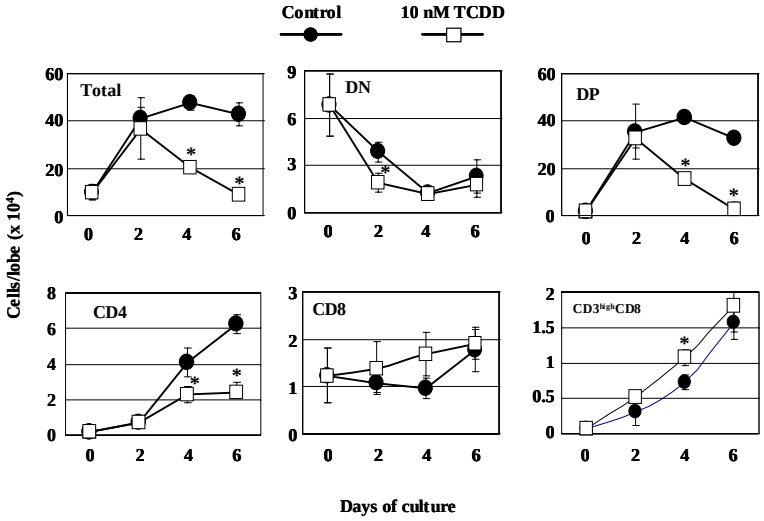


図 3. TCDD 曝露が FTOC の細胞数に及ぼす影響

総細胞数または CD4-CD8-ダブルネガティブ (DN) 、CD4+CD8+ダブルポジティブ (DP)、CD4 T, CD8 T、成熟 CD8 T (CD3+CD8+)細胞の細胞数の変化。結果は平均値 ± 標準偏差(n = 3~4)であらわした。* p <0.05。

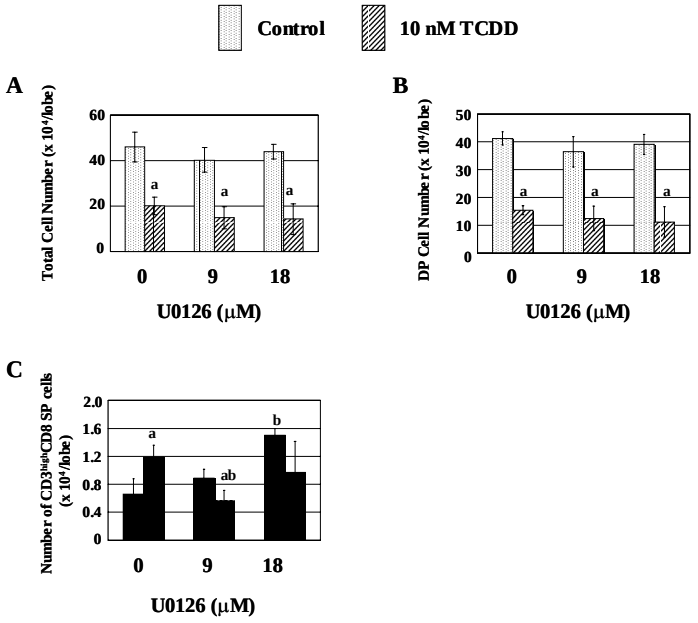


図 4. ERK インヒビターである U0126 が FTOC の総細胞、DP 細胞および成熟 CD8 T（$CD3^{high}$CD8 T）細胞数に及ぼす影響

総細胞（A）、DP 細胞（B）および成熟 CD8 T 細胞（C）の細胞数の変化。結果は平均値 ± 標準偏差(n = 3~4)であらわした。* p <0.05。

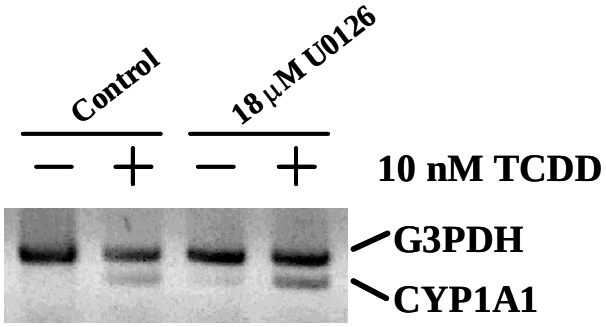


図 5. TCDD による CYP1A1 遺伝子の発現に対する U0126 の影響
マウス成獣の胸腺を U0126 または溶媒で 1 時間前処理し、さらに 10nM TCDD 存在下、4 時間培養した。総 RNA を調製し、RT-PCR で CYP1A1 mRNA を測定した。内部標準として、G3PDH mRNA を同時に測定した。

(2) 研究成果の今後期待される効果

TCDD の胸腺への影響は、これまで調べられた全ての動物種でみられており、TCDD の生体影響の代表的なものであるが、その分子メカニズムは解明されていない。本研究は、胸腺細胞の分化に重要な働きをする ERK 経路の活性化が、TCDD による CD8 T 細胞の分化に関与することを示した最初の論文である。ERK 経路はさまざまな生命現象に関与しており、本研究の結果は、TCDD の種々の毒性発現メカニズム研究に対して有用な知見となることが期待される。

3.3.2 TCDD による抗体産生抑制のメカニズム

2-1. 高親和性抗体産生に及ぼす影響（井上、野原）

(1)研究内容および成果

体液性免疫応答において B 細胞は末梢リンパ組織で 2 種類の抗体産生細胞(AFC)、低親和性 AFC もしくは高親和性 AFC、に分化する。低親和性 AFC は主に抗原特異的 IgM を産生し、高親和性 AFC は主に抗原特異的 IgG クラスの抗体を産生して外来抗原の排除に貢献している。TCDD が低親和性抗体産生を抑制することは良く知られており、低親和性 AFC への最終分化あるいは低親和性 AFC からの抗体産生を TCDD が抑制すると考えられている。これに対して高親和性抗体産生に対する TCDD の影響は十分に調べられていない。我々は TCDD 曝露による高親和性抗体産生への影響とその作用メカニズムを解明することを研究の目的とした。脾臓において抗原特異的 B 細胞は増殖して胚中心を形成し、抗体の親和性の成熟を経て高親和性 AFC に分化し、高親和性抗体を産生する。そこで、一連の反応に及ぼす TCDD 曝露の影響を解析した。

C57BL/6N マウス(6 週齢、雌)に ovalbumin(OVA)/alum を腹腔内投与し、同時に TCDD を 20 μg/kg 単回経口投与した。この時対照群にはコーン油を投与した。OVA 免疫後 1, 4, 7, 10 または 14 日の血漿中の抗体価を ELISA 法で測定し、脾臓細胞を調製して胚中心 B 細胞、すなわち Peanut agglutinin(PNA)$^{+}$B220^{+}B 細胞、をフローサイトメトリーで解析した。また脾臓切片を作製し、PNA、抗 Ki-67 抗体および TUNEL 法を用いて、それぞれ胚中心、増殖細胞およびアポトーシス細胞を組織化学的に検出した。一方、高親和性抗体を検出するため、TCDD 曝露と同時に(4-hydroxy-3-nitrophenyl) acetyl 基（NP）を結合した chicken γ-globulin（NP-CG）を免疫し、10 または 14 日後の脾臓細胞を用いて NP に対する高親和性 AFC を ELISPOT 法で検出し、また血漿中の高親和性抗 NP 抗体量を

ELISA 法で測定した。

対照群で血漿中の抗 OVAIgG1 量の増加が OVA 免疫 10 日後より認められ（図 6)、脾臓において胚中心 B 細胞の比率、および細胞数が OVA 免疫 7 日後より増加することが確認された（図 7)。これに対して TCDD 曝露群では、抗 OVAIgG1 量の増加が有意に抑制され（図 6)、胚中心 B 細胞の比率および細胞数の増加がいずれも初期段階から有意に抑制された（図 7)。OVA 免疫 7 日後の脾臓切片を用いて胚中心における細胞増殖および細胞死を検出すると、対照群と比較して TCDD 曝露群で細胞増殖が有意に抑制されたが、細胞死の増加は認められなかった（図 8)。また NP-CG を免疫した場合、免疫 10 および 14 日後の脾臓における高親和性 AFC の細胞数、および血漿中の高親和性抗 NP 抗体量が TCDD 曝露により有意に減少することが認められた（図 9)。

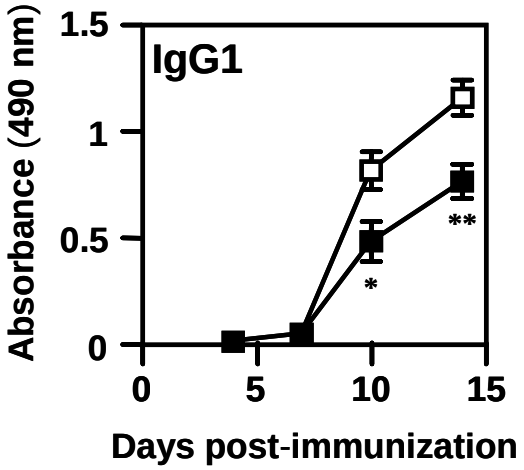


図 6. TCDD 曝露により OVA 特異的 IgG1 産生は抑制される

C57BL/6N 雌性マウスに TCDD（■）を 20 μg /kg、もしくはコーン油（□）を単回経口投与し、同時に OVA/alum を腹腔内に投与して免疫した。免疫後 1、4、7、10 および 14 日の血漿中の OVA 特異的 IgG1 量を ELISA 法により測定した。Means ± S.E. (n=5-8)　*p<0.05, **p<0.01

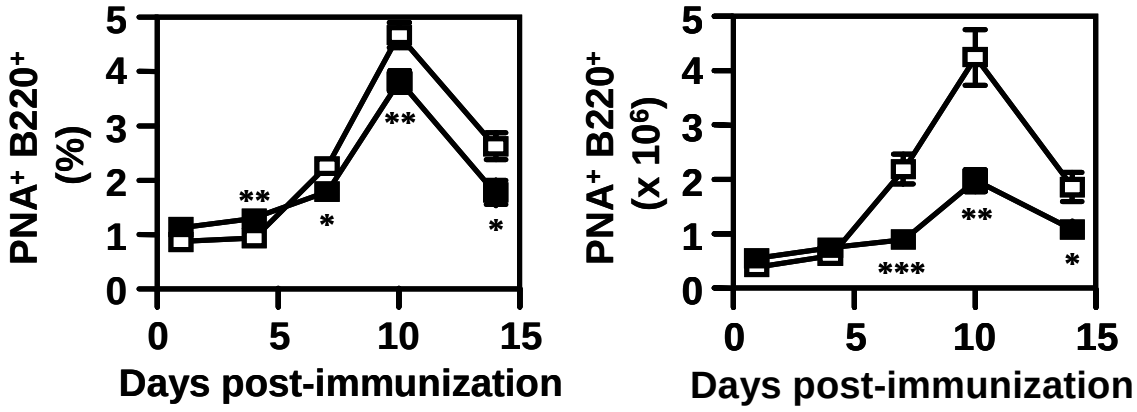


図 7. OVA 免疫で誘導される胚中心 B 細胞比率および細胞数の増加は TCDD 曝露により抑制される

マウスを図 1 に示すように TCDD 曝露および OVA 免疫した。免疫後 1、4、7、10 および 14 日の脾臓細胞を調製し、PNA および抗 B220 抗体で染色し、フローサイトメトリーで解析した。対照群（□）と TCDD 曝露群（■）における胚中心 B 細胞（PNA^+B220^+）の比率（左）および細胞数（右）を示す。このとき胚中心 B 細胞数は脾臓細胞数と胚中心 B 細胞比率を基に算出した。Means ± S.E. (n=5-8)　*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

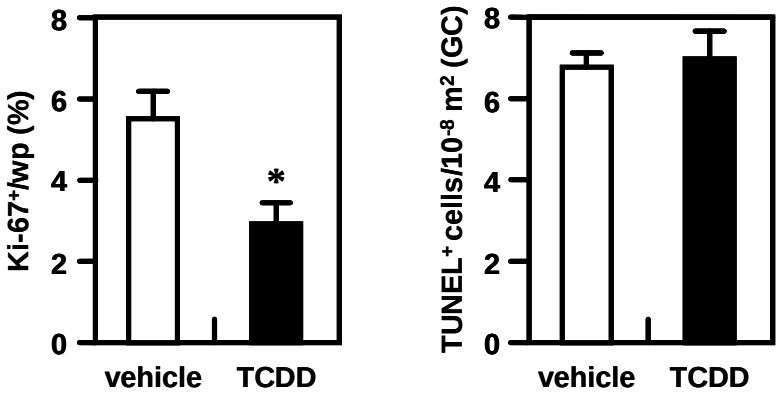


図 8. TCDD 曝露により胚中心における細胞増殖は抑制される

マウスを図 1 に示すように TCDD 曝露および OVA 免疫した。免疫 7 日後の対照群（白カラム）および TCDD 曝露群（黒カラム）における脾臓切片を作製し、PNA、抗 Ki-67 抗体もしくは TUNEL 法を用いて組織化学的に胚中心、増殖細胞もしくはアポトーシス細胞を検出した。Leica Qwin Version 2.2A ソフトウェアを用いて白脾髄、Ki-67+細胞、および胚中心の面積を測定し、TUNEL+細胞数を測定した。白脾髄における増殖細胞の割合（左）、および胚中心におけるアポトーシス細胞の割合（右）を示す。Means ± S.E. (n=3) **p*<0.05

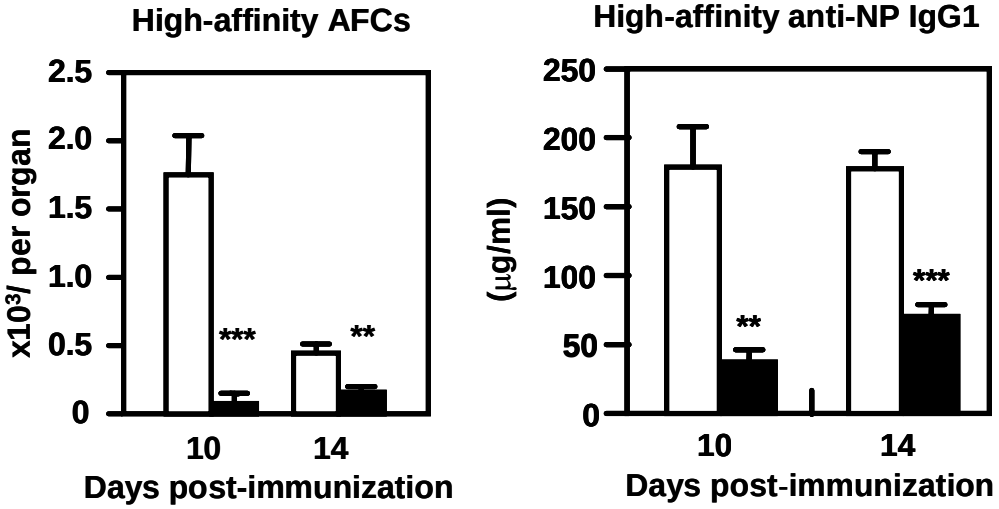


図 9. TCDD 曝露により高親和性 AFC の産生および高親和性抗体産生が抑制される

C57BL/6N 雌性マウスに TCDD（■）を 20 μg /kg、もしくはコーン油（□）を単回経口投与し、同時に NP-CG/alum を腹腔内投与して免疫した。免疫 10 または 14 日後の対照群および TCDD 曝露群の脾臓における高親和性 AFC を ELISPOT 法で検出し（左）、血漿中の高親和性抗 NPIgG1 量を ELISA 法により測定した（右）。Means ± S.E. (n=6) ***p*<0.01, ****p*<0.001

以上の結果から、TCDD 曝露により高親和性抗体産生が抑制されることが明らかとなった。さらに、脾臓における高親和性 AFC の産生だけでなく、胚中心の形成および胚中心内の細胞増殖が TCDD 曝露により抑制されることが確認され、胚中心における抗原特異的 B 細胞の増殖が TCDD 曝露により抑制されることが高親和性抗体産生の抑制に至ることが示唆された。

(2) 研究成果の今後期待される効果

外来異物の侵入に対して産生される低親和性抗体のみならず高親和性抗体も、TCDD曝露により抑制されることが明らかとなった。このことから、外来異物に対する生体防御機構がTCDD曝露により損なわれることが示された。また低親和性抗体産生の場合、TCDD が B 細胞に直接作用すると考えられているのに対して、高親和性抗体産生の場合は異なるメカニズムで TCDD が影響を及ぼすことが示唆された。今後は TCDD の標的細胞を同定し、作用メカニズムを細胞レベルもしくは分子レベルで明らかにすることがヒトへの影響の外挿に繋がると期待される。

2-2. TCDD による抗体産生抑制のメカニズム：T 細胞由来サイトカイン産生に対する影響（伊藤、野原）

(1)研究内容および成果

これまで TCDD はマウスの抗体産生を抑制することが報告されているが、その詳細なメカニズムは不明である。T 細胞は抗体産生において重要な働きをする細胞であり、抗原刺激に応じてサイトカインを産生して B 細胞の増殖や胚中心形成、抗体のクラススイッチなどを誘導する。一次免疫反応において、まず抗原となる異物が生体に侵入すると抗原提示細胞がそれを捕食、分解後、抗原を提示する。提示された抗原に対して特異的な受容体を持つ T 細胞は、抗原を認識すると活性化、増殖する。その後、タイプ 2 ヘルパーT（Th2）細胞に分化すると、IL-4、IL-5、IL-6 などのサイトカインを産生して B 細胞を刺激し、IgG1 や IgE の産生を誘導する。そこで TCDD による抗体産生抑制のメカニズムを調べるため、T 細胞由来のサイトカイン産生を中心に T 細胞に対する TCDD の影響を調べた。実験は 2-1 と同様に雌性 C57BL/6N マウスに TCDD（20 μg/kg）あるいはコーンオイルを経口投与し、同時に抗原である OVA/alum を腹腔内投与して免疫した。その後、1 から 14 日目まで経時的に脾臓を摘出し、脾臓細胞を調製した。サイトカイン産生量は脾臓細胞を OVA 存在下で 2 日間培養し、上清中の濃度を ELISA で測定した。まず脾臓細胞数について調べたところ、脾臓中の総細胞数および T 細胞数（$CD3^+$）はコーンオイルを投与した対照群において免疫 7 日目で増加したが、この増加は TCDD 曝露によって有意に抑制された。また活性化した T 細胞から産生され T 細胞自身の増殖にも関与する IL-2 は、TCDD 曝露によって免疫 4 日目で有意に低下した（図 10a）。これらの結果から、TCDD は一次免疫反応における T 細胞の活性化、増殖反応を抑制することが示唆された。さらに Th2 細胞が産生する IL-4、IL-5、IL-6 に関しては対照群において免疫 4 日目で一過性に増加したが、TCDD 曝露はこれらのサイトカイン産生の増加を有意に抑制することが明らかとなり（図 10b、c、d）、TCDD による Th2 細胞由来サイトカイン産生の抑制が抗体産生の低下の原因となっていることが示唆された。これらのサイトカインの中で IL-5 が特に著明に抑制されていたことから、次に IL-5 産生量に対する TCDD の濃度依存性について調べた。その結果、IL-5 産生量は TCDD 1 μg/kg から濃度依存的に有意に抑制された（図 11b）。一方、OVA 特異的 IgG1 は TCDD 5 μg/kg から有意に抑制されたことから（図 11a）、一次免疫反応での IL-5 産生量は TCDD に対して抗体産生より感受性が高く、TCDD による免疫毒性を評価する上で良い指標となると思われた。最後に TCDD 曝露によるサイトカイン産生の抑制がどの細胞が影響を受けた結果によるのかを調べた。脾臓細胞には T 細胞以外に、抗原提示機能を有する B 細胞、樹状細胞、マクロファージなどの non-T 細胞が含まれている。T 細胞がサイトカインを産生するには抗原提示細胞による抗原提示が必要であり、T 細胞が TCDD の影響を受けてサイトカイン産生が抑制される以外にも、抗原提示細胞の機能が抑制され T 細胞への抗原提示が低下していることも考えられる。そこで、対照群および TCDD 曝露群の脾臓細胞中の non-T 細胞を抗 Mac1 抗体および抗 B220 抗体、マイクロビーズ標識の抗イムノグロブリン抗体で標識後、マグネットカラムを用いて T

細胞と non-T 細胞を分離した（図 12a）。対照群と TCDD 曝露群の T 細胞と non-T 細胞をそれぞれ組み合わせで脾臓細胞と同じ割合になるように再構成し、IL-5 産生量を指標として TCDD の標的細胞を調べた。その結果、TCDD 曝露群の T 細胞を用いて再構成した場合に IL-5 産生量が著明に抑制され、主に T 細胞が TCDD によって影響を受けてサイトカイン産生が抑制されることが明らかになった（図 12b）。以上の結果から、TCDD はマウス一次免疫反応において T 細胞を標的細胞としてその機能に影響を与えて Th2 細胞由来サイトカイン産生を抑制し、抗体産生を低下させることが示唆された。また、この TCDD による Th2 細胞由来サイトカイン産生の抑制には T 細胞の活性化および増殖の減弱が関与することが示唆された。

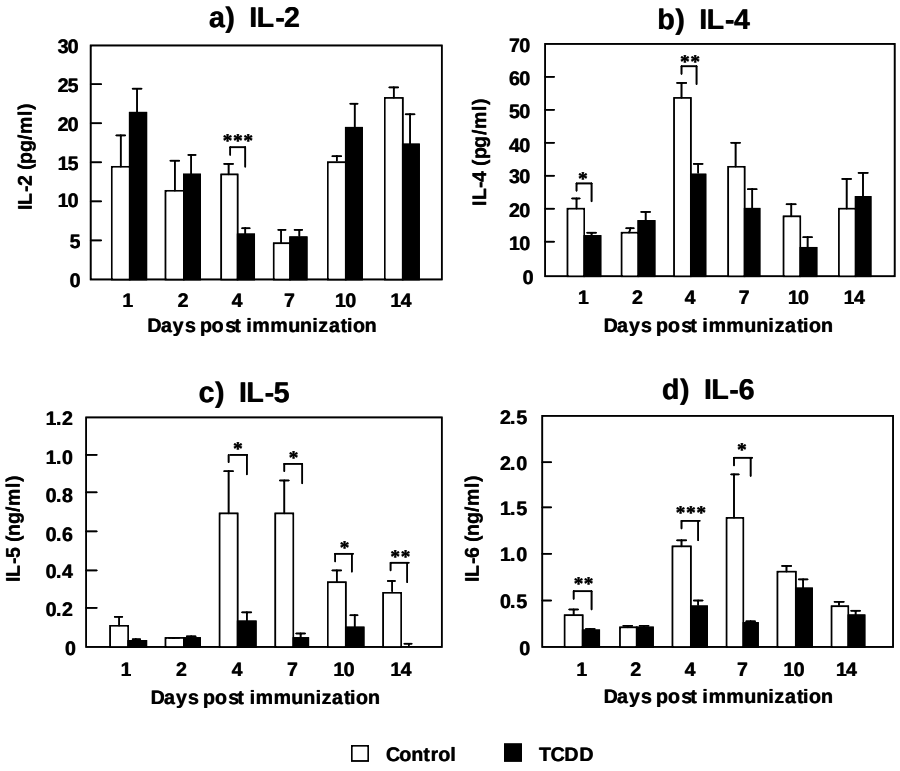


図 10. TCDD 曝露による一次免疫反応での T 細胞由来サイトカイン産生の抑制

TCDD（20 μg/kg）またはコーンオイルを C57BL/6N マウスに投与し、同時に OVA/alum で免疫した。免疫 1 日目から 14 日目までの各時期において脾臓細胞を調製し、2 日間培養後の上清中の各種サイトカイン濃度を ELISA 法で測定した。

*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001

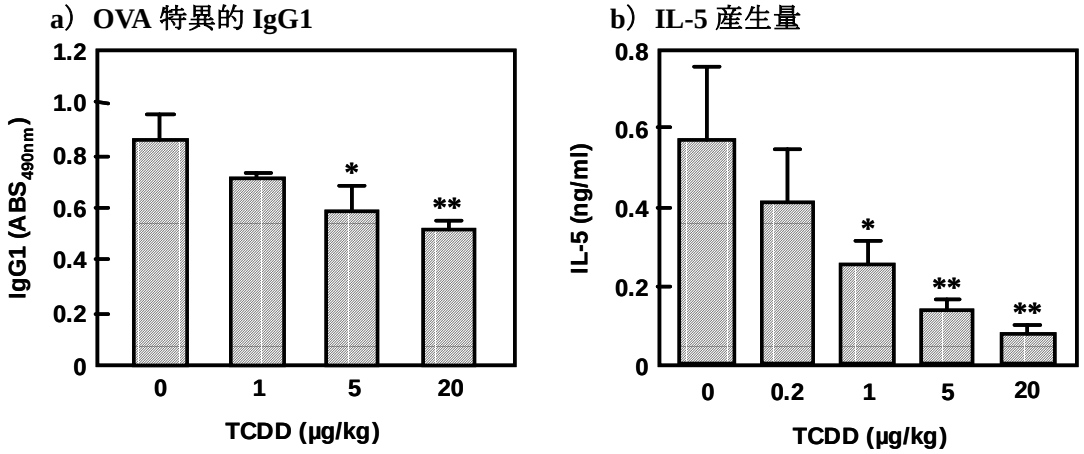


図 11. OVA 特異的 IgG1 量および IL-5 産生量に対する TCDD 濃度依存的な影響

0.2 から 20 μg/kg までの各濃度の TCDD またはコーンオイルを C57BL/6N マウスに投与し、同時に OVA/alum で免疫した。TCDD 濃度依存的な影響の解析は免疫 10 日目に行った。a）血液から血漿を調製し、OVA 特異的 IgG1 量を ELISA 法で測定した。b）脾臓細胞を調製し、2 日間培養後の上清中の IL-5 濃度を ELISA 法で測定した。

Mean ± S.E.(n=4 or 5)、*p<0.05、**p<0.01 対 0（対照群）

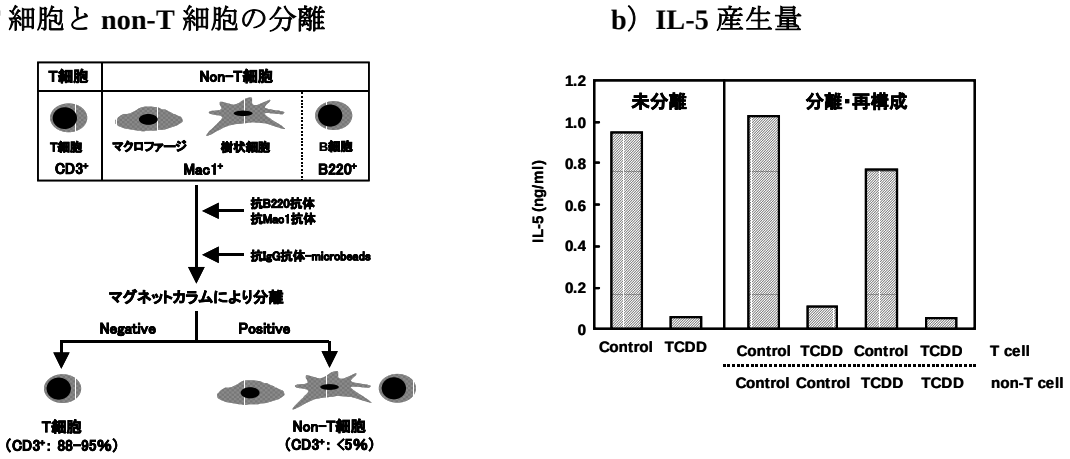


図 12. TCDD の標的細胞の検出（TCDD は T 細胞に影響を与えてサイトカイン産生を抑制する

TCDD（20 μg/kg）またはコーンオイルを C57BL/6N マウスに投与し、同時に OVA/alum で免疫した。TCDD の標的細胞の検出は免疫 7 日目に行った。a）TCDD 曝露群および対照群マウスから調製した脾臓細胞中の non-T 細胞を抗 Mac1 抗体および抗 B220 抗体、マイクロビーズ標識の抗イムノグロブリン抗体で標識後、マグネットカラムにより T 細胞と non-T 細胞を分離した。b）それぞれの組み合わせで脾臓細胞を再構成し、2 日間培養後の上清中の各種サイトカイン濃度を ELISA 法で測定した。IL-5 産生量は TCDD 曝露群の T 細胞を用いて再構成した時に著明に抑制された。

(2) 研究成果の今後期待される効果

Lundberg ら（1992）や Shepherd ら（2000）の報告と同様に、OVA 免疫したマウスでの T 細胞由来のサイトカイン産生が TCDD 曝露により抑制される結果が得られた。更に本実験結果からは T 細胞が TCDD の標的細胞であり、TCDD により T 細胞の一次免疫反応初期の活性化、増殖反応を抑制していることを示唆するデータが得られた。また、本実験系において、IL-5 産生量が抗体産生よりも TCDD に対して非常に感受性が高い

ことが示され、IL-5 産生量を指標として様々な化学物質の免疫毒性を評価することが期待できる。

2-3. TCDD に対する T 細胞の反応性の検討（野原）

(1)研究内容および成果

TCDD が未成熟 T 細胞の集団である胸腺細胞に直接影響を及ぼすことはこれまでの研究で報告されていた。これに対して、細胞株を用いた実験から成熟した T 細胞の Ah レセプター（AhR）には xenobiotic response element (XRE)に対する結合活性がないことが報告され、TCDD による AhR 依存的な免疫抑制において T 細胞は TCDD の直接の標的とならないと考えられていた。一方我々の実験結果では、TCDD が OVA 免疫したマウスにおいて T 細胞の産生するサイトカインである IL-2 や IL-4、IL-5 の産生を顕著に抑制することが明らかとなり、これらが TCDD による抗体産生抑制の原因となっている可能性が考えられた。そこで正常な T 細胞（初代培養細胞）においても TCDD は AhR 依存的な遺伝子誘導を起こさないかどうかを確認するため、CYP1A1 の誘導を指標に T 細胞の TCDD 反応性を B 細胞と比較検討した。

C57BL/6 マウスから、成熟 T 細胞および成熟 B 細胞を含む脾臓細胞と、未成熟 T 細胞の集団である胸腺細胞を調製し、それぞれ TCDD 存在下培養したところ、どちらの細胞群でも CYP1A1 の発現が確認され、その発現は 4 時間で最大となり、その後 24 時間まで緩やかに減少した（図 13）。この時、AhR、ARNT mRNA の発現量には変化がなかった。脾臓から調製した T 細胞と B 細胞を TCDD 存在下培養したところ、いずれの細胞でも CYP1A1 の発現が確認され、同様の経時的変化を示すことが明らかとなった（図 14）。また脾臓細胞および T 細胞の CYP1A1 の発現は、0.1 nM 以上で誘導されることが明らかとなった（図 15）。さらに CYP1A1 mRNA の誘導は 20 μg TCDD/kg を投与したマウスの脾臓 T 細胞でも確認された（図 16）。

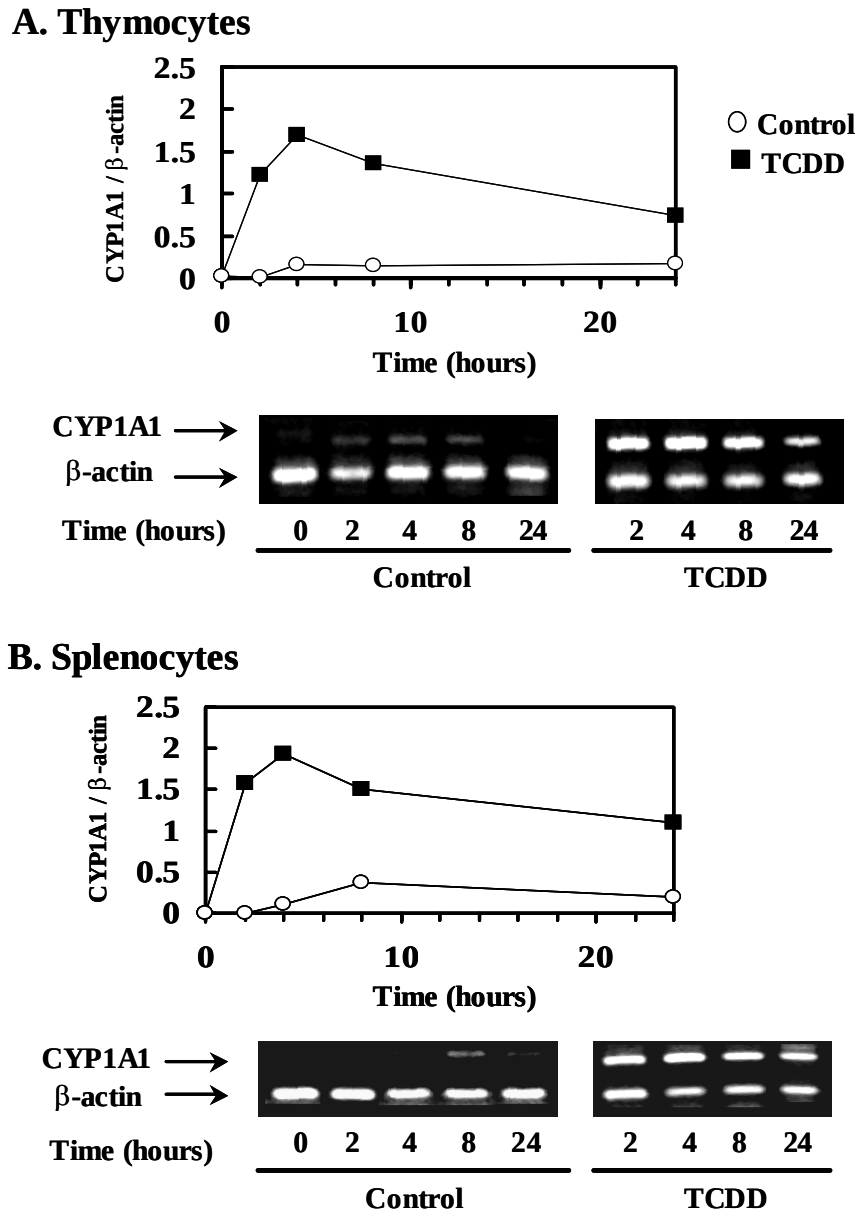


図 13. 胸腺細胞および脾臓細胞における CYP1A1 mRNA の発現
10nM TCDD 存在下（■）または非存在下（○）培養した胸腺細胞（A）または脾臓細胞（B）における CYP1A1 mRNA の発現を、β-アクチンを内部標準として RT-PCR 法で測定した。

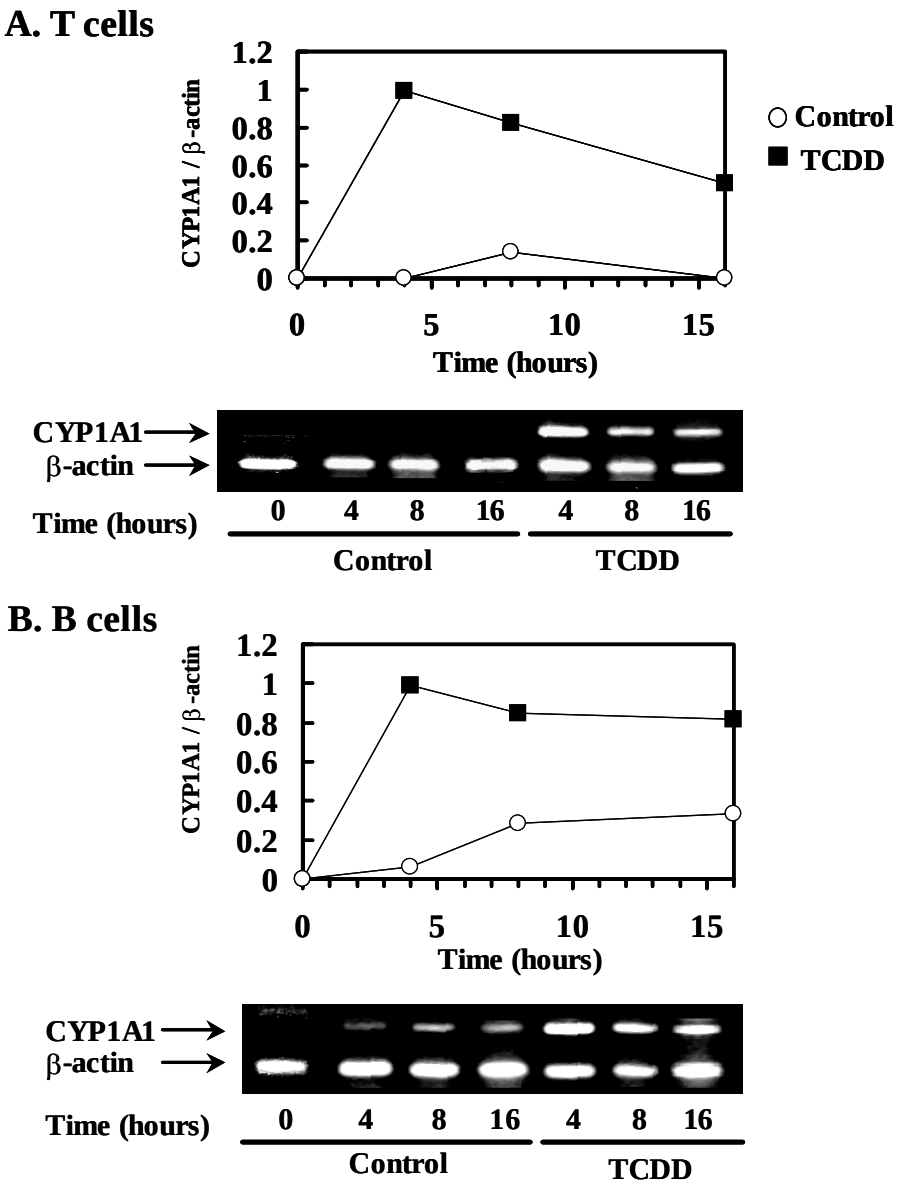


図 14. 脾臓より単離した T 細胞および B 細胞における CYP1A1 mRNA の発現

脾臓より単離したＴ細胞（Ａ）またはＢ細胞（Ｂ）における CYP1A1 mRNA の発現。測定は図 13 と同様に行った。

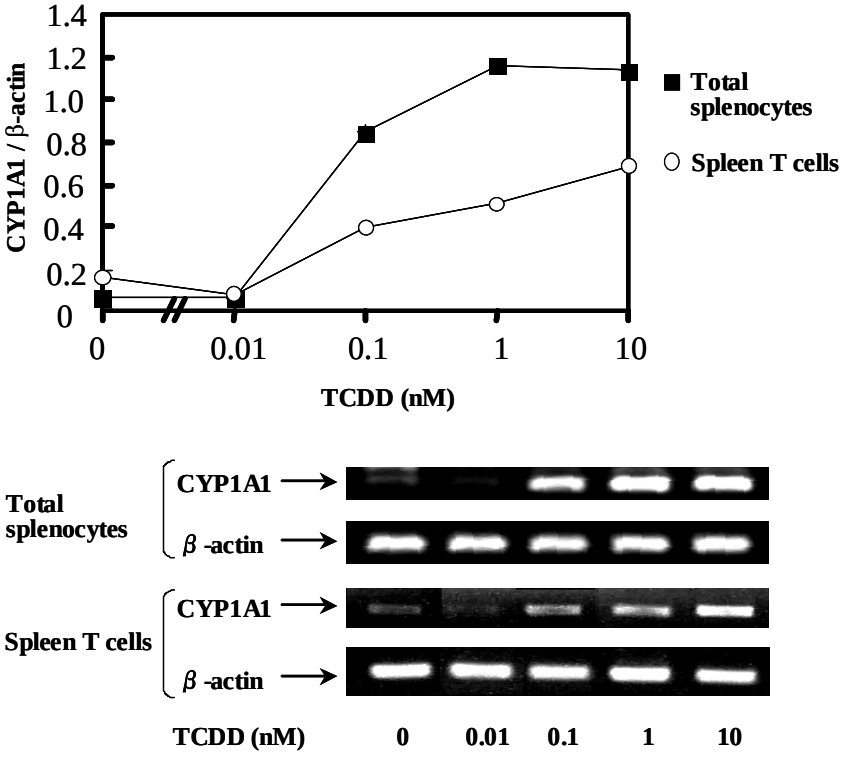


図 15. TCDD による CYP1A1 発現誘導の用量依存性

脾臓細胞または脾臓から単離したＴ細胞を 0 - 10 nM TCDD 存在下培養し、図 13 と同様に CYP1A1 mRNA の測定を行った。

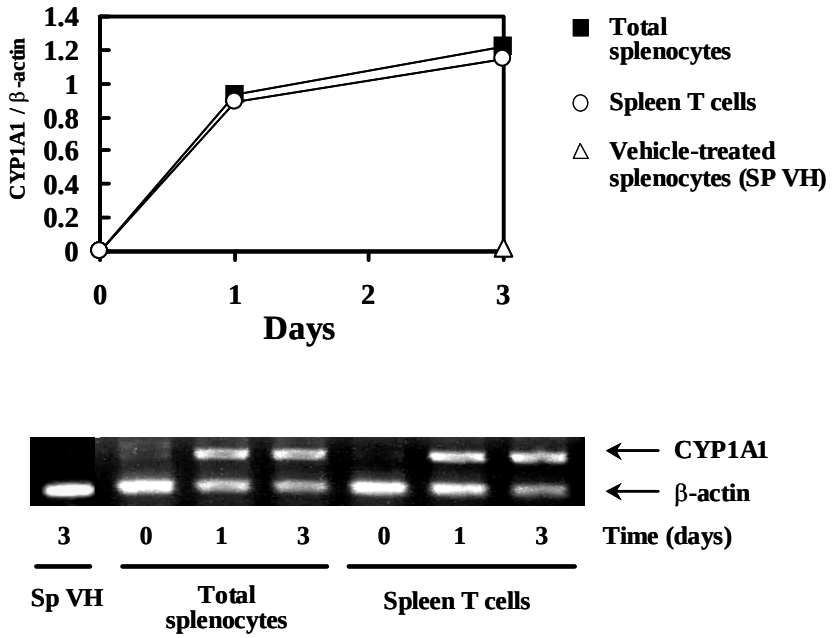


図 16. TCDD 曝露したマウスから単離した T 細胞における CYP1A1 mRNA の発現

マウスに 20 μg/kg の TCDD を一回経口投与し、1 または 3 日後に脾臓細胞または脾臓からのＴ細胞を調製し、図 13 と同様に CYP1A1 mRNA の測定を行った。

以上の結果からＴ細胞においても TCDD 曝露によって AhR 依存的な遺伝子誘導が起

こることが明らかとなり、TCDD による免疫抑制において T 細胞が TCDD の直接の標的となりうることが示された。

(2) 研究成果の今後期待される効果

これまで、TCDD による免疫抑制においては T 細胞が標的細胞のひとつであることが示唆されていたが、細胞株を用いた実験から成熟 T 細胞は機能的な AhR を持たないことが報告され、TCDD が T 細胞にどのように影響を及ぼすのかは不明であった。正常な T 細胞は機能的な AhR を有するという本研究の結果は、TCDD による免疫抑制のメカニズムの理解の貢献するものである。

2-4. AhR の活性化が T 細胞の増殖に及ぼす影響（伊藤、野原）

(1)研究内容および成果

2-2 の結果から T 細胞が TCDD の標的細胞であり、TCDD が直接的に T 細胞に作用していることが示唆された。これまで報告されている T 細胞に対する直接的な TCDD の影響については、多くの株化 T 細胞が AhR を欠損していることや AhR の反応性が低下していることから、AhR 非依存的な作用についてが殆どである。しかし、TCDD による抗体産生抑制は AhR 欠損マウスでは見られないこと、2-3 で示されたようにマウス初代培養 T 細胞は AhR 依存的な TCDD 反応性を持つこと、T 細胞での AhR の発現が TCDD による免疫毒性の発現に必要であることが報告がされていることから、TCDD は T 細胞の AhR 活性化を介して免疫毒性を誘導すると考えられる。そこで T 細胞における活性化 AhR の影響を検討した。実験にはヒト T 細胞株である Jurkat T 細胞を用いた。Jurkat T 細胞は AhR を欠損しているため、AhR の活性化型変異体である constitutively active-AhR（CA-AhR）を発現させた（CA-AhR cDNA は筑波大学 TARA センターの藤井義明教授よりご供与いただいた）。Green fluorescent protein（GFP）を融合させた CA-AhR（CA-AhR-GFP、図 17）または GFP のみの発現 vector を Jurkat T 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションから 2 日後に GFP を指標として発現 vector が導入されている細胞を FACSVantage SE で分取し、98～99%の GFP 陽性細胞を得た。CA-AhR-GFP を発現させた Jurkat T 細胞では、AhR の活性化によって遺伝子発現が誘導されることが知られている CYP1A1 の mRNA 発現が誘導されることが確認された。分取後の CA-AhR-GFP あるいは GFP のみを発現させた Jurkat T 細胞を培養したところ、GFP のみの発現に比べて CA-AhR-GFP を発現させた Jurkat T 細胞では増殖が著しく抑制された。そこで propidium iodide 染色による細胞周期の測定を行った。その結果、GFP のみを発現させた細胞に比べ CA-AhR-GFP を発現させた細胞ではトランスフェクション 2 日後では変化はなかったが、3、4 日後と経つにつれて G1 期の割合が増加し S 期の割合が低下した。またアポトーシス細胞のマーカーである annexin V 染色によるアポトーシスの測定を行った結果、トランスフェクション 2 日後から CA-AhR-GFP を発現させた細胞で annexin V 陽性のアポトーシス細胞の割合が増加していた。これらの結果から、CA-AhR は Jurkat T 細胞の細胞周期の G1 期から S 期への進行の抑制、およびアポトーシスによる細胞死の両方を誘導することにより細胞増殖を抑制することが示唆された。2-2 で示唆された TCDD 曝露によるマウス一次免疫反応での T 細胞活性化、増殖の抑制が *in vitro* での CA-AhR-GFP 発現 Jurkat T 細胞でも同様に見られたことから、本実験系は *in vivo* での T 細胞への TCDD の作用を再現しており、TCDD は T 細胞の AhR 活性化を介して T 細胞の増殖を抑制し、それによりサイトカイン産生の低下を引き起こして抗体産生を抑制するメカニズムが考えられた。（投稿準備中）

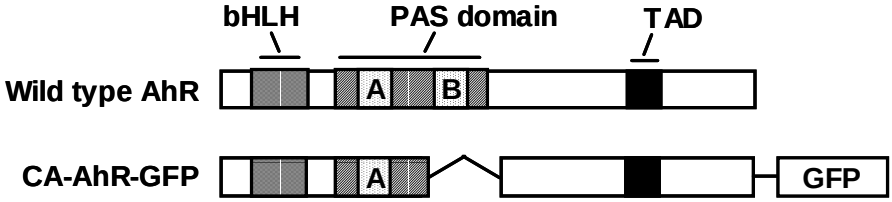


図 17. AhR および CA-AhR-GFP の構造
CA-AhR は AhR のリガンドや分子シャペロンである heat shock protein 90 との結合部位である PAS B 領域を欠損させた変異体で、リガンド非存在下でも核内に移行し転写を誘導することができる。

(2) 研究成果の今後期待される効果

これまで T 細胞への影響については Hossain ら（1998）や Park ら（2003）のように AhR 非依存的な報告が中心であり、AhR 依存的な影響については不明であったが、本実験で AhR の活性化が T 細胞の増殖を抑制することを明らかにすることができた。AhR ノックアウトマウスでは TCDD による免疫抑制が見られないことからも、AhR による T 細胞への影響を調べた本知見は重要であると考えられる。TCDD による免疫毒性の原因遺伝子については不明であるので、今後、この系でジーンチップ解析による変動遺伝子の網羅的検索による原因遺伝子の解明が期待できる。また、詳細なメカニズムを解明することにより、TCDD による免疫毒性のリスク評価に貢献できると期待できる。

2-5. T 細胞特異的恒常的活性化型 AhR トランスジェニックマウスの作製（野原）

(1)研究内容および成果

TCDD 曝露によって抗体産生が抑制されることが知られているが、私達のこれまでの研究結果から、TCDD は B 細胞が抗体産生細胞に分化する際に必須の働きをする T 細胞の活性化を抑制することによって、間接的に抗体産生を抑制することが示唆されている。そこで T 細胞における AhR の活性化が免疫抑制の原因であるかどうかを明らかにするために、TCDD の有無に関わらず活性化している constitutively active AhR (CA-AhR) を CD2 プロモーターを用いて T 細胞特異的に発現させたトランスジェニック（Tg）マウスを作製した。CA-AhR は、リガンド結合部位の一部を欠失し、リガンド非存在下でも核へ送られ転写活性化能を持つ変異体を、藤井義明先生よりご供与いただいた。

C57BL/6 マウスと DBA/2 マウスを交配させて得た受精卵に、VA CD2-CA-AhR および VA CD2-GFP を co-injection し、これらの遺伝子を発現している F1 マウスを得た。得られたマウスは C57BL/6 マウスと戻し交配を行った。このマウスでは、期待どおり胸腺および脾臓で CA-AhR の発現、および AhR 依存的に誘導される CYP1A1 の発現が確認された。さらに GFP を指標としたセルソーター解析で、導入した遺伝子が CD4 T 細胞および CD8 T 細胞で発現し、B 細胞には発現していないことが確認された。このマウスの胸腺では、ダイオキシンを投与した時と同じく細胞数の減少、および CD8 single positive 細胞の比率の増加が見られ、これらが T 細胞の AhR 依存的な現象であることが明らかとなった。

今後免疫機能への影響を詳細に検討する予定である。また現在複数のラインを作製中である。

(2) 研究成果の今後期待される効果

これまでの他のグループや私たちの最近の研究結果から、TCDD による抗体産生の抑制の最初の標的細胞が T 細胞である可能性が示唆されているが、直接的な証明はされていない。本研究で作成したトランスジェニックマウスは、TCDD 曝露を受けた T 細

胞の抗体産生抑制における役割を直接証明できるモデルとして大いに期待される。さらにこのマウスは、活性化型の AhR を胎児期から持続的に T 細胞に発現しており、TCDD の経胎盤・経母乳曝露や持続的曝露のモデルマウスとなることが期待される。

2-6. TCDD の経胎盤・経母乳曝露による免疫反応への影響（井上、野原）

(1)研究内容および成果

マウスの免疫反応に対して、TCDD の直接曝露が抗体産生をはじめとする種々の免疫反応を抑制することが良く知られている。また Th2 型サイトカインである IL-4 や IL-5 の産生も TCDD 曝露により抑制されることから、サイトカイン産生の抑制が抗体産生の抑制に至ると考えられている。しかしながら、TCDD を経胎盤・経母乳曝露した場合の抗体産生能への影響は十分に調べられていない。特に IgE 産生に関しては、アレルギー反応に関与する重要な抗体であるにも関わらず、全く調べられていない。そこで本研究では、母体マウスに TCDD を曝露した場合の、仔の IgE 産生への影響、および IgE 産生に関与する Th2 型サイトカイン産生への影響を解析した。

C57BL/6N の雌マウスを雄と交配し、膣栓確認した日を妊娠 0.5 日とした。妊娠 12.5 日に TCDD を 0.3、1 もしくは 3 μg/kg 単回経口投与し、対照群にはコーン油を投与した。仔マウスを生後 20 日で離乳し、翌日マウスに alum をアジュバントに 100 μg の卵白アルブミン（OVA）を腹腔内投与して免疫した。免疫 7 日後に脾臓重量を測定し、脾臓細胞を調製した。脾臓細胞を抗 CD3 抗体および抗 B220 抗体で染色し、亜集団をフローサイトメトリーで解析した。また脾臓細胞を OVA 存在下で培養し、2 日後の上清に含まれる Th2 型サイトカイン量を ELISA 法により測定した。免疫 14 日後では血漿を調製し、抗 OVAIgE 価を ELISA 法により測定した。また脾臓細胞を調製し、亜集団をフローサイトメトリーで解析した。

雌性マウスの場合、体重、体重あたりの脾臓重量、脾臓細胞数および脾臓亜集団共に TCDD 曝露による影響は認められなかった。Th2 型サイトカインに及ぼす TCDD 曝露の影響を解析した結果、対照群と比較して 1 μg/kg の TCDD 曝露群で IL-4 産生量が有意に増加した。また IL-5 産生量も 1 μg/kg の TCDD 曝露群で増加の傾向が認められた。さらに 1 μg/kg の TCDD 曝露群では、抗 OVAIgE 価が対照群よりも有意に増加することが認められた。一方、雄性マウスの場合、TCDD 曝露による Th2 型サイトカイン産生への影響、および OVA 特異的 IgE 産生への影響は認められなかった。以上の結果から、TCDD の経胎盤・経母乳曝露により、雌性マウスの IL-4 および IgE 産生が昂進することが明らかとなった。また、TCDD の経胎盤・経母乳曝露による免疫反応への影響に雌雄差があることが示された。（投稿準備中）

(2) 研究成果の今後期待される効果

従来の研究では TCDD の直接曝露がマウスの免疫反応を抑制することがもっぱら報告されてきたが、経胎盤・経母乳で TCDD に曝露した場合は、異なるメカニズムで影響を受けることが明らかとなった。また経胎盤・経母乳で TCDD に曝露した場合に IgE 産生が昂進することから、アレルギー反応が TCDD 曝露により昂進する可能性が示唆された。今後は TCDD の作用メカニズムを明らかにすること、および実際に TCDD 曝露がアレルギー反応を昂進するのか明らかにすることが必要であると考えられる。

3.3.3 アレルギーおよび感染抵抗性に及ぼす影響

3-1. アトピー性皮膚炎自然発症マウス（NC/Nga）におけるアレルギー反応の誘導に対する TCDD の影響（藤巻）

(1)研究内容および成果

TCDD がアレルギー反応を誘導、あるいは増悪するか否かを検討するため、OVA で免疫した NC/Nga マウスと免疫なしの NC/Nga マウスに TCDD を経口投与し、免疫したマウスへは OVA 追加免疫を行った。その後、血中の IgE, IgG1 抗体価、免疫臓器のリンパ球亜集団の変動、サイトカイン産生等について測定した。その結果、TCDD 投与のみで NC/Nga マウスにアトピー性皮膚炎様症状は誘導されなかった。次ぎに、OVA 免疫したマウスでも TCDD 投与によるアトピー性皮膚炎様症状の誘導はみられなかった。しかしながら、免疫したマウスの脾臓細胞からの Th2 タイプのサイトカインであるインターロイキン(IL)- 4 と IL-5 産生は低下し、血漿中の抗原特異的 IgE 抗体価の低下も観察された。

次ぎに、アトピー性皮膚炎様症状を誘導した NC/Nga マウスに TCDD を投与して、その増悪作用の有無について検討した。Picryl chloride (PC)の背皮への投与によりアトピー性皮膚炎様症状を前もって誘導した NC/Nga マウスに 0, 5 と 20 μg/kg 体重の TCDD を投与して、皮膚炎の発症増悪、総 IgE 値、リンパ球の増殖反応への影響について検討した。血漿中の総 IgE 抗体価においては TCDD の影響はみられなかった。脾臓細胞における B リンパ球の割合の増加、LPS と PHA 刺激に対する増殖反応の亢進、IFN-γ 産生の増加が TCDD 投与により認められた。皮膚での炎症反応においては、PC を塗布した背皮での TCDD 濃度に依存した肥厚、炎症性細胞の浸潤がみられ、耳介でも弱いながらも同様な反応が観察された。同時に、トルイジンブルー染色による肥満細胞の数においても、真皮における細胞の増加が顕著であった。これらのことから、TCDD の経口投与で IgE 産生系の亢進はみられないが、IgE 抗体に依存せずに皮膚炎の炎症反応を増悪する可能性が示唆された。

(2) 研究成果の今後期待される効果

我々の OVA 感作によるアレルギーモデルマウスへの TCDD 投与による IgE 産生の抑制は、やはり強力なアレルゲンであるダニ抗原を用いた Luebke ら(2001)の報告でも認められ、TCDD 曝露は IgE 産生系の経路へは抑制的に働くことが示唆された。しかしながら、我々の後半部分でみられたアトピー-性皮膚炎様症状の増悪は、TCDD が別の免疫系経路に作用する可能性を示唆しており、今後の展開に期待が大きい。

3-2. 低用量 TCDD 曝露が感染抵抗性に及ぼす影響（野原）

(1)研究内容および成果

先に Burleson らは、10‐100 ng/kg の TCDD の単回経口投与が、B6C3F1 マウス(雌)のインフルエンザウイルス感染による死亡率を高めることを報告した (Fundam. Appl. Toxicol. 29, 40, 1996)。これは従来報告されている TCDD の健康影響の中で最低用量の結果であり、その結果は 1998 年の WHO による TCDD の耐容一日摂取量（TDI）の見直しの際にも取り上げられたものの、用量依存性が見られないなどの理由で TDI の設定には採用されなかった。我々はこの結果を重要と考え、Burleson らの研究の追試を行った。またマウスの系統による感受性の違いを明らかにするために、B6C3F1、C57Bl/6、BALB/C および DBA/2 マウスの雌雄について、Burleson らと同じプロトコールで TCDD およびインフルエンザウイルスを投与し、死亡率を観察した。すなわち、0、５、20、100 または 500 ng/kg の TCDD を一回経口投与し、1 週間後に約 30％致死量のインフルエンザウイルス(A/PR/8/34)を経鼻投与し、その後 20 日間死亡率の変化を調べた。

その結果、いずれの系統においても 500 ng/kg までの用量で TCDD による明らかな死亡率の増加は認められなかった（図 18,19）。このことから、感染抵抗性に対する TCDD の影響には未知のメカニズムが関与していることが示唆され、リスク評価のためにはさらに検討が必要と考えられた。

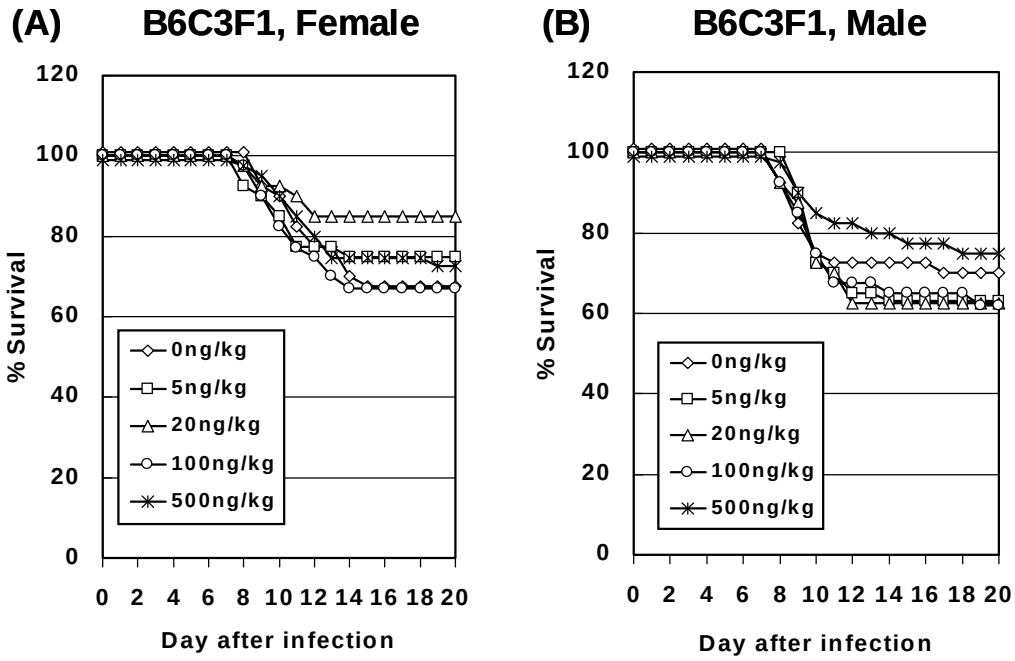


図 18. TCDD を投与し、インフルエンザＡウイルスを感染させた B6C3F1 マウスの雌（A）または雄（B）の生存率。

雌または雄の B6C3F1 マウス(n = 40 匹/群)に TCDD を経口投与し、7 日後におよそ 70%の死亡率をもたらす用量のインフルエンザウイルスを感染させ、20 日間生存率を観察した。

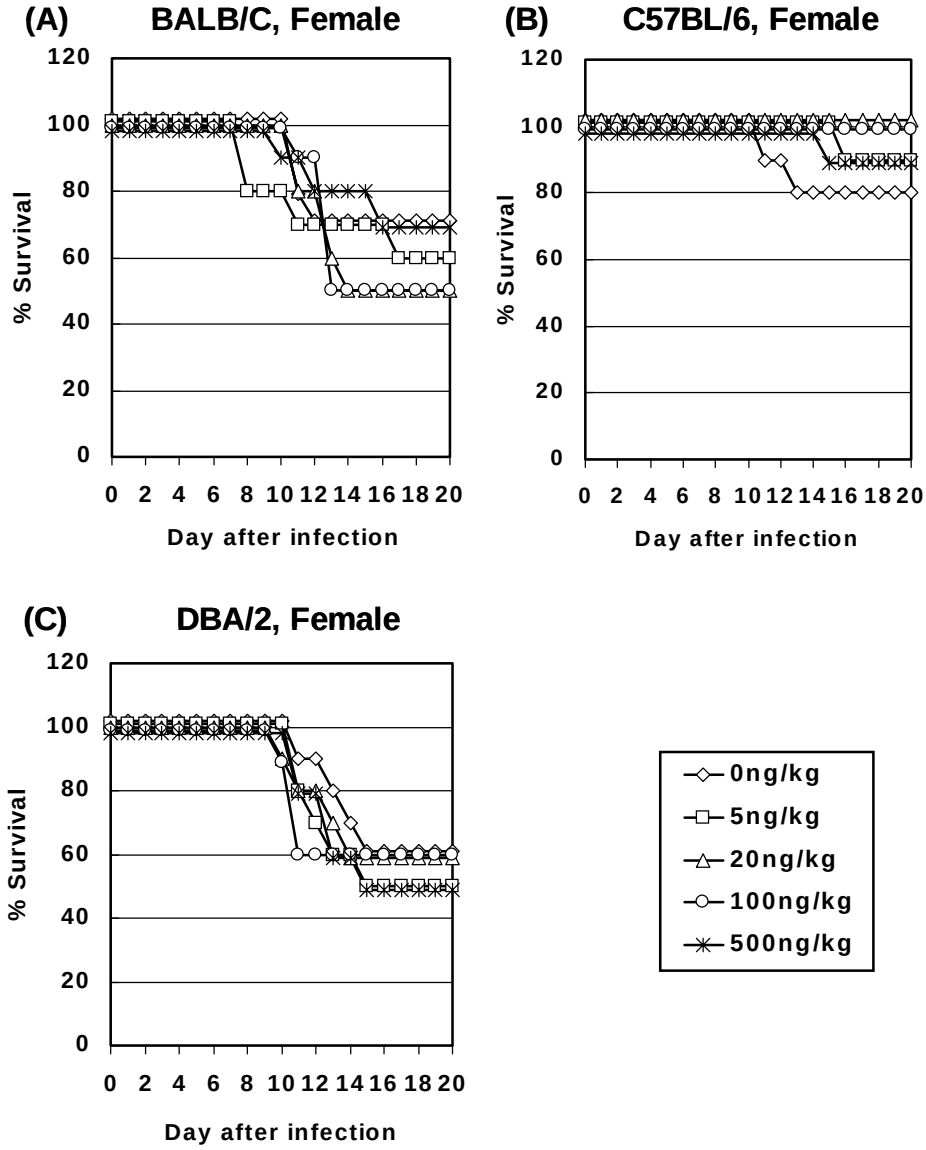


図 19. Balb/c、C57BL/6 および DBA/2 マウスの生存率

Balb/c (A), C57BL/6 (B), DBA/2 mice (C) の雌 (n = 10 匹/群)に TCDD を一回経口投与し、7 日後におよそ 70%の死亡率をもたらす用量のインフルエンザウイルスを感染させ、20 日間生存率を観察した。

(2) 研究成果の今後期待される効果

本研究は、1998 年の WHO 専門家委員会による TCDD の耐容一日摂取量（TDI）の見直しの際の議論をもとに、追試研究を行ったものである。その結果、Burleson らの結果は再現されず、彼らの研究結果を TDI の設定には採用しなかった専門家委員会の結論を支持する結果となった。しかしながら、Burleson らと我々の結果が異なったことの原因は明らかでなく、感染抵抗性に対する TCDD の影響には未知のメカニズムが関与していることが示唆された。リスク評価の精度を高めるためには、さらにメカニズムに関する研究が必要と考えられた。

3.4　リスク評価

ダイオキシンのリスク評価における量−反応関係の解析において、近年、投与量に代わり体内負荷量あるいは標的臓器中含量と、生体影響との関係を評価するようになってきている。それは、ダイオキシンの代謝が動物種によって大きく異なり、実験動物の結果をヒトに外挿する際に、投与量よりも体内負荷量が用量尺度として適当と考えられているからである。そこで、高分解能質量検出器付ガスクロマトグラフ（GC/MS）を用い、妊娠動物体内でのTCDDの臓器分布、ならびに胎仔および出生仔におけるTCDD含量を測定し、標的となる胎仔および出生仔の生体負荷量を推定した。また、ダイオキシンがどの程度の量でどのような反応、影響を及ぼしているか（量−反応関係）を明らかにするために、これまで上記の3グループの研究で得られた初期胚から新生仔におけるダイオキシンへの曝露量とその反応・影響の質的・量的関係のとりまとめを行った。

3.4.1　経胎盤・経母乳によるダイオキシンの仔への移行の解析を中心としたダイオキシン]投与動物の体内負荷量の測定（宮原）

(1)研究内容及び成果

1-1.　胎盤および母乳を介したダイオキシの母親から仔への移行

妊娠15日目の Holtzman ラットにTCDDを 0, 50, 200, 800 ng/kg-体重で単回経口投与した。母親を妊娠 16 日目と 20 日目に解剖し、血清、肝臓、脂肪、肺、脳、脾臓、腎臓、胎盤、胎仔を採取した。さらに、離乳時（生後 21 日）に母体と出生仔から試料を採取した。得られた試料中の TCDD 含量は、高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)を用いて測定した。

表 1.　妊娠 16 日目の母親組織および胎仔中の TCDD 濃度

	Dose (ng TCDD / kg BW)			
	0	50	200	800
Serum	N.D.	23.3	76.3	221
Liver	N.D.	264	1045	8136
Fat	0.15	83.3	314	1266
Lung	-	59.2	200	860
Brain	-	8.27	37.1	148
Spleen	-	30.3	75.1	360
Kidney	-	25.0	80.8	513
Placenta	N.D.	12.6	53.1	135
Fetuses	N.D.	7.89±1.38	33.4±3.37	90.3±21.7

pgTCDD/wet-g

表 2.　妊娠 20 日の母親組織および胎仔中の TCDD 濃度

	Dose (ng TCDD / kg BW)			
	0	50	200	800
Serum	0.21	5.65	24.8	145
Liver	0.11	39.8	448	4530
Fat	0.11	199	487	2180
Lung	-	20.6	81.6	420
Brain	-	3.39	12.3	43.7
Spleen	-	7.56	29.7	104
Kidney	-	10.6	58.4	305
Placenta	N.D.	11.6	14.3	114
Fetuses	0.04	5.25±0.28	14.6±3.45	51.5±11.0

pgTCDD/wet-g

妊娠 16 日目（投与 1 日後）、20 日目（投与 5 日後）ともに、どの臓器においても用量依存的に TCDD 濃度は増加し、脂肪を除き経時的に TCDD 濃度は減少した（表 1、2）。臓器中 TCDD 濃度は、とくに肝臓で高く、次いで脂肪、肺、腎臓の順であった。また、用量が高いほど肝／脂肪比は大きくなり、肝臓への蓄積傾向が高まることが確認された。一方、50 ng/kg-体重投与群において、その胎仔の TCDD 濃度は、妊娠 16 日目と 20 日目で、それぞれで 8 および 5 pgTCDD/wet-g であり、母親への投与量に比べ約 1 桁低かった。また、母親血清中と臓器中の TCDD 濃度は、脂肪を除き良好な相関関係が見られ、血液を介し比較的短い時間で各臓器に TCDD が分布することが明らかとなった。また、脳や胎仔の TCDD 濃度は血清中濃度よりも低く、その移行に際し何らかの障壁が存在することも示唆された。

一方、妊娠期とは異なり、離乳時の母体および仔の TCDD 濃度は、脂肪＞肝臓の順であった（表 3）。また、離乳時には仔一個体あたり母体に投与した TCDD の 4.1～4.5%が移行していることが示され、TCDD は妊娠期間よりも授乳期間に多く母乳を介し親から仔へ移行することが明らかとなった。

表 3.　生後 2 日と 21 日の仔の TCDD 濃度および一個体あたりの含量

		Dose (ng TCDD/kg-BW)		
PND		50	200	800
2	(pg/wet-g)	22.06±3.72	63.41±7.62	207.2±2.35
	(pg/whole body)	(186.9)	(510.4)	(1706)
21	(pg/wet-g)	-	70.19	256.2
	(pg/whole body)	-	(3909)	(14208)

1-2.　ダイオキシン類の親から仔への移行におけるアーリルハイドロカーボン受容体（AhR）の関与

AhR(+/-)マウスどうしを掛け合わせ、妊娠 12.5 日の雌マウスに 1 μg/kg-体重の TCDD を単回経口投与した。その後、妊娠期間中の親から仔への TCDD の移行を観察するため、親マウスを妊娠 18.5 日目に解剖し、親の臓器とともに、胎盤、胎仔を採取した。一方、授乳による TCDD の親から仔への移行を観察するため、離乳時である生後 21 日目の仔を解剖し、その脂肪組織、肝臓および腎臓を採取した。これら採取した試料について、高分解能 GC/MS を用いて、その TCDD 含量を測定した。さらに、生後 21 日目の仔の肝臓について、その CYP1A2mRNA の発現を PCR 法により測定した。

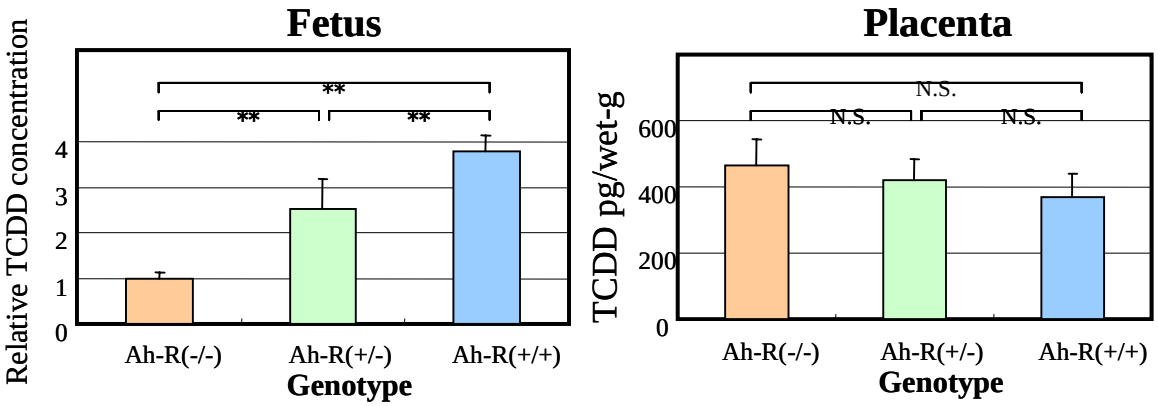


図 1　妊娠 18.5 日における TCDD の母親から仔への移行におよぼす AhR の影響
**: p<0.01, N.S.: not significant

妊娠期の親体内では TCDD は肝臓に蓄積しており、その濃度は脂肪組織中よりもはるかに高かった。胎仔の TCDD 濃度は遺伝子型により異なり、AhR(-/-)では AhR(+/-)や AhR(+/+)に比べ有意に低かったが、胎盤の TCDD 濃度は胎仔の遺伝子型による差は認められなかった（図 1)。これは TCDD の AhR との結合または、胎仔の肝臓で誘導された CYP タンパクとの結合が原因と考えられた。この時期の TCDD 胎仔負荷量の差によ

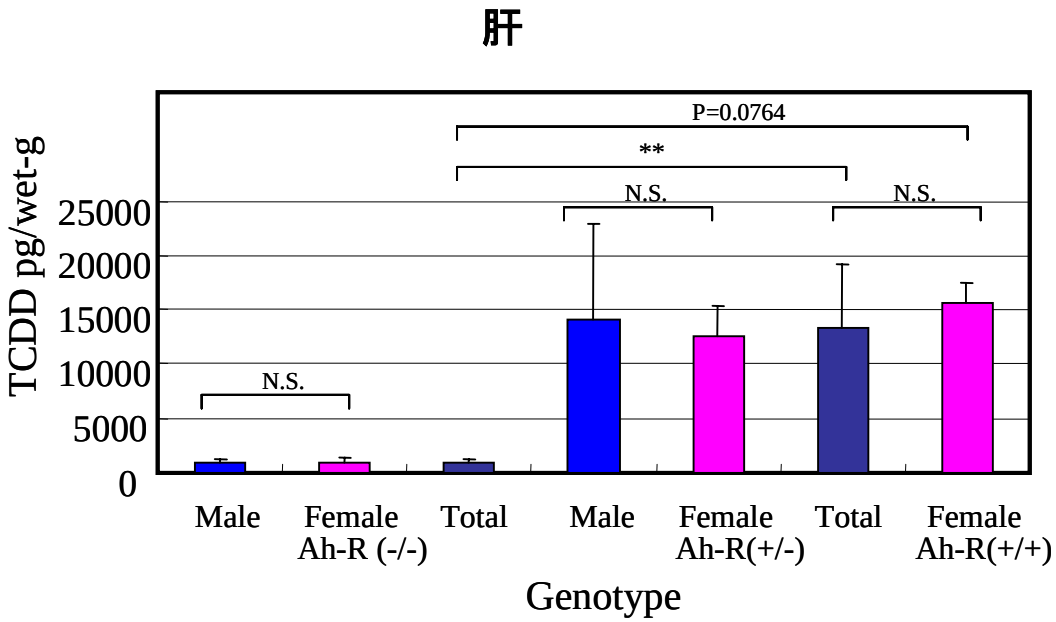


図 2　生後 21 日における TCDD の母親から仔への移行におよぼす AhR の影響(肝)
**: p<0.01, N.S.: not significant

って胎仔毒性が異なる可能性が示唆された。

一方、離乳時に遺伝子型が AhR(+/+)の仔は途中死亡のためほとんど残っていなかったため、AhR(-/-)型と AhR(+/-)型の臓器中の TCDD 濃度を比較した。AhR(+/-)型の肝臓中には、AhR(-/-)型のものに比べ、14.3 倍も高い濃度の TCDD が存在していた（図 2)。

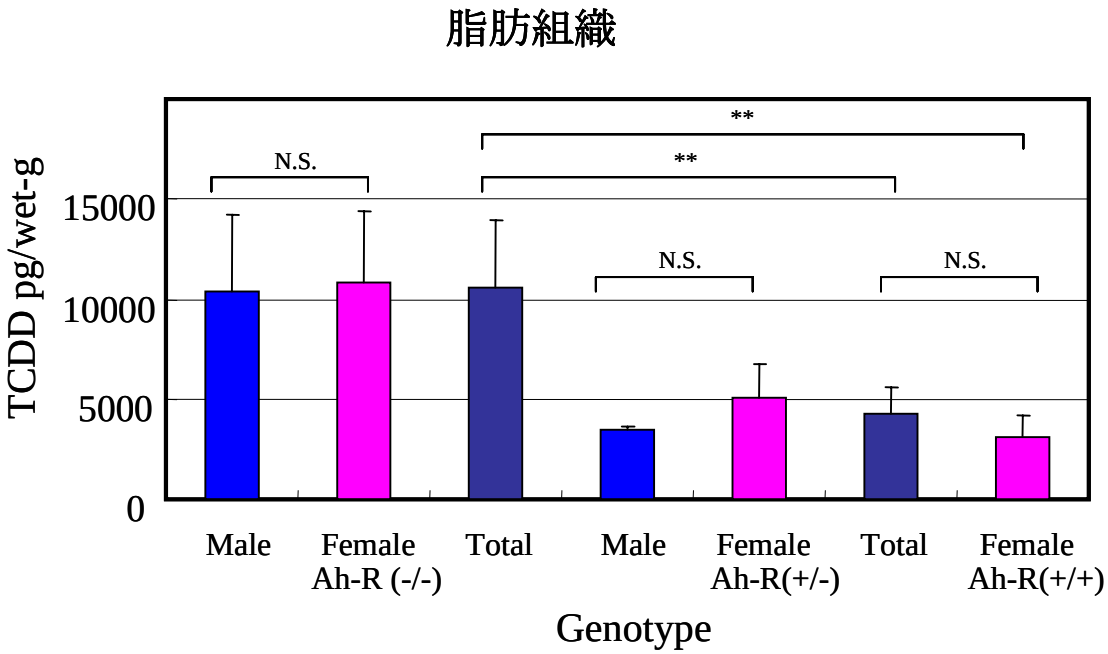


図 3　生後 21 日における TCDD の母親から仔への移行におよぼす AhR の影響(脂肪組織)
**: p<0.01,　N.S.: not significant

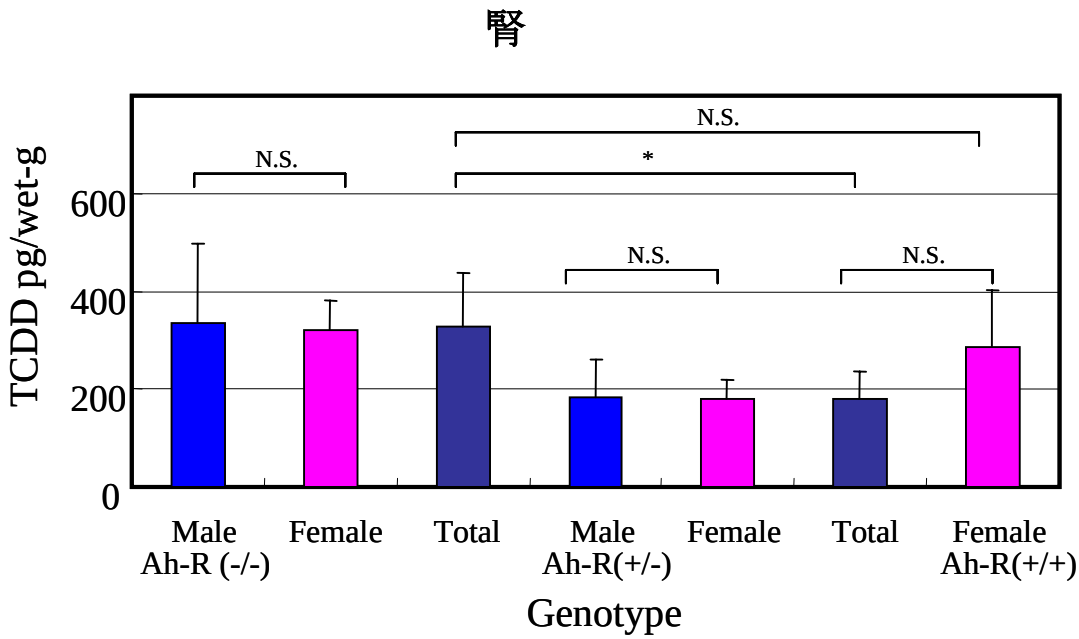


図 4　生後 21 日における TCDD の母親から仔への移行におよぼす AhR の影響(腎)
*: p<0.05,　N.S.: not significant

一方、AhR(-/-)型の脂肪組織と腎臓中には、AhR(+/-)型に比べ、それぞれ 2.5、1.8 倍

高い TCDD 濃度が検出された（図 3、4)。このように出生仔における AhR 遺伝子によ

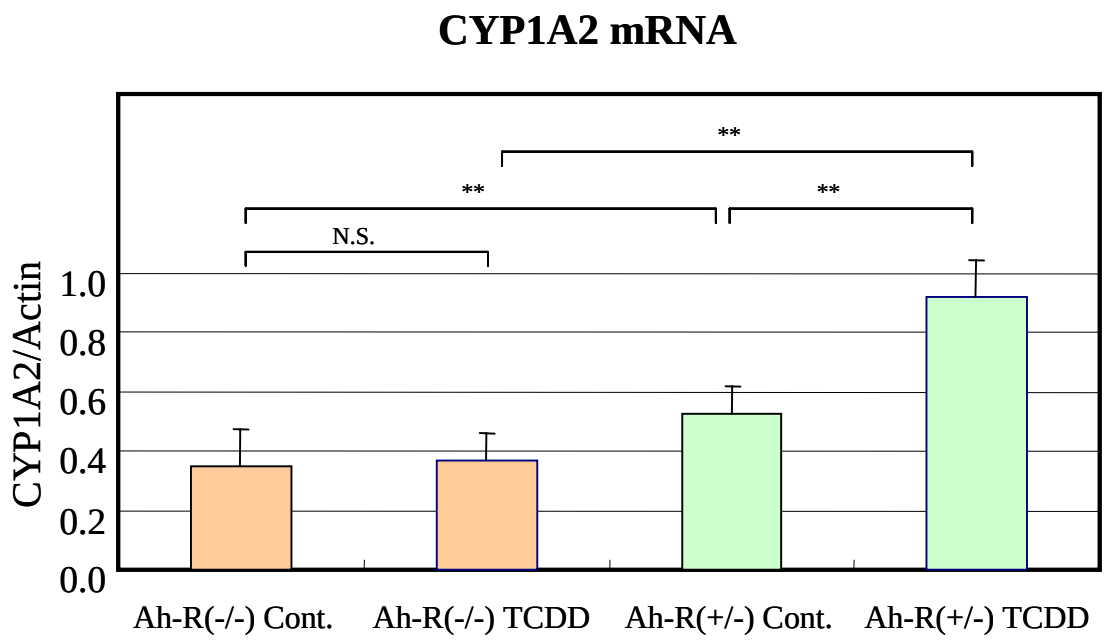


図 5　生後 21 日の仔の肝における CYP1A2 mRNA の発現におよぼす AhR の影響
**: p<0.01,　N.S.: not significant

る TCDD 体内分布の違いは顕著であり、AhR を持つ個体では TCDD が肝臓に蓄積し、他臓器の濃度は AhR を持たない個体よりも低かった。

この原因として、AhR ノックアウトマウスの肝血流量が先天的に少ないだけではなく、TCDD と強く結合すると言われている CYP1A2 の肝臓での発現が大きく関与していると考えた。事実、TCDD 曝露により AhR(+/-)では、CYP1A2mRNA の発現が肝臓で有意に増加しており（図 5)、また Diliberto ら(1999)によって CYP1A2 ノックアウトマウスでも本研究と同様な傾向が観察されていることから、上記仮説が裏付けられた。以上より、TCDD の親から仔への移行には AhR が大きく関与し、その毒性発現に影響していると考えられた。

(2) 研究成果の今後期待される効果

妊娠－授乳期のダイオキシン類の親から仔への移行に関する観察は、Hurstら（1998,2000）やLiら（1995）によってなされており、本研究とほぼ同様の結果が得られている。本測定は、同時に各種毒性影響を観察しており、リスク評価を行うための有用な知見と成り得る。

上述の通り、CYP1A2の発現がTCDDの体内蓄積や分布を決める要因であることが、そのノックアウト動物を使用することで明らかとなっている（Dilibertoら）。しかし、AhRがダイオキシン類の体内分布に関与していることを示す報告は皆無である。ダイオキシン類の毒性発現にはAhRは必須であると考えられており、本研究にと同時に行われた生体影響の結果と併せダイオキシン類の毒性発現のメカニズムの解明や、そのリスク評価が可能になると考えられる。

3.4.2　ダイオキシンへの曝露量とその反応・影響の質的・量的関係のとりまとめ（米元）

(1)研究内容及び成果

上記の各研究グループで得られた初期胚から新生仔におけるダイオキシンに対する反応・影響と脂肪中の濃度あるいは体内負荷量推定値との関係をとりまとめた。極めて低い用量で観察をされた影響指標は、前立腺におけるアンドロゲン受容体 mRNA の発現量や肛門生殖突起間距離であり、ヒトの一日摂取量の 10 倍程度で到達する体内負荷量で引き起こされることが示された。生殖発生、脳機能・行動、免疫系に係わるその他の多くの影響指標は、およそ 100 ng/kg 体重から 1000 ng/kg 体重で観察された（図 6)。

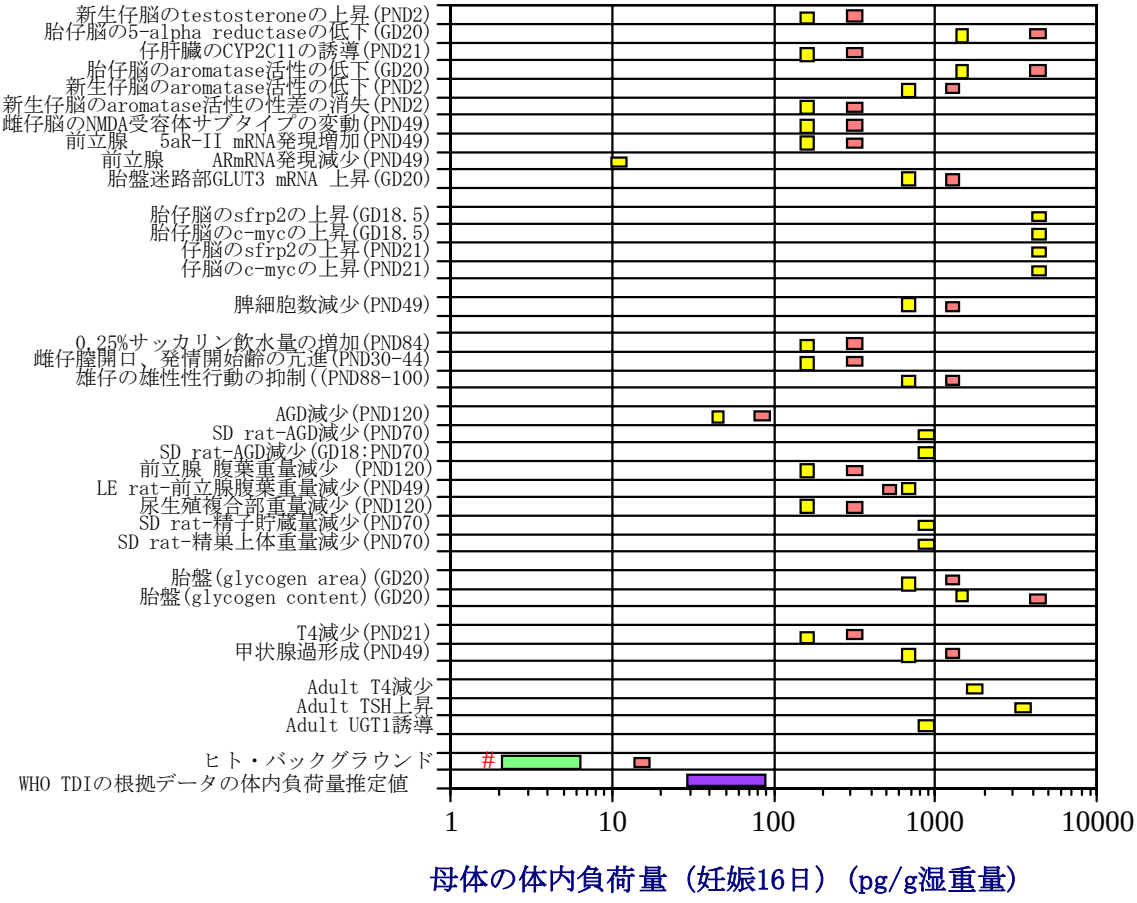


図6.　体内負荷量と各種エンドポイントの関係
■：脂肪中濃度、　■：体内負荷量推定値(用量の86%)

1998年WHOの耐容一日摂取量の根拠とされたデータの多くが妊娠期曝露による仔への影響であったように、今回の我々の研究においても、胎仔期・授乳期がTCDDに対して非常に感受性が高いことが確認された。しかしながら、今回のデータから、現行の耐容一日摂取量を強化ないし緩和を提案することは早計である。

リスク評価に今回のデータを適用するという観点からいくつかの問題点を指摘したい。第一に、今回は胎児期の特定時期に単回曝露による影響を中心に実験を行ったために、多くの所見が経胎盤・経母乳の影響であることである。観察された影響のうち、脳機能・行動や免疫機能への作用など、経胎盤の影響か経母乳の

影響なのかを、in vivoの実験で把握することが重要である。第二は、、単回曝露であって、食事からの摂取が主であるヒトの場合と異なる点である。実際、実験動物で同じ体内負荷量でも、慢性曝露の方が影響が弱く、また異なった影響指標が観察されるという報告がある。第三に、動物種差の問題は依然として大きな問題である。よく知られているように、ヒトでよく見られるクロルアクネは限られた種でしか観察されない。また、ダイオキシンによる発がんの標的臓器は種で大きく異なる。ヒトでいくつか報告のある性比への影響は、マウス、ラットで再現されていない。このように、実験動物でみられたエンドポイントをヒトのリスク評価に適用することの是非についてさらなる検討が必要である。

(2) 研究成果の今後期待される効果

用量—反応関係の解析において、用量としては、投与量の代わりに体内負荷量、あるいは標的臓器中含量を用いるようになってきている。一方、生体反応の側は、無作用量（NOAEL）または最小影響量（LOAEL）を従来用いてきた。NOAEL、LOAELは、動物実験における投与量の設定の仕方に左右されるため、Benchmark dose（用量と影響の大きさに関する実験データをあてはめた数式モデルから、あらかじめ設定した影響レベル（たとえば10%）に相当する用量を算出する手法）から、1-コンパートメントモデルを用いて対応する体内負荷量を求める方法や、PBPK（生理学的薬物動態）モデルを用いて体内負荷量を求める方法が試みられている。モデルのあてはめのためには数段階の用量設定が必要である。今回の研究では、必ずしも全ての研究においてモデルのあてはめが可能ではなかったため、LOAELを用いたが、将来的には数理的アプローチが必要であろう。

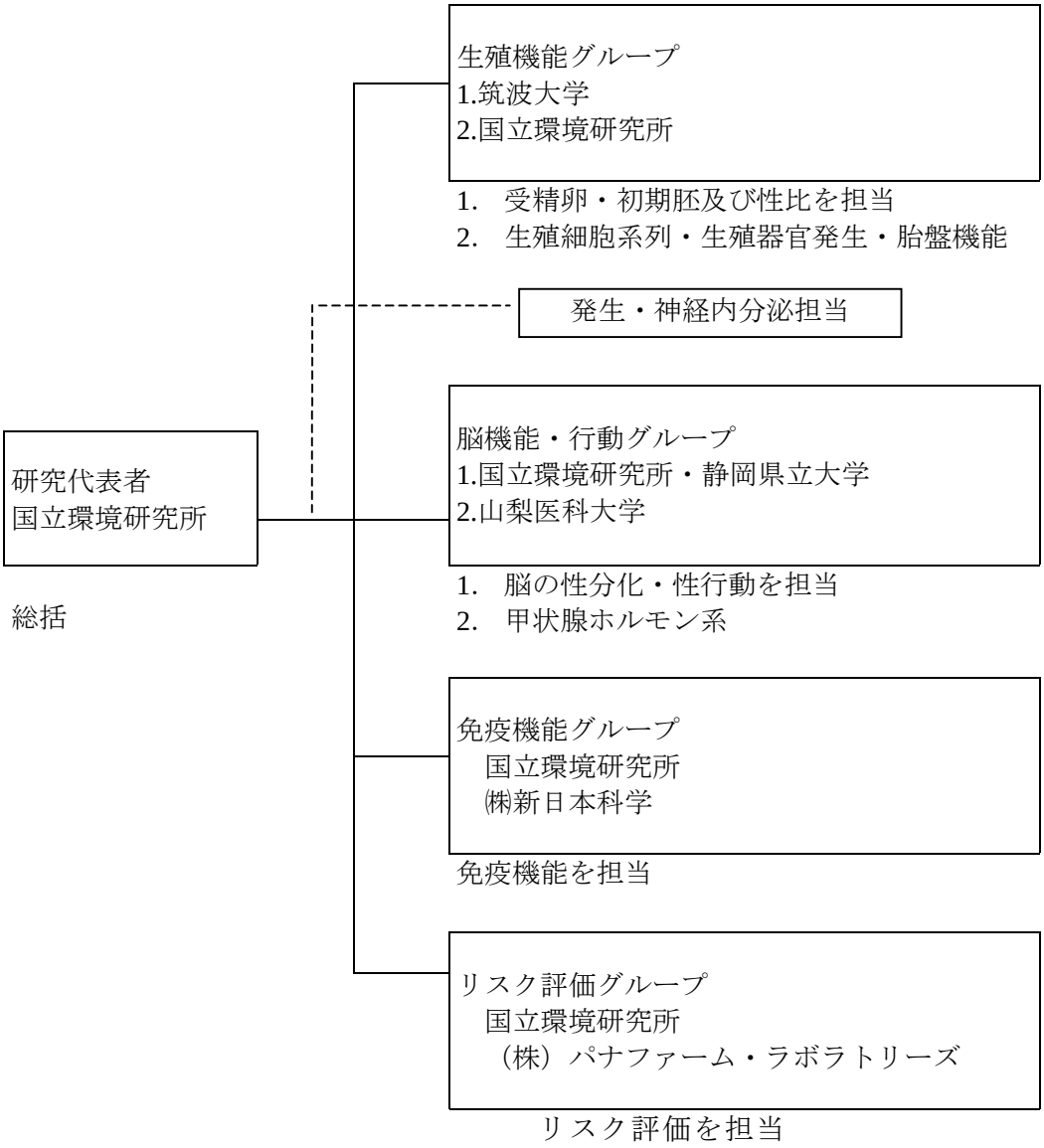
また、これらのアプローチは、用量—反応関係が単調増加するという前提に立っている。今回の我々の研究でも、必ずしも単調増加ではないエンドポイントも見いだされた。このような用量—反応関係をどのように扱うかということも今後の課題である。

現行のダイオキシン類のリスク評価は、AhRに依存した影響に基づく毒性等価係数（TEF）概念を用いている。コプラナーPCBの一種のPCB77や非コプラナーPCBのPCB153にみられたように、AhRに依存せず、また水酸化PCBが関与しない甲状腺ホルモンかく乱メカニズムがあることが示唆された。毒性等価係数（TEF）概念から外れるPCB同族体の影響を評価する必要性があるだろう。

上記（1）で指摘したように、胎児期、授乳期曝露の影響を分別すること、単回投与と慢性曝露の影響を比較検討すること、実験動物でみられたエンドポイントをヒトのリスク評価の根拠データとして用いることの妥当性について、さらに検討する必要がある。

4. 研究実施体制

(1)体制



(2)メンバー表

①総括

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
遠山　千春 掛山　正心 中澤　京子	国立環境研究所 国立環境研究所 国立環境研究所	領域長 研究員 CREST　研究補助員	生殖・神経内分泌研究全体	平成 11 年 1 月～15 年 12 月 平成 11 年 4 月～15 年 12 月 平成 11 年 2 月～15 年 12 月

②生殖機能への影響グループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
馬場　忠	筑波大学	教授	受精卵・初期胚及び性比	平成 11 年 1 月～15 年 12 月
呉　慶	国立環境研究所	CREST 研究員	同上	平成 13 年 4 月～15 年 12 月
大迫　誠一郎	国立環境研究所	主任研究員	生殖細胞系列・生殖器官発生	平成 11 年 1 月～15 年 12 月
窪田　邦宏	国立環境研究所	CREST 研究員	同上	平成 13 年 7 月～15 年 6 月
本多　徳穂	国立環境研究所	ﾘｻｰﾁｱｿｼｴｲﾄ	同上	平成 12 年 4 月～15 年 3 月
石村　隆太	国立環境研究所	研究員	胎盤機能	平成 11 年 1 月～15 年 12 月
一鬼　勉	㈱ﾊﾟﾅﾌｧｰﾑ･ﾗﾎﾞﾗﾄﾘｰｽﾞ	研究部長	量・反応解析	平成 11 年 1 月～13 年 3 月
坂上　元栄	国立環境研究所	CREST 時給制研究補助員		平成 11 年 6 月～平成 14 年 3 月
黒澤　修一	国立環境研究所	CREST 時給制研究補助員		平成 11 年 6 月～13 年 3 月
臼田　浩幸	国立環境研究所	CREST 時給制研究補助員		平成 11 年 8 月～12 年 4 月
高橋　聡子	国立環境研究所	CREST 時給制研究補助員		平成 11 年 7 月～15 年 3 月
川上　隆茂	国立環境研究所	CREST 時給制研究補助員		平成 13 年 4 月～15 年 12 月
城戸　文	国立環境研究所	CREST 時給制研究補助員		平成 13 年 8 月～15 年 12 月
一之宮　美恵	国立環境研究所	CREST 時給制研究補助員		平成 14 年 6 月～15 年 3 月

③脳機能・行動への影響グループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
曽根　秀子	国立環境研究所	主任研究員	脳の性分化・性行動	平成 11 年 1 月～15 年 12 月
石塚　真由美	国立環境研究所	研究員	同上	平成 11 年 1 月～13 年 3 月
座波　ひろ子	国立環境研究所	CREST 技術員	同上	平成 13 年 4 月～15 年 12 月
北條　理恵子	国立環境研究所	CREST 技術員	同上	平成 14 年 10 月～15 年 12 月
久寿米木　幸寛	国立環境研究所	CREST 技術員	同上	平成 12 年 4 月～14 年 3 月
鈴木　智尋	国立環境研究所	CREST 技術員	同上	平成 11 年 4 月～14 年 3 月
青木　康展	国立環境研究所	室長	甲状腺ホルモン系	平成 11 年 1 月～15 年 12 月

高永　博実	国立環境研究所	科技庁特別研究員	同上	平成 11 年 1 月～14 年 4 月
池田　雅彦	静岡県立大学	助手		平成 12 年 4 月～15 年 12 月
富田　多嘉子	静岡県立大学	教授		平成 11 年 1 月～13 年 3 月
田村　昌士	静岡県立大学	CREST 時給制研究補助員		平成13年11月～14 年 1 月
瀬谷　薫	静岡県立大学	CREST 時給制研究補助員		平成13年11月～14 年 1 月
鈴木　千夏	静岡県立大学	CREST 時給制研究補助員		平成 14 年 6 月～14 年 12 月
山下　純子	静岡県立大学	CREST 時給制研究補助員		平成 14 年 6 月～14 年 12 月
前田　秀一郎	山梨大学	教授		平成 11 年 1 月～15 年 12 月
小泉　律子	山梨大学	CREST 時給制研究補助員		平成 11 年 8 月～13 年 1 月
清水　千恵子	山梨大学	CREST 時給制研究補助員		平成 11 年 8 月～12 年 1 月
柚木　範子	山梨大学	CREST 時給制研究補助員		平成 13 年 12 月～14 年 2 月

④免疫機能への影響グループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
野原　恵子	国立環境研究所	室長	免疫機能の抑制	平成11年1月～15年 12 月
潘　小青	国立環境研究所	CREST 研究員	免疫機能の抑制	平成14年5月～15年 12 月
井上　薫	国立環境研究所	科学技術特別研究員	同上	平成13年4月～15年 12 月
伊藤　智彦	国立環境研究所	CREST 研究員	同上	平成13年6月～15年 12 月
九十九　伸一	国立環境研究所	CREST 研究員	同上	平成11年4月～14年 3 月
木嶋　美香	国立環境研究所	CREST 研究補助員	同上	平成11年4月～13年 3 月
藤巻　秀和	国立環境研究所	室長	アトピー性疾患	平成11年1月～15年 12 月
小林　隆弘	国立環境研究所	副領域長	自己免疫疾患	平成11年1月～13年 3 月
和泉　博之	㈱新日本科学	主任研究員	免疫機能の抑制	平成13年4月～15年 12 月
松本　みちよ	国立環境研究所	CREST 時給制研究補助員		平成 13 年 6 月～15 年 12 月
三縞　恵子	国立環境研究所	CREST 時給制研究補助員		平成13年12月～15 年 1 月
長井　治子	国立環境研究所	CREST 時給制研究補助員		平成 14 年 5 月

遠田　健一	国立環境研究所	CREST 時給制研究補助員		平成 14 年 8 月～15 年 3 月

⑤リスク評価グループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
米元　純三	国立環境研究所	総合研究官	リスク評価	平成 11 年 1 月～15 年 12 月
宮原　裕一	信州大学	助教授	ダイオキシン分析	平成 11 年 1 月～15 年 12 月
西村　典子	国立環境研究所	主任研究員	リスク評価	平成 11 年 1 月～15 年 12 月
古澤　千紗子	国立環境研究所	CREST 研究補助員	病理組織作成補助	平成 12 年 4 月～15 年 12 月
大村　昌子	国立環境研究所	CREST 研究補助員	同上	平成 11 年 4 月～12 年 3 月
平塚　秀明	㈱ﾊﾟﾅﾌｧｰﾑ･ﾗﾎﾞﾗﾄﾘｰｽﾞ	研究次長	量・反応解析	平成 11 年 1 月～15 年 12 月
滝　加代子	国立環境研究所	CREST 時給制研究補助員		平成 13 年 5 月～15 年 12 月
ZINIA HAQUE	国立環境研究所	CREST 時給制研究補助員		平成 14 年 4 月～14 年 10 月

5．研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成 11 年 1 月 16 日	第1回全体会議	国立環境研究所中会議室	20人	研究計画の策定・顔合わせ
平成 11 年 3 月 30 日	ダイオキシン類のリスク評価に関する国際ワークショップ	国立環境研究所大山ホール	100人	WHO のダイオキシンの TDI の改訂に重要な疫学的・実験的な知見を提供した研究者（オランダ、イタリア、米国各1名）を招聘して研究内容と TDIの見直しに関する問題点などを討論した。また、国立環境研究所におけるダイオキシンに関する「特別研究」の中間報告と、新たに始まる戦略的基礎研究について紹介した。
平成 12 年 2 月 9 日	第2回全体会議	国立環境研究所第 3 会議室	20人	研究成果発表・今後の研究計画
平成 12 年 2 月 8 日	ワークショップ	つくば国際会議場中会議室	80人	ダイオキシン類の健康影響、免疫系への影響及びそのメカニズムについてアクティブに研究を行っている3名の研究者を海外より招き、セミナーを行った。
平成 13 年 2 月 8 日	第3回シンポジウム	国立環境研究所大山ホール	80 人	国外の研究者 4 名によるシンポジウム
平成 14 年 2 月 15 日	平成13年度全体会議	国立環境研究所温暖化棟交流会議室	25人	今年度の成果報告
平成 15 年 2 月4日	平成14年度全体会議	国立環境研究所 温暖化棟交流会議室	25人	グループ毎の研究報告

(2)招聘した研究者等

氏　名（所属、役職）	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Colin Jefcoate University of Wisconsin	当研究に関する講演とアドバイスのため	国立環境研究所	平成11年9月2日～9月4日
Philip Wexler 米国国立医学研究所	当研究に関する講演とアドバイスのため	国立環境研究所	平成12年4月18日～4月20日
Janet Joyce Klahn Diliberto 米国国立健康環境影響研究所 薬理動態部生物担当研究員	当研究に関する講演とアドバイスのため	国立環境研究所	平成12年6月24日～7月1日
Yujian Kang ルイビル大学 薬学部 准教授	当研究に関する講演とアドバイスのため	国立環境研究所	平成12年6月24日～7月1日
平峯　千春 香川医科大学医学部助教授	当研究に関する講演とアドバイスのため	国立環境研究所	平成13年9月27日～9月28日
Andrew G. Smith MRC Toxicology Unit, Leicester University, 教授	当研究に関する講演とアドバイスのため	国立環境研究所	平成14年7月8日～7月9日
松村　文夫 カリフォルニア大学デーヴィス校　教授	当研究に関する講演とアドバイスのため	国立環境研究所	平成14年10月8日～10月9日
眞鍋　昇 京都大学大学院農学研究科助教授	当研究に関する講演とアドバイスのため	国立環境研究所	平成14年12月26日～12月27日

6. 主な研究成果物、発表等

(1)論文発表　(国内 14件、海外　43件)

1. Doi H., Baba T., Tohyama C., Nohara K. Functional activation of arylhydrocarbon receptor (AhR) in primary T cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Chemosphere*, 52:655-662, 2003.
2. Fukuzawa H. N., Ohsako S., Nagano R., Sakaue M., Baba T., Aoki Y. and Tohyama C. Effects of 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl, a Coplanar Polychlorinated Biphenyl Congener, on Cultured Neonatal Mouse Testis. *Toxicology in vitro*, 17/3, 259-269, 2003.
3. Inouye, K., Ito, T., Fujimaki, H., Takahashi, Y., Takemori, T., Pan, Xiaoqing, Tohyama, C. and Nohara, K . Suppressive effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on the high-affinity antibody response in C57BL/6 mice. *Toxicol. Sci.*, 74: 315-324, 2003.
4. Ishizuka M., Yonemoto J., Zaha H., Tohyama C., Sone H. Perinatal Exposure to low dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters sex-dependent expression of hepatic CYP2C11. *J.Biochemical Molecular Toxicology*, 17(5):278-285, 2003.
5. Ishimura R., Kawakami T., Ohsako S. and Tohyama C. Fetal death and alteration of placental functions after exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Animal Frontier Sciences*, 2003:313-318, 2003.
6. Kakeyama M., Tohyama C. Developmental neurotoxicity of dioxin and its related compounds. *Industrial Health*, 41(3):215-230, 2003.
7. Kakeyama M., Sone H., Miyabara Y. and Tohyama C. Perinatal exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters activity dependent expression of BDNF mRNA in the Neocortex and male rat sexual behavior in adulthood. *Neuro Toxicology*, 24(2): 207-217,2003.
8. Kubota K., Ohsako S., Kurosawa S., Takeda K., Wu Q., Sakaue M., Kawakami T., Ishimura R., and Tohyama C. Effects of vinclozolin administration on sperm production and testosterone biosynthetic pathway in adult male rat. *J Reprod Dev*, 49: 403-412, 2003.
9. Ohsako S., Kubota K., Kurosawa S., Takeda K., Wu Q., Ishimura R., and Tohyama C. Alterations of gene expression in adult male rat testis and pituitary shortly after subacute administration of the antiandrogen flutamide. *J Reprod Dev*, 49: 275-290, 2003.
10. Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., Yanagisawa, J., Fujii-Kuriyama, Y. and Kato, S. Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature*, 423: 545-550, 2003.
11. Nishimura N., Yonemoto J., Miyabara Y., Sato M. and Tohyama C. Rat Thyroid Hyperplasia Induced by Gestational and Lactational Exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-Dioxin. *Endocrinology*, 144：2075-2083, 2003.
12. Buchanan DL, Ohsako S., Tohyama C, Cooke PS, Iguchi T.: 2,3,7,8-Tetrachrolodibenzo-p-dioxin (TCDD) inhibition of estrogen-induced mouse uterine epithelial mitogenesis involves changes in cyclin and transforming growth factor-beta expression. *Toxicol Sci.*, 66: 62-68, 2002.
13. Fujimaki H., Nohara K., Kobayashi T., Suzuki K., Eguchi-Kasai K., Tsukumo S., Kijima M. and Tohyama C. Effect of a Single Oral Dose of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on Immune Function in Male NC/Nga Mice. *Toxicological Sciences*, 66: 117-124, 2002.
14. Kurachi M, Hashimoto S, Obata A, Nagai S, Nagahata T, Inadera H, Sone H, Tohyama C, Kaneko S, Kobayashi K, Matsushima K.Identification of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-responsive genes in mouse liver by serial analysis of gene expression. *Biochem. Biophy Res Commun.* 292 (2): 368-377, 2002.
15. Ikeda M, Inukai N, Mitsui T, Sone H, Yonemoto J, Tohyama C, Tomita T. Changes in fetal brainaromatase activity following in utero 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure in rats. Environ. *Toxicol. Pharm*. 11: 1-7, 2002.
16. Ishimura R., Ohsako S., Miyabara Y., Sakaue M., Kawakami T., Aoki Y., Yonemoto J. and Tohyama C. Increase of glycogen content and glucose transporter 3 (GLUT3) mRNA level in placenta of Holtzman rats after exposure to 2,3,7,8-Tetrachrolodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicol Appl*

Pharmacol, 2002 Feb 178:161-171.
17. Ishimura R, Ohsako S, Kawakami T, Sakaue M, Aoki Y, Tohyama C. Altered protein profile and possible hypoxia in the placenta of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin exposed rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 2002 Dec 185:197-206.
18. Ito T, Inouye K, Fujimaki H, Tohyama C, Nohara K. Mechanism of TCDD-Induced Suppression of Antibody Production: Effect on T Cell-Derived Cytokine Production in the Primary Immune Reaction of Mice. *Toxicol. Sci*., 70: 46-54, 2002.
19. Nishimura N., Miyabara Y., Sato M., Yonemoto J. and Tohyama C. Immunohistochemical localization of thyroid stimulating hormone induced by a low oral dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in female Sprague-Dawley rats. *Toxicology*, 171; 73-82, 2002.
20. 西村典子. ダイオキシン類（TCDD）曝露による甲状腺機能への影響とそのメカニズム. 日本獣医学会-日本獣医病理学会会報特集号　環境ホルモンと病態, 7-12, 2002.
21. Nohara K., Fujimaki H., Tsukumo S., Inouye K., Sone H., Tohyama C. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on T cell-derived cytokine production in ovalbumin (OVA)-immunized C57Bl/6 mice. *Toxicology*, 172; 49-58, 2002.
22. Nohara K., Izumi H., Tamura S., Nagata R., Tohyama C. Effect of low-dose 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on influenza A virus-induced mortality in mice. *Toxicology*, 170(1-2); 131-138, 2002.
23. Ohsako S., Miyabara Y., Sakaue M., Ishimura R., Kakeyama M., Izumi H., Yonemoto J., and Tohyama C. Developmental stage-specific effects of perinatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on reproductive organs of the male rat offspring. *Toxicol Sci*, 66: 283-292, 2002.
24. Sakaue M., Ishimura R., Kurosawa S., Fukuzawa H.N., Kurohmaru M., Hayashi Y., Tohyama C., and Ohsako S. Administration of estradiol-3-benzoate down-regulates the expression of testicular steroidogenic enzyme genes for testosterone production in the adult rat. *J Vet Med Sci*, 64: 107-113, 2002.
25. Tohyama C. Low-Dose Exposure to Dioxin, Its Toxicities and Health Risk Assessment. *Environmental Sciences*, 2002. (in press)
26. Tsukumo S., Iwata M., Tohyama C., Nohara K. Skewed differentiation of thymocytes toward CD8 T cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin requires activation of the extracellular signal-related kinase pathway. *Archives of Toxicology*, 76 (5-6): 335-343, 2002.
27. Wu Q., Ohsako S., Baba T., Miyamoto K., Tohyama C. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on the mouse preimplantation embryos. *Toxicology*, 174 (2): 119-129, 2002.
28. Doi H., Tsukumo S., Baba T., Tohyama C. and Nohara K. Primary lymphocytes have a functional aryl hydrocarbon reseptor. Organohalogen Compounds 53; 395-397, 2001.
29. Kakeyama M., Sone H. and Tohyama C. Changes in expression of the NMDA receptor subunit mRNA in the neocortex and hippocampus by perinatal exposure to dioxin. *Neuro Report*, 12(18); 4009-4012, 2001.
30. Miyabara Y., Ohsako S., Nohara K., Tohyaa C. and Yonemoto J. Fetal and infant body burden of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin causing a short anogenital distance and immunotoxicity in male Holtzman rats. Organohalogen Compounds 53; 54-56, 2001.
31. Nisimura N., Miyabara Y., Suzuki JS., Sato M., Aoki Y., Satoh M., Yonemoto J. and Tohyama C. Induction of metallothionein in the livers of female Sprague dawley rats treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Life Sciences*, 69; 1291-1303, 2001.
32. Nishimura N., Miyabara Y., Sato M., Tohyama C. and Yonemoto J. Alterations in Thyroid Function in Holtzman Rats Following Gestational and Lactational Exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. Organohalogen Compounds 53; 14-16, 2001.
33. Nohara K., Izumi H., Tamura S. and Tohyama C. Host resistance to influenza A virus in mice exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. Organohalogen Compounds 53; 395-397, 2001.
34. Ohsako S., Miyabara Y., Nishimura N., Kurosawa S., Sakaue M., Ishimura R., Sato M., Aoki Y., Sone H., Tohyama C., and Yonemoto J. Maternal exposure to a low dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) suppressed the development of reproductive

organs of male rats: dose-dependent increase of mRNA levels of 5α-reductase type 2 in contrast to decrease of androgen receptor in the pubertal ventral prostate. *Toxicol Sci*, 60; 132-143, 2001.
35. Sakaue M., Ohsako S., Ishimura R., Kurosawa S., Kurohmaru M., Hayashi Y., Aoki Y., Yonemoto J. and Tohyama C. Bisphenol-A affects spermatogenesis in the mature rat even at a low dose. *J Occupational Health.* 43, 185-190, 2001.
36. Takanaga H., Kunimoto M., Adachi T., Tohyama C. and Aoki Y. Inhibitory Effect of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin on cAMP-Induced Differentiation of Rat C6 Glial Cell Line. *J.Neurosicence Research*, 64:402-409, 2001.
37. Nohara K., Ushio H., Tsukumo S., Kobayashi T., Kijima M., Tohyama C. and Fujimaki H. Alterations of thymocyte development, thymic emigrants and peripheral T cell population in rats exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicology*, 145, 227-235, 2000.
38. Nohara K., Fujimaki H., Tsukumo S., Ushio H., Miyabara Y., Kijima M., Tohyama C. and Yonemoto J. The effects of perinatal exposure to low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on immune organs in rats. *Toxicology*, 154:123-133, 2000.
39. Sarkar S., Jana N.R., Yonemoto J., Tohyama C. and Sone H., Estrogen enhances induction of cytochrome P-4501A1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in liver of female Long-Evans rats. *International Journal of Oncology* 16: 141-147, 2000.
40. Jana N.R., Sarkar S., Ishizuka M., Yonemoto J., Tohyama C., Sone H. Comparative effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on MCF-7, RL95-2, and LNCaP cells: Role of target steroid hormones in cellular responsiveness to CYP1A1 induction. *Mol. Cell Biol. Res. Commun*. 4, 174-180, 2000.
41. パオロ モッカレリ, 遠山千春. セベソにおけるダイオキシン中毒の症状. 治療学, 34(5): 96-99, 2000.
42. 石村隆太,大迫誠一郎,遠山千春. 内分泌攪乱物質の健康リスク評価. BioClinica Vol.15 (2): 43-48. 2000
43. 大迫誠一郎. ダイオキシンの雄性生殖機能への影響. 産婦人科の実際. Vol.49 (8), 1089-1096, 2000.
44. 遠山千春,大迫誠一郎,石村隆太. 内分泌攪乱物質の健康リスクアセスメント. 日本臨床. Vol.58 (12), 2393-2400, 2000.
45. 米元純三. オスの生殖機能への内分泌撹乱物質の影響. 治療学; 34, 485-488,2000.
46. 米元純三, 曽根秀子. ダイオキシンと性ホルモンとの相互作用. 廃棄物学会誌;11, 162-172, 2000.
47. Yonemoto J. The effects of dioxin on reproduction and development. *Ind.Health*; 38, 259-268, 2000.
48. 西村典子, 宮原裕一, 鈴木純子, 佐藤雅彦, 佐藤巳喜夫, 米元純三, 青木康展, 遠山千春.ダイオキシン投与ラット肝臓におけるメタロチオネインの誘導と重金属の変動. Biomed Res Trace Elements; 11, 387-388, 2000.
49. 宮原裕一, 米元純三. ポリ塩化ビフェニール(PCBs, ダイオキシン類など). 日本臨牀; 58(12) 48-53, 2000.
50. Jana N.R., Sarkar S., Ishizuka M., Yonemoto J., Tohyama C. and Sone H., Role of Estradiol Receptor-a (alpha) in Differential Expression of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-Inducible Genes in the RL95-2 and KLE Human Endometrial Cancer Cell Lines. *Arch Biochem Biophys*, 368: 31-39, 1999.
51. Jana N.R., Sarkar S., Ishizuka M., Yonemoto J., Tohyama C. and Sone H. Cross-talk between 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and Testosterone Signal Transduction Pathways in LNCaP Prostate Cancer Cells. *Biochem Biophy Res Commun*, 256: 462-468, 1999
52. Sone H, Dose Environmental Hormone Induce Endocrine and Reproductive Disorders in Human Females? *Asian Medical Journal* 42(11): 487-492, 1999.
53. 曽根秀子, ダイオキシンと健康リスク. 臨床検査 43: 1383-1389, 1999.
54. 遠山千春, 曽根秀子, 米元純三, ダイオキシンの健康リスク評価. 臨床環境医学 8: 51-61, 1999.
55. 曽根秀子, 環境ホルモンはヒト女性の内分泌・生殖系の健康障害をおこしているか. 日本医師会雑誌 121: 671-674, 1999.

56. 曽根秀子，遠山千春，内分泌攪乱と健康リスク．産科と婦人科 66: 189-199, 1999.
57. 米元純三，ダイオキシン問題と健康リスク．土木学会誌. 84: 60-63, 1999.

(2) 口頭発表

①招待、口頭講演　（国内　19件、海外　9件）
②ポスター発表　（国内　80件、海外　47件）

1. Nishimura N., Yonemoto J., Takeuchi Y., Yokoi C., Nishimura H. and Tohyama C. Hydronephrosis and renal CYP1A1 induction in the rat kidney by lactational exposure to dioxin. Society of Toxicology 43rd Annual Meeting, Baltimore. (2004)
2. 米元純三、井上稔、永田良一、武井貞治、遠山千春. 雄性ラットへのダイオキシン曝露が仔の性比に及ぼす影響. 第6回環境ホルモン学会研究発表会，仙台. (2003)
3. 野原恵子、伊藤智彦、遠山千春.　ダイオキシンの免疫系に対する作用メカニズム.　フォーラム 2003：衛生薬学・環境トキシコロジー，　仙台.　（2003）
4. 遠山千春.　低用量ダイオキシン曝露と健康リスク.　フォーラム 2003：衛生薬学・環境トキシコロジー，　仙台.　（2003）
5. Nishimura N., Yonemoto J., Ohsako S. and Tohyama C. Disruption of thyroid hormone homeostasis by dioxin via an arylhydrocarbon receptor-mediated mechanism. The Third Meeting on Pathology of Genetically Engineered Mice, Ooita. (2003)
6. 井上薫、潘小青、今井統隆、遠山千春、野原恵子.　低用量ダイオキシン曝露による免疫系への影響.　第 10 回日本免疫毒性学会学術大会，相模原.　（2003）
7. 伊藤智彦、九十九伸一、山本雅之、本橋ほづみ、鈴木教郎、藤井義明、三村純正、遠山千春、野原恵子.　恒常的活性化型 arylhydrocarbon receptor 変異体を用いた T 細胞へのダイオキシンの影響の解明.　第 10 回日本免疫毒性学会学術大会，相模原.　（2003）
8. Kakeyama M, Sone H, Tohyama C. Maternal exposure to Dioxin induced central precocious puberty in the female rat. The 9th Meeting of the International Neurotoxicology Association, Dresden (2003)
9. Ishimura R., Kawakami T., Ohsako S. and Tohyama C. Immature angiogenesis in the rat placental labyrinth after exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 23rd International Symposium on Halogenated Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants, Boston. (2003)
10. Kawakami T., Ishimura R., Ohsako S., Takeda K and Tohyama C. Strain difference in placental dysfunction and fetal death in rats exposed to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 23rd International Symposium on Halogenated Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants, Boston. (2003)
11. Yonemoto J., Inouye M., nagata R., Takei T., Tohyama C. Exposure of male Long-Evans rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin using loading-dose/maintenance-dose regimen does not alter the sex ratio of their offspring. 23rd International Symposium on Halogenated Environmental Organic pollutants and POPs, Boston. (2003)
12. Maeda S., Kakeyama M. and Tohyama C. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on brain development and function. 23rd International Symposium on Halogenated Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants, Boston. (2003)
13. Nishimura N., Yonemoto J., Yokoi C. and Tohyama C. Hydronephrosis at weaning not during gestation, is caused by lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in holtzman rats. 23rd International Symposium on Halogenated Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants, Boston. (2003)
14. 中田明子，西村典子，竹内陽子，横井千沙子，遠山千春，グゥエン・ヴァン・チュエン．第 57 回日本栄養・食糧学会大会，福岡．(2003)
15. Nishimura N. Alterations in Thyroid Function Following Gestational and Lactational Exposure to Dixoin. Challenges and Achievements in Environmental Health International Conference

2003, Gwangju. (2003)

16. Tohyama C. Elucidation of endocrine disrupting mechanism of dioxin and related compounds for health risk assessment. Challenges and Achievements in Environmental Health International Conference 2003, Gwangju. (2003)
17. Tohyama C., Ohsako S., Yonemoto J. Problems & Prospect of Environmental Health in East Asia: National Institute of Environmtnal Research International Symposium, Inchen, Korea. (2003)
18. 池田雅彦，鈴木千夏，山下純子，遠山千春，富田多嘉子．ダイオキシンのラット脳の性分化に対する経胎盤，経母乳曝露の影響-ダイオキシン用量依存症．内分泌攪乱物質特別シンポジウム –性腺軸（視床下部-下垂体-性腺）の発育と異常-，葉山（2003）
19. 野原恵子，藤巻秀和，遠山千春．ダイオキシン曝露がアレルギー疾患に及ぼす影響．アレルギー学会春季臨床大会，横浜（2003）
20. 西村典子，米元純三，横井千沙子，竹内陽子，遠山千春．母乳からのダイオキシン曝露による甲状腺機能への影響とそのメカニズム：クロスフォスタリング実験．第 73 回衛生学会，大分（2003）
21. 遠山千春，米元純三，竹内陽子，横井千沙子，宮原裕一，西村典子．ダイオキシンおよびポリ塩素化ビフェニルのレチノイド代謝への作用メカニズム. 第 73 回衛生学会，大分（2003）
22. 米元純三，西村典子，横井千沙子，竹内陽子，遠山千春．ダイオキシン及びポリ塩素化ビフェニルの甲状腺ホルモンへの影響とそのメカニズム．第 73 回衛生学会，大分（2003）
23. Nishimura N., Yonemoto J., Yokoi C., Takeuchi Y., Ikushiro S. and Tohayma C. Lactational not *in utero* exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin disrupts thyroid hormone homeostasis in holtzman rats. Society of Toxicology 42nd Annual Meeting, Salt Lake City. (2003)
24. Ito, T., Tsukumo, S., Yamamoto, M., Motohashi, H., Suzuki, N., Fujii-Kuriyama, Y., Mimura, J., Tohyama, C. and Nohara, K. A constitutively active aryl hydrocarbon receptor induces growth inhibition by cell cycle arrest and apoptosis in jurkat T cells. Society of Toxicology: 42 nd annual meeting, Salt Lake City. (2003)
25. Nohara, K., Tsukumo, S., Ito, T., Yamamoto, M., Motohashi, H., Hida, A., Fujii-Kuriyama, Y., Inouye, K., Nagai, H. and Tohyama, C. Thymocyte alterations in CD2-driven constitutively active arylhydrocarbon receptor(AhR) transgenic mice. Society of Toxicology: 42 nd annual meeting, Salt Lake City. (2003)
26. 野原恵子，遠山千春．ダイオキシンによる免疫毒性の標的細胞．第 2 回分子予防環境医学研究会，東京（2002）
27. 石村隆太，川上隆茂，大迫誠一郎，遠山千春．TCDD による胎仔死亡および胎盤の血管収縮の系統差メカニズム．第 2 回分子予防環境医学研究会，東京（2002）
28. 遠山千春，米元純三，西村典子．齧歯類の甲状腺組織と機能に及ぼすダイオキシンの攪乱作用．第 25 回日本分子生物学会年会，横浜（2002）
29. 野原恵子，九十九伸一，伊藤智彦，山本雅之，本橋ほづみ，日田安寿美，藤井義明，井上薫，長井治子，遠山千春．T 細胞特異的 constitutive active arylhydrocarbon receptor トランスジェニックマウスの免疫系の解析．第 25 回日本分子生物学会年会，横浜（2002）
30. 野原恵子，九十九伸一，伊藤智彦，井上薫，長井治子．T 細胞特異的 Constitutive Active Arylhydrocarbon Receptor トランスジェニックマウスの作製．第 32 回日本免疫学会，東京（2002）
31. 伊藤智彦，井上薫，藤巻秀和，野原恵子．マウス一次免疫反応での T 細胞由来サイトカイン産生に対するダイオキシン曝露の影響．第 32 回日本免疫学会，東京（2002）
32. 石村隆太，川上隆茂，大迫誠一郎，青木康展，遠山千春．TCDD 曝露によるホルツマンラット胎盤の低酸素状態マーカータンパクの誘導．環境ホルモン学会第 5 回研究発

表会，広島(2002)

33. 川上隆茂，石村隆太，遠山千春，武田健，大迫誠一郎．TCDD 曝露による胎仔死亡および胎盤の機能低下の系統差．環境ホルモン学会第 5 回研究発表会，広島（2002）
34. 呉慶， 大迫誠一郎， 石村隆太， 川上隆一， 鈴木純子， 遠山千春． マウス着床前胚の in vitro TCDD 曝露による胎児の発育と DNA メチル化のパターンの変化． 環境ホルモン学会第 5 回研究発表会， 広島(2002)
35. 座波ひろ子， 曽根秀子， 米元純三， 久野節二， 前田秀一郎， 遠山千春． マウス胎児脳における 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin の sfrp-2 発現と局在に及ぼす影響．環境ホルモン学会第 5 回研究発表会， 広島（2002）
36. 竹内陽子， 遠山千春， 宮原裕一， 横井千紗子， 米元純三， 前田秀一郎， 西村典子．トランスサイレチン欠損マウスを用いたダイオキシン/ポリ塩素化ビフェニルの作用メカニズム 1. 血清および肝臓レチノイド量への影響． 環境ホルモン学会第 5 回研究発表会， 広島（2002）
37. 中田明子， 竹内陽子， 横井千紗子， グュエン・ヴァン・チュエン， 遠山千春， 西村典子． ダイオキシン類の酸化的ストレスに対するビタミン E の抑制効果． 環境ホルモン学会第 5 回研究発表会， 広島（2002）
38. 西村典子， 米元純三， 横井千紗子， 竹内陽子， 遠山千春． ダイオキシン類およびポリ塩素化ビフェニールの甲状腺機能への影響とそのメカニズム． 環境ホルモン学会第 5 回研究発表会， 広島（2002）
39. 横井千紗子， 遠山千春， 竹内陽子， 米元純三， 前田秀一郎， 西村典子． トランスサイレチン欠損マウスを用いたダイオキシン/ポリ塩素化ビフェニルの作用メカニズム 2. 甲状腺ホルモンへの影響． 環境ホルモン学会第 5 回研究発表会， 広島（2002）
40. Yonemoto J., Nishimura N., Yokoi C., Takeuchi Y. and Tohyama C. Lactational rather than *in utero* exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin caused hypothyroxinemia at wearing of Holtzman rats. 環境ホルモン学会第 5 回研究発表会，広島(2002)
41. Tohyama C. Low-dose exposure to dioxin and characterization of the toxicity profile. 第 75 回日本生化学会大会，京都（2002）
42. 石村隆太，大迫誠一郎，川上隆茂，青木康展，遠山千春．TCDD に曝露した胎盤における低酸素状態マーカータンパク質の誘導．第 75 回日本生化学会大会，京都（2002）
43. Kakeyama M, Sone H, Miyabara Y, Tohyama C. Maternal Exposure to Dioxin C auses Permanent or Semi-permanent Dysfunction in the Frontal Cortex of Offspri ng at Behavioral and Molecular Levels. 20th International Neurotoxicology Confer ence, Little Rock. (2002)
44. Ohsako S., Yonemoto J. and Tohyama C. Low-dose exposure to dioxin, its male reproductive toxicity and health risk assessment. 5th FAOPS CONGRESS KUALA LUMPUR, Kuala Lumpur. (2002)
45. Nishimura N., Yonemoto J. and Tohyama C. Perinatal exposure to low dose dioxin disrupts thyroid hormone homeostasis and causes thyroid hyperplasia in the rat. 5th FAOPS CONGRESS KUALA LUMPUR, Kuala Lumpur. (2002)
46. 野原恵子， 遠山千春．ダイオキシン曝露による免疫毒性．第 9 回日本免疫毒性学会，静岡（2002）
47. 井上薫，伊藤智彦，藤巻秀和，遠山千春，野原恵子．体液性免疫における長寿命抗体産生細胞に対する 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin(TCDD)の影響．第 9 回日本免疫毒性学会，静岡（2002）
48. 伊藤智彦，井上薫，藤巻秀和，遠山千春，野原恵子．T 細胞活性化および分化に対するダイオキシンの抑制効果．第 9 回日本免疫毒性学会，静岡（2002）
49. Ikeda M., Tamura M., Suzuki C., Yamashita J., Setani K., Tohyama C. and Tomita T. Effects of repeated in utero and lactational TCDD exposure on sexual behavior and sex ratio of offspring. 22nd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants & POPs (Dioxin 2002), Barcelona. (2002)
50. Ishimura R., Ohsako S., Kawakami T., Aoki Y. and Tohyama C. Proteomics analysis of

placentas after exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in rats. 22nd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants & POPs (Dioxin 2002), Barcelona. (2002)

51. Nishimura N., Yonemoto J., Miyabara Y., Yokoi C., Takeuchi Y., Fujii-Kuriyama Y., Maeda S., Tohyama C. Lack of thyroxine and retinoid metabolic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in arylhydrocarbon receptor –null mice but not in transthyretin-null mice. 22nd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants & POPs (Dioxin 2002), Barcelona. (2002)
52. Yonemoto J., Nishimura N., Yokoi C., Takeuchi Y. and Tohyama C. Hypothyroxinemia at weaning of holtzman rats is caused by lactational but not *in utero* exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 22nd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants & POPs (Dioxin 2002), Barcelona. (2002)
53. Wu Q., Ohsako S., Ishimura R. and Tohyama C. Exposure of preimplantation embryos to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) affected fetal development. 22nd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants & POPs (Dioxin 2002), Barcelona. (2002)
54. Ohsako S., Fukuzawa H N., Ishimura R., Sone H., Fujii-Kuriyama Y. and Tohyama C. Alterations in the reproductive system of male mice by perinatal TCDD exposure are dependent on AhR gene. 14th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, Sapporo. (2002)
55. Fukuzawa H. N., Sakaue M., Baba T., Fujii-Kuriyama Y., Tohyama C. and Ohsako S. AhR-dependent down-regulation of cytochrome P450 side chain cleavage (P450scc) enzyme expression in adult mouse testis by TCDD. 14th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, Sapporo. (2002)
56. Nishimura N., Yonemoto J., Miyabara Y., Yokoi C., Takeuchi Y., Fujii-Kuriyama Y., Maeda S., Tohyama C. Alteration in metabolism of thyroxine and vitamin a in AhR-Null mice and TTR-Null mice following 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin exposure. 14th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, Sapporo. (2002)
57. 西村典子, 米元純三, 遠山千春. ダイオキシン類の甲状腺機能への影響とそのメカニズムの検討. 第 29 回日本トキシコロジー学会, 名古屋（2002）
58. 田村昌士，池田雅彦，瀬谷薫，鈴木千夏，山下純子，遠山千春，富田多嘉子．ダイオキシン(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin:TCDD) の経胎盤，経母乳曝露による仔の性分化，生殖腺に対する影響．日本薬学会第 122 回年会，幕張(2002)
59. 西村範子．ダイオキシン類の甲状腺機能への影響とそのメカニズム．第 133 回日本獣医学会，川崎（2002）
60. Nishimura N., Yonemoto J., Miyabara Y., Sone H., Ohsako S., Maeda S., Fujii-Kuriyama Y. and Tohyama C. Mechanisms of a Decrease in Circulating Levels of Thyroxine in Response to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in AhR-null Mice and TTR-null Mice. Society of Toxicology: 41th Annual Meeting, Nashville. (2002)
61. Nohara K., Ito T., Inouye K., Fujimaki H. and Tohyama C. Suppressive Effects of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on Th2-Derived Cytokine Production in Primary Immune Reaction of Mice. Society of Toxicology: 41th Annual Meeting, Nashville. (2002)
62. Inouye K., Ito T., Fujimaki H., Tohyama C. and Nohara K. The Effects of TCDD on Germinal Center Formation in the Spleen of C57BL/6 Mice. Society of Toxicology: 41th Annual Meeting, Nashville. (2002)
63. Nohara K., Izumi H., Tamura S., Nagata R., Tohyama C. Effect of Low-dose 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on Host Resistance to Influenza Virus in Mice. 環境ホルモン学会第 4 回研究発表会，つくば（2001）
64. Nishimura N., Yonemoto J., Miyabara Y., Sone H., Ohsako S., Maeda S., Fujii-Kuriyama Y. and Tohyama C. Mechanisms of a Reduction of Thyroid Hormone Luvels in Response to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-Dioxin in Aryl Hydrocarbon Receptor-Null Mice and Transthyretin-Null Mice. 環境ホルモン学会第 4 回研究発表会，つくば（2001）
65. 石村隆太，大迫誠一郎，川上隆茂，遠山千春．TCDD 曝露に伴うホルツマンラット胎盤のグルコース動態の変化．環境ホルモン学会第 4 回研究発表会，つくば（2001）

66. 川上隆茂，石村隆太，遠山千春，武田健，大迫誠一郎．Sprague-Dawley 及び Holtzman ラットの胎仔・胎盤への TCDD 影響の系統差．環境ホルモン学会第 4 回研究発表会，つくば（2001）
67. 青木康展，川上隆茂，大迫誠一郎，石村隆太，遠山千春．TCDD 投与による妊娠ラット血中キニノーゲン分子種の変化．環境ホルモン学会第 4 回研究発表会, つくば（2001）
68. 福澤徳穂，永野麗子，馬場忠，青木康展，遠山千春，大迫誠一郎．3,3’,4,4’,5-pentachlorobipheneyl のマウス新生仔精巣の器官培養系におけるステロイド合成酵素 mRNA 発現への影響．環境ホルモン学会第 4 回研究発表会，つくば（2001）
69. Ito T., Inouye K., Fujimaki H., Tohyama C. and Nohara K. Mechanisms for 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-Dioxin (TCDD)-Induced Suppression of Antigen-Specific Antibody Production- Inhibition of Th2 Cell-Derived Cytokine Production in the Primary Immune Reaction-.環境ホルモン学会第 4 回研究発表会，つくば（2001）
70. Setani K., Ikeda M., Kakeyama M., Tamura M., Suzuki C., Yamashita J., Sone H., Tohyama C. and Tomita T. Effects of in utero and lactational exposure to TCDD on the differentiation of sexually dimorphic nucleus in the preoptic area. 環境ホルモン学会第 4 回研究発表会，つくば（2001）
71. Inouye K., Ito T., Fujimaki H., Tohyama C. and Nohara K. Alteration of B cell Development in the Spleen of C57Bl/6 Mice by TCDD Treatment. 環境ホルモン学会第 4 回研究発表会，つくば（2001）
72. 野原恵子，井上薫，伊藤智彦，藤巻秀和，遠山千春．ダイオキシンによる抗体産生抑制のメカニズム．第 8 回免疫毒性学会，宇都宮（2001）
73. 西村典子，鈴木純子，宮原裕一，佐藤雅彦，佐藤巳喜夫，米元純三，青木康展，遠山千春．ダイオキシンによるラット肝メタロチオネインの誘導．第 3 回メタロチオネイン研究会，仙台（2001）
74. 野原恵子，井上薫，藤巻秀和．ダイオキシンが C57Bl/6 マウスの T 細胞由来サイトカイン産生に及ぼす影響.第 31 回日本免疫学会総会，大阪（2001）
75. 井上薫，藤巻秀和，高橋且聖，竹森利忠，野原恵子．ダイオキシンの脾臓における胚中心形成に及ぼす影響．第 31 回日本免疫学会総会，大阪（2001）
76. 掛山正心、遠山千春、曽根秀子．　脳の発達形成に対するダイオキシンの影響．第79回日本生理学会大会，京都．(2001)
77. Ikeda M., Mitsui T., Tamura M., Setani K., Kakeyama M., Sone H., Tohyama C. and Tomita T. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on sexual differentiation-influence of the *in utero* exposure on fetus brain aromatase activity and sexual dimorphisms in rats. 21th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants & POPs (Dioxin 2001), Gyeongju. (2001)
78. Ishimura R., Kawakami T., Aoki Y., Yonemoto J., Tohyama C. and Ohsako S. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) affects glucose kinetics in rat placenta. 21th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants & POPs (Dioxin 2001), Gyeongju. (2001)
79. Fukuzawa H. N., Nagano R., Baba T., Aoki Y., Tohyama C. and Ohsako S. Coplanar polychrolinated biphenyl (Co-PCB) affects steroidgenic enzyme mRNA expression in the neonatal mouse testis *in vitro*. 21th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants & POPs (Dioxin 2001), Gyeongju. (2001)
80. Nishimura N., Miyabara Y., Sato M., Tohyama C. and Yonemoto J. Alterations in thyroid function in holtzman rats following gestational and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 21th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants & POPs (Dioxin 2001), Gyeongju. (2001)
81. Nohara K., Izumi H., Tamura S. and Tohyama C. Host resistnance to influenza a virus in mice exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 21th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants & POPs (Dioxin 2001), Gyeongju. (2001)
82. Doi H., Tsukumo S., Baba T., Tohyama C. and Nohara K. Primary lymphocytes have a

functional aryl hydrocarbon receptor. 21th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants & POPs (Dioxin 2001), Gyeongju. (2001)
83. Nishimura N., Miyabara Y., Sato M., Tohyama C. and Yonemoto J. Thyroid Hyperplasia Induced by Gestational and Lactational Exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 9th International Congress of Toxicology, Brisbane. (2001)
84. Ishimura R., Ohsako S., Aoki Y. and Tohyama C. Detection and characterization of TCDD-inducible protein (HSP27) in the rat placenta. The Endocrine Society's 83rd Annual meeting, Denver. (2001)
85. Ohsako S., Kurosawa S., Ishimura R. and Tohyama C. Effect of anti-androgen flutamide on testicular function in the mature male rat. The Endocrine Society's 83rd Annual meeting, Denver. (2001)
86. Kakeyama M, Sone H, Miyabara Y. Alteration of male rat sexual behavior by in utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 40th International Congress of Society of Toxicology, San Francisco. (2001)
87. Yonemoto J., Ichiki T., Tohyama C. Reproductive effects of offspring exposed maternally to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and association of the effects with the body burdens in Dams and Fetuses / pups in Long-Evans rat. Society of Toxicology: 40th Annual Meeting:, San Francisco(2001.3)
88. Nishimura N., Miyabara Y., Sato M., Tohyama C., Yonemoto J. Effects of gestational and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on thyroid in the rat. Society of Toxicology: 40th Annual Meeting, San Francisco (2001.3)
89. Nohara K., Fujimaki H., Tsukumo S., Kijima M., Inouye K. and Tohyama C. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the Th1/Th2 cell defferentiation in C57Bl/6 mice, 40th Annual Meeting of the Society of Toxicology, San Francisco, 2001.
90. 西村典子, 宮原裕一, 佐藤巳喜夫, 遠山千春, 米元純三. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin への経胎盤および授乳による曝露の仔ラットの甲状腺機能への影響. 第 17 回日本毒性病理学会, 淡路（2001.1）
91. Ishimura R., Ohmura M., Miyabara Y., Ohsako S., Aoki Y., Nishimura N., Nohara K., Sone H., Yonemoto J., and Tohyama C. Abruption of placental maturation by mid-pregnant exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in rat. 38th Ann Meeting of Society of Toxicology, Philadelphia, USA (2000)
92. Miyabara Y., Nishimura N., Ohsako S., Ishimura R., Nohara K., Sone H., Tohyama C., and Yonemoto J. Transfer of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin through pregnancy and lactation in rats. 38th Ann Meeting of Society of Toxicology, Philadelphia, USA (2000)
93. Nohara K., Fujimaki H., Ushio H., Kijima M., Kobayashi T., Tsukumo S., Miyabara Y., Sone H., Tohyama C. and Yonemoto J. Reduction of spleen cellularity by low-dose maternal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in the rats, 39th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Philadelphia, 2000.
94. Sato M., Miyabara Y., Yonemoto J., Matsuzaki Y., Aoki Y., Tohyama C., Nishimura N. Hypothyroxinemia caused by a Low Oral Dose of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenso-*p*-dioxin in Female Sprague Dawley Rats. Society of toxicology: 39th annual meeting, Philadelphia, 2000
95. Yonemoto J., Sarkar S., Jana N.R., Tohyama C., Kusumegi T. and Sone H. Modification of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*P*-dioxin Induced Cytochrome P-4501A1 by Estrogen in Liver of Female Long-Evans Rats. Society of toxicology: 39th annual meeting, Philadelphia, 2000.
96. Nishimura N., Suzuki JS., Sato M., Satoh M., Aoki Y., Ohmura M., Tohyama C. Induction of Metallothionein in Liver of Female Rats Treated with 2,3,7,8,-Tetrachlorodibenso-*p*-dioxin. Society of toxicology: 39th annual meeting, Philadelphia, 2000.
97. Ohsako S. Kinetics of the two 90-kDa heat shock proteins, HSP84 and HSP86, in the experimentally cryptorchid mouse testis. 30th Ann Meeting of the Society for the Study of Reproduction, Madison, USA (2000)
98. 石村隆太，大迫誠一郎，黒澤修一，坂上元栄，遠山千春．ラット妊娠中期の TCDD 投与による後期子宮内死および胎盤のグリコーゲン量の変化. 第93回日本繁殖生物学会, 神戸 (2000)
99. 黒澤修一，武田健，坂上元栄，石村隆太，遠山千春，大迫誠一郎．成熟雄ラットにおけ

る抗アンドロゲン剤の精子形成および下垂体性腺軸に及ぼす影響. 第 93 回日本繁殖生物学会，神戸 (2000)

100. 大迫誠一郎, 石村隆太, 坂上元栄, 黒沢修一, 米元純三, 遠山千春. 胎仔期に TCDD 曝露された雄ラットの腹側前立腺内 5alpha-reductase type 2 および androgen receptor mRNA レベルの変化. 第 130 回日本獣医学会，大阪 (2000)
101. 坂上元栄，大迫誠一郎，石村隆太，黒澤修一，九郎丸正道，遠山千春，林良博. エストラジオールによるラット精巣内テストステロン産生抑制とステロイド合成酵素 mRNA の減少. 第 130 回日本獣医学会，大阪 (2000)
102. 大迫誠一郎. ダイオキシンの雄性生殖機能への影響. 第 44 回日本薬学会関東支部会，千葉 (2000)
103. Inukai N., Ikeda M., Mitsui T., Sone H., Yonemoto J., Tohyama C. and Tomita T. Effects of TCDD on sex defferentiation 1. Influence of the in utero exposure on aromatase activity in rat fetes brain, 第 73 回日本薬理学会年会，横浜, 2000.
104. Buchanan DL., Ohsako S., Tohyama C., Cooke PS., and Taisen I. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) does not alter early estrogen-induced increases in uterine weight but inhibits epithelial mitogenic activity in mice. 第 3 回環境ホルモン学会, 横浜 (2000)
105. 黒澤修一，武田健，坂上元栄，石村隆太，青木康展，遠山千春，大迫誠一郎. 成熟雄ラットにおける抗アンドロゲン剤の精子形成および下垂体—性腺軸に及ぼす影響. 第 3 回環境ホルモン学会，横浜 (2000)
106. 石村隆太，大迫誠一郎，青木康展，遠山千春. TCDD 曝露により胎盤細胞において発現量が変化するタンパク質（Hsp27）の検出および同定. 第 3 回環境ホルモン学会，横浜 (2000)
107. 福澤徳穂，石村隆太，松本理，青木康展，遠山千春，大迫誠一郎. マウス新生仔精巣の器官培養系における co-PCB の生殖細胞分化能への影響. 第 3 回環境ホルモン学会，横浜 (2000)
108. 川上隆茂，石村隆太，大迫誠一郎，武田健，遠山千春. 妊娠初期 TCDD 曝露による SD 系ラットの胚体外組織の変化. 第 3 回環境ホルモン学会，横浜 (2000)
109. 川野道宏、中島民江、鈴木智尋、吉田 緑、米元純三、遠山千春、曽根秀子. フタル酸エステルの継世代曝露によるマウス卵巣のエストロゲン受容体発現に及ぼす影響　第 3 回環境ホルモン学会研究発表会、横浜, 2000.
110. 掛山正心、　遠山千春、　曽根秀子.　雄ラットの性行動に対する 2,3,7,8-四塩素化ダイオキシンの経胎盤及び経母乳曝露による影響, 第 3 回環境ホルモン学会研究発表会、横浜, 2000.
111. 久寿米木幸寛、川野道宏、米元純三、森田昌敏、遠山千春、曽根秀子. エストロゲン応答遺伝子の探索と同定,　第 3 回環境ホルモン学会研究発表会、横浜, 2000.
112. Nohara K., Fujimaki H., Tsukumo S., Kijima M., Inouye K. and Tohyama C.　Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the secondary immune reaction in C57Bl/6 mice, 日本内分泌撹乱化学物質学会第 3 回研究発表会，横浜, 2000.
113. 土井啓利, 九十九伸一, 馬場忠, 遠山千春, 野原恵子. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin による B 細胞および T 細胞におけるシトクロム P4501A1 遺伝子の発現誘導, 日本内分泌撹乱化学物質学会第 3 回研究発表会，横浜, 2000.
114. Inukai N., Ikeda M., Mitsui T., Sone H., Yonemoto J., Tohyama C. and Tomita T. Effects of TCDD on sex defferentiation 1. Influence of the in utero exposure on aromatase activity in rat fetes brain, 第 73 回日本薬理学会年会，横浜, 2000.
115. 藤巻秀和, 野原恵子.　NC/Nga マウスの免疫応答に対する TCDD 曝露の影響,　第 7 回免疫毒性研究会，千葉, 2000.
116. 野原恵子, 九十九伸一, 遠山千春. ダイオキシンによる胸腺細胞分化撹乱のメカニズム, 第 73 回日本生化学会大会，横浜, 2000.
117. 野原恵子,九十九伸一,遠山千春. ダイオキシンの胸腺細胞分化撹乱作用に関与するシグ

ナル伝達経路，第 23 回日本分子生物学会年会，神戸, 2000.

118. Fujimaki H., Nohara K., Kobayashi T., Tsukumo S., Kijima M. and Tohyama C. Immunosuppression in NC/Nga mice treated with a single oral dose of TCDD. XVII International Congress of Allergology and Clinical Immunology, Sydney 2000.
119. 宮原裕一，西村典子，大迫誠一郎，石村隆太，野原恵子，曽根秀子，遠山千春，米元純三.ダイオキシン類の母ラットから仔への移行に関する研究. 日本薬学会第 120 年会, 岐阜(2000.4)
120. 西村典子，宮原裕一，鈴木純子，佐藤雅彦，佐藤巳喜夫，米元純三，青木康展，遠山千春.ダイオキシン投与ラット肝臓における重金属およびメタロチオネインの変動．第 11 回日本微量元素学会，名古屋 (2000. 6)
121. 米元純三．妊娠ラットに投与した TCDD の仔への影響．第 6 回国際先天異常学会連盟(IFTS)学術集会　第 40 回日本先天異常学会(JTS)学術集会，松江（2000.7）
122. Nishimura N., Miyabara Y., Suzuki J S., Sato M., Yonemoto J., Satoh M., Aoki Y., Tohyama C.Metallothionein as a marker of TCDD-induced oxidative stress in the rat. 20th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants & POPS (Dioxin 2000), Monterey (2000. 8)
123. 米元純三. 妊娠期 TCDD 曝露の仔への影響. 第 41 回大気環境学会年会, 浦和(2000.9)
124. 宮原裕一，米元純三． ダイオキシン類の母親から仔への移行．第 41 回大気環境学会年会，浦和(2000.9)
125. 宮原裕一，竹内陽子，石塚真由美，西村典子，石村隆太，大迫誠一郎，曽根秀子，遠山千春，米元純三．経胎盤および授乳による 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-Dioxin の母親ラットから仔への移行．フォーラム 2000：衛生薬学・環境トキシコロジー，東京(2000.10)
126. 西村典子，佐藤巳喜夫，宮原裕一，大村昌子，米元純三，青木康展，遠山千春，低用量 TCDD によるラット甲状腺ホルモンの変動, 第 16 回日本毒性病理学会, 岐阜, 2000.
127. 西村典子，佐藤雅彦，米元純三，遠山千春，ダイオキシン投与ラット肝臓におけるメタロチオネインの誘導，第 70 回日本衛生学会，大阪，2000.
128. 西村典子, 米元純三, 遠山千春, 低用量 TCDD のラット甲状腺ホルモンに及ぼす影響, 第 70 回日本衛生学会，大阪，2000.
129. Yonemoto J., Ichiki T., Tohyama C. Reproductive effects of offspring exposed maternally to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and association of the effects with the tissue concentrations in Dams and Fetuses/Pups in Long-Evans Rats. 日本内分泌撹乱化学物質学会第 3 回研究発表会, 横浜 (2000.12)
130. Nishimura N., Miyabara Y., Sato M., Tohyama C., Yonemoto J. Alterations in thyroid function in rat offspring transplacentally and lactationally exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 日本内分泌撹乱化学物質学会　第 3 回研究発表会，横浜（2000.12）
131. Miyabara Y., Takeuchi Y., Ishizuka M., Nishimura N., Ishimura R., Ohsako S., Sone H., Tohyama C., Yonemoto J. Disposition of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in pregnant rats. 日本内分泌撹乱化学物質学会　第 3 回研究発表会，横浜（2000.12）
132. Ohsako S., Nishimura N., Miyabara Y., Ishizuka M., Aoki Y., Tohyama C, Sone H., and Yonemoto J. Changes in the reproductive organs of the male rats exposed maternally to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo -*p*-dioxin (TCDD). 38th Ann Meeting of Society of Toxicology, New Orleans, USA (1999)
133. Miyabara Y., Nishimura N., Ohsako S., Ishimura R., Nohara K., Sone H., Tohyama C., and Yonemoto J. Transfer of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin through pregnancy and lactation in rats. 38th Ann Meeting of Society of Toxicology, New Orleans, USA (1999)
134. Nishimura N., Ohsako S., Ishizuka M., Tohyama C, Sone H., and Yonemoto J. Endocrine function of male rats exposed maternally to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). 38th Ann Meeting of Society of Toxicology, New Orleans, USA (1999)
135. Ohsako S., Miyabara Y., Sakaue M., Kurosawa S., Nishimura N., Aoki Y., Tohyama C., Sone H., Ishizuka M., Jana NR., Sarkar S. and Yonemoto J. Effects of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the Development of Male Reproductive

Organs in the rats. 19th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (Dioxin99), 1999.

136. 大迫誠一郎, 宮原裕一, 坂上元栄, 黒沢修一, 西村典子, 石塚真由美, 青木康展, 遠山千春, 曽根秀子, NR.Jana, S.Sarkar, 米元純三. 妊娠ラットへの低用量 TCDD 曝露による雄性生殖器官の変異.精巣毒性研究会,東京 (1999)
137. 大迫誠一郎, 宮原裕一, 坂上元栄, 黒沢修一, 西村典子, 石塚真由美, 青木康展, 遠山千春, 曽根秀子, NR.Jana, S.Sarkar, 米元純三. ダイオキシンによる雄性生殖機能の変異.日本繁殖学会,仙台 (1999)
138. Ohsako S., Sakaue M., Ishimura R., Kurosawa S., Yonemoto J., and Tohyama C. Effects of low-dose bisphenol-A on rat spermatogenesis. International Symposium on Environmental Endocrine Disruptors '99, Kobe, JAPAN (1999)
139. Ishimura R., Ohmura M., Miyabara Y., Ohsako S., Nishimura N., Sakaue M., Kurosawa S., Sone H., Yonemoto J., and Tohyama C. Abruption of placental maturation by mid-pregnant exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in Holtzman rats.第 2 回日本外因性内分泌攪乱化学物質学会, 神戸, (1999)
140. Kurosawa S., Ohsako S., Ishimura R., Sakaue M., Kimura J., Takeda K., Yonemoto J., and Tohyama C. Analysis of mechanism for anti-androgenic effect of vinclozolin on spermatogenesis in the adult rat.第 2 回日本外因性内分泌攪乱化学物質学会, 神戸, (1999)
141. Nohara K., Fujimaki H., Ushio H., Kijima M., Tsukumo S., Kobayashi T., Miyabara Y., Sone H., Tohyama C. and Yonemoto J. Effects of perinatal exposure to low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on thymus and spleen lymphocytes in rats, 日本内分泌撹乱化学物質学会第 2 回研究発表会, 神戸, 1999.
142. Sone H., Jana N.R., Sarkar S., Ishizuka M., Tohyama C. and Yonemoto J. Cross-Talk Between 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and Tertosterone Signal Transduction Pathways in LNCaP Prostate Cancer cells, 19th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (Dioxin99), 1999.
143. Suzuki C., Yonemoto J., Watanabe S., Kabuto M., Tohyama C. and Sone H. Analysis of CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 Gene Expression Levels in Blood Using a Real-Time Reveres Transcription-PCR System, International Conference on Chytochrome P450, 仙台,1999.
144. Jana N.R., Kusumegi T., Sarkar S., Yonemoto J., Tohyama C. and Sone H. Strain difference in cytochrome P4501A1 gene expression cause by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the rat liver, International Conference on Cytochrome P450, 仙台, 1999.
145. Nohara K., Fujimaki H., Ushio H., Kobayashi T., Tsukumo S., Kijima M., Miyabara Y., Yonemoto J. and Tohyama C. Changes in thymocyte development and thymic emigrants in rats exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, 19th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (Dioxin99), Venice, 1999.
146. 野原恵子, 藤巻秀和. ダイオキシンと Th1/Th2 バランス, 第 6 回免疫毒性研究会, 仙台, 1999.
147. 野原恵子, 牛尾博子, 藤巻秀和. ダイオキシンが胸腺細胞の分化と末梢リンパ球構成におよぼす影響, 第 29 回日本免疫学会総会学術集会,京都, 1999.
148. 九十九伸一, 木嶋美香, 遠山千春, 野原恵子. マウス胎仔胸腺に及ぼす 2,3,7,8-TCDD の影響, 第 22 回日本分子生物学会年会, 福岡, 1999.
149. 米元純三, 発生毒性—ダイオキシンを中心として—, 第 72 回日本産業衛生学会, 東京, 1999.
150. 米元純三, 曽根秀子, 大迫誠一郎, 西村典子, 野原恵子, 藤巻秀和, 牛尾博子, 宮原裕一, 青木康展, 石塚真由美, NR Jana, S Sarkar, 遠山千春, TCDD の胎児期・授乳期曝露が雄ラットにおよぼす影響, 第 26 回日本トキシコロジー学会学術年会, 札幌, 1999.
151. 米元純三, 内分泌撹乱物質のリスク評価, 第 39 回日本臨床化学会年会, 京都, 1999.
152. Yonemoto J., Jana N.R., Sarkar S., Kusumegi T., Tohyama C. and Sone H. Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor and Its Nuclear Translocator in a Strain Difference of Cytochrome P4501A1 Gene Expression Induced by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the Rat Liver,

日本内分泌撹乱化学物質学会第 2 回研究発表会, 神戸, 1999.

153. Miyabara Y., Nishimura N., Ohsako S., Ishimura R., Nohara K., Sone H., Tohyama C. and Yonemoto J. Tissue Concentrations of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-Dioxin in Dams and Pups of Rats Exposed Throughout Pregnancy and Lactation, 日本内分泌撹乱化学物質学会第 2 回研究発表会, 神戸, 1999
154. Nishimura N., Ohsako S., Sarkar S., Miyabara Y., Tohyama C., Sone H., Yonemoto J. Effect of Gestational and Lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on Pituitary and Thyroid Hormone Levels in Male Rats. 19th International Symposium on Halogenated Environmental organic Pollutants and POPs (Dioxin 99), Venice, 1999.
155. Nishimura N., Sato M., Miyabara Y., Ohmura M., Yonemoto J., Aoki Y., Tohyama C. Changes in Thyroid Hormones in Female Sprague Dawley Rats following a Low Dose of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenso-*p*-dioxin.日本内分泌撹乱化学物質学会第 2 回研究発表会, 神戸, 1999.

(3)特許出願（国内　0件、海外　0件）

①国内　　なし

②海外　　なし

(4)新聞報道等

① 新聞報道

しんぶん赤旗　H15.7.13　科学のひろば

「ごく微量ダイオキシン母親から子へどう影響？」

新潟日報　H11.2.9　スピーカー「母乳育児の推奨は変わらぬ」

河北新報　H11.2.1　サイエンスNOW「アトピー発症に差ない」

②受賞　なし

③その他　なし

(5)その他特記事項

なし

7. 結び

まず、この 5 年間大変お世話になった科学技術振興機構の担当の皆さま、とりわけ渋谷の領域事務所の方々に厚く御礼申し上げます。

(1) 研究の目標からみた達成度、得られた成果の意義、今後の研究展開など：

開始直前の 98 年まで、ダイオキシンのリスク評価に関する原著論文は、日本からほとんど発信されていませんでした。わずかに、カネミ油症に関する若干の論文や藤井義明先生のアリール炭化水素受容体に関する分子生物学レベルの先駆的なお仕事などでした。

CREST のご支援をいただき、私たちの研究だけでも論文として 60 件、学会発表で 150 件あまりの発表を行うことができました。その結果、米国毒性学会やダイオキシン国際会議などで、国立環境研究所あるいは CREST の研究として認知されるようになりました。戦略的基礎研究費による成果は、さらに 10 件近くの論文を発表する予定です。

野原が Journal of Immunotoxicology、私が米国毒性学会の学会誌 Toxicolgical Sciences や米国神経毒性学会の学会誌 Neurotoxicology 誌の Editorial Board の一員にノミネートされたことは、我々のグループの研究成果が認められたことと自負しています。また、今年のボストンにおけるダイオキシン国際会議の場で、2007 年の国際会議を日本で開催するようにと、国際組織委員会から直接要請を受けています。

研究内容における達成度をとりまとめて言うと、低用量の TCDD 曝露により新たな影響が観察されることが十二分に示されたことと考えています。今後、この実験条件で観察されたことのうち、特定の影響指標について実験条件の絞り込みができるものについては、マイクロアレイを用いて網羅的に遺伝子発現の解析を行い、その毒性プルファイルを決める予定にしています。

さらに、TDDD と同様の毒性を有するとされているコプラナーPCB（最近は、ダイオキシン様 PCB と呼ぶ場合が多い）は、一方で非 TCDD 毒性を併せ持っています。この非 TCDD 毒性のリスク評価を行う取り組みも、EU や WHO により開始されました。しかし、科学的知見が乏しいのが実状であり、我々が今回用いた PCB77、118、あるいは 153 に関する知見をもとに、さらに研究を展開することを予定しています。

また、生殖機能、脳機能、免疫機能の各グループにおいて、もう一押しの研究課題が残されています。研究費の獲得の問題がありますが、そのうちのいくつかはさらに発展させたいと考えています。

(2) プロジェクト運営について：

国立研究機関の問題として、備品や消耗品に使える予算はありますが、大きな大学の研究室とは異なり学生や若手研究員に乏しいため、研究資源が有効に利用でき

ていないということがあります。

CREST 研究費により、ポスドク、技術員、補助員を各グループのシニア研究員のもとにおくという研究遂行のための最小単位を形成することができ、その結果として、それぞれのグループ単位で活発に仕事をすることができました。申請の段階から研究費の大半を人件費に使用させて頂きたいことをお願いして認めて頂きましたが、CREST 研究費を頂戴した最大のメリットは、優秀な若手の方々を採用できたことだったといっても過言ではないと思います。

(3) 戦略的基礎研究推進事業について：

予算を切れ目無く、かつ、チームリーダーの裁量の下で使わせていただき、大変有りがたかったということに尽きます。

「内分泌かく乱物質」領域の集まりを通して、関連研究者と研究面での交流や共同研究も発展しました。貴重な経験をさせていただき有りがたく思っています。