

2. ダイオキシン胎生期・授乳期暴露のアカゲザル児の生後発育に及ぼす影響

分担研究者 広島国際大学保健医療学部診療放射線学科 教授 隅田 寛

研究協力者 広島大学原爆放射線医科学研究所放射線再生医学研究部門 助教授 藤本成明

研究協力者 株式会社新日本科学 安全性研究所 有馬昭宏

研究要旨

TCDD の最小毒性量は、おもにラットによる実験を基本にして定められた。この最小毒性量投与によりラット雌仔の生殖器形態異常あるいは雄仔の精子数減少が認められている。そこで、2,3,7,8-四塩化ジベンゾパラジオキシン（以下 TCDD）が霊長類の児精巣に与える影響を検討する目的で、アカゲザルに妊娠期から授乳期にかけて TCDD を体内負荷量換算で最小毒性量の 1/3 量（低暴露量群）または 3 倍量（高暴露量群）になるように負荷した。また、第一産児（F1a）が親離れした後、再度妊娠（F1b）させ、TCDD を F1a 児の場合と同様に負荷した。今回は F1b 児を生後約 850 日程度で剖検し、精巣上体について組織学的に検討した。その結果、TCDD 暴露群の精巣上体管では、上皮細胞の細胞死の増加や空胞化などの変化が示唆された。精巣組織の変化に明確な TCDD 暴露量依存性は認められなかったが、今回の結果から、霊長類においても TCDD の母体負荷によってその児の精子形成や精子成熟に影響が及ぶ可能性が示された。また、精子数に関しては、高暴露量群に明らかな低下が認められた。AhR の塩基配列についても検討を行い、5'末端の配列が、従来報告されている配列と異なることを見出した。AhR の配列から、アカゲザルはヒトに比較してダイオキシンに対する感受性が高いものと思われた。

A. 研究目的

ダイオキシンの発生毒性について、ヒトでのリスク評価に有用な知見を得ることが本研究の目的である。ダイオキシン類の発生毒性に関しては、齧歯類による実験から、雌雄生殖器異常、口蓋裂、水腎症、免疫異常などが報告されているが、代謝時間あるいは代謝メカニズムの違いから、必ずしもヒトに当てはめて考えることが妥当であるとは言い切れない。事実、ヒト暴露例で暴露世代に生じた毒性は、齧歯類での実験例

とは差が認められる。そこで、胎生期・授乳期を通して 2,3,7,8-四塩化ジベンゾパラジオキシン（TCDD）の暴露を受けたアカゲザルの児に生じた影響を検証することにより、ヒトでのリスク評価、すなわち現在一日摂取量の根拠となっている最小毒性量（LOEL）の検証を行った。

B. 研究計画

TCDD 30 ng/kg（F1b については 20 ng/kg）または 300 ng/kg（F1b については 200

ng/kg) の母体内負荷量に暴露されたアカゲザル雄児の生殖能を検討するために、精巣、精巣上体を中心としてそれらの発育に与える影響を調べた。投与量はそれぞれ体内負荷量換算で齧歯類での実験で得られた LOEL の約 1/3 量と約 3 倍量である。サルは平成 11 年度に開始され、平成 18 年度にはその初産児 (F1a) は 6 歳になり、年齢的に平成 18 年冬頃には受精能力の検証が可能となったことから交配試験を開始した。なお、サルは鹿児島の新日本科学株式会社で飼育している。

平成 18 年度には、F1a の雄児の精子形成について検討した。また、児から抽出した RNA を材料に、AhR の塩基配列の同一性を検討し、ヒトとの感受性の差についての検討を継続した。それらの結果を踏まえて、現在基準として考えられている胎生毒性としての LOEL の妥当性について総合的に評価した。

(倫理面への配慮)

動物は新日本科学(SNBL)のサル実験施設の「動物実験ガイドライン」に従い愛護的に扱い、また実験者が TCDD からの悪影響を受けないように配慮した。

C. 研究結果

昨年度までに、生後死亡例と F1b のと殺例に、形態的な児の歯および腎臓の異常と精巣の変化が観察されている。このうち、歯の異常と腎臓の異常は 300 ng/kg 投与群のみに認められたことを、昨年度までに発表した。今回、F1b 屠殺例の精巣上体について形態的に調べた結果、20 ng/kg 投与群の児精巣上体に変化が認められた (図

1)。

現時点での生存 F1a 雄児は、対照群 4 匹、30 ng/kg 投与群 6 匹、300 ng/kg 投与群 5 匹である。生後 78 ヶ月時点でのそれぞれの体重 (Kg) は、対照群 5.23 kg±1.11、30 ng/kg 群 5.79 Kg±0.96、300 ng/kg 群 5.23 kg±1.08 であり、群間に差は認められなかった。しかし、雌雄別に体重を分類すると、雄では対照群 6.35 kg±0.73、30 ng/kg 群 6.46 Kg±0.69、300 ng/kg 群 5.56 kg±1.22 であり、300 ng/kg 群で有意に体重増加遅延が認められた。

今回、F1b 屠殺例の精巣上体について形態的に調べた結果、20 ng/kg 投与群の児精巣上体に変化が認められた (図 2)。精巣の大きさ (mm) は、各群に有意差は認めなかったが、対照群と 300 ng/kg 群がほぼ同じ値であったに対して、30 ng/kg 群では数値が高い傾向にあった。

陰茎長 (mm) についても、対照群と 300 ng/kg 群ではほぼ同じ数値であったが、30 ng/kg 群では対照群に比較して有意に高い数値であった。

平成 18 年度には、生存 F1a 児の精子数のデータが得られている。精子数は TCDD 容量依存的に低下していた (図 2)。

アカゲザル AhR の塩基配列を決定するために、血液サンプルから RNA を調整して、cDNA を作成した。塩基配列に関しては、最近他の研究機関からデータベースに登録されたが、5'末端の配列については、我々の cDNA サンプルからは再現性が得られなかった (図 3)。データベース上の塩基配列の比較の結果、ヒト AhR との同一性は高かった。

D. 考察

精巣変化と精子形成、成熟の確認

齧歯類での実験で得られている結果では、TCDD の発生毒性における最小毒性は生殖器官異常である。今回、齧歯類での LAOEL より低い 30 ng/kg 暴露量でも精子数に変化が認められたことは、霊長類での詳細な検討の必要性を示している。ヒト例では、妊娠率に有意差は認められていないが、比較的低暴露量群にも性比に有意差が認められるとされる。そのため、TCDD 暴露群の精子形成を検討した結果、対照群に比較して精子数に明らかな差が認められた。このことから、ダイオキシン類の暴露により、次世代の生殖能力に影響が及ぶことが示唆された。

動物種により、TCDD に対する感受性が大きく異なることが知られている。今回アカゲザル AhR の塩基配列の同定を試みたが、研究期間中に他研究機関より塩基配列データベースへの登録がなされた。その配列に比較して、5'末端に配列について、われわれの結果と異なったが、その差がどの程度 AhR の機能に本質的に関連するかは不明である。文献的¹⁾には、ニワトリとアジサシの TCDD に対する感受性の差は、アジサシ AhR の 325 番目のアミノ酸残基と 381 番目のアミノ酸残基がニワトリ AhR と異なることに起因するとのことである。この部に相当するアカゲザルのアミノ酸残基は Ala であり、C57BL マウスやアジサシと同じであるが、ヒトでは Val であり、アカゲザルの TCDD に対する感受性はヒトよりも高いと予想される。

以上のことから、現在の耐容一日摂取量が直ちに具体的なリスクを有しているとは

言えないが、その再検討を行うことが望ましいと考えられる。

E. 結論

霊長類での TCDD の次世代に与える影響を視点として次世代に与えるリスクを評価した結果、TCDD の高暴露量により、児の生殖に影響が認められた。総合的に判断して、現在の耐容一日摂取量は一応妥当であると思われる。現在の例数では明確な結論を提示することは困難であるが、低暴露量によってもある程度の影響が認められるので、今後のデータ蓄積の状況次第では、耐容一日摂取量の再検討が必要となるかも知れない。

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tokuda N, Arudchelvan Y, Sawada T, Adachi Y, Fukumoto T, Yasuda M, Sumida H, Shioda S, Fukuda T, Arima A, Kubota S: PACAP receptor (PAC1-R) expression in rat and rhesus monkey thymus. The Annals of the New York Academy of Sciences, 1070: 581-585, 2006.

2. 学会発表

安田峯生、安田以久、隅田寛、有馬昭宏、久保田俊一郎、アカゲザルにおける第3大白歯欠如。第46回日本先天異常学会 要旨集 P136 2006 山形

有馬昭宏、久米村政司、花木紘太郎、西田

善郎、松山隆史、今井統隆、立石大志、久保田俊一郎、隅田寛、安田峯生、伊原敏夫、TCDD 胎生期・授乳期暴露を受けたアカゲザルの性成熟に対する検討。第 46 回日本先天異常学会 要旨集 P137 2006 山形

隅田寛、安田峯生、有馬昭宏、福里利夫、久保田俊一郎、TCDD の胎児・授乳期暴露を受けたアカゲザル児精巣上体の変化。第 46 回日本先天異常学会 要旨集 P137 2006 山形

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得：

特になし

2. 実用新案登録

該当しない

3. その他（データベース等）

該当しない

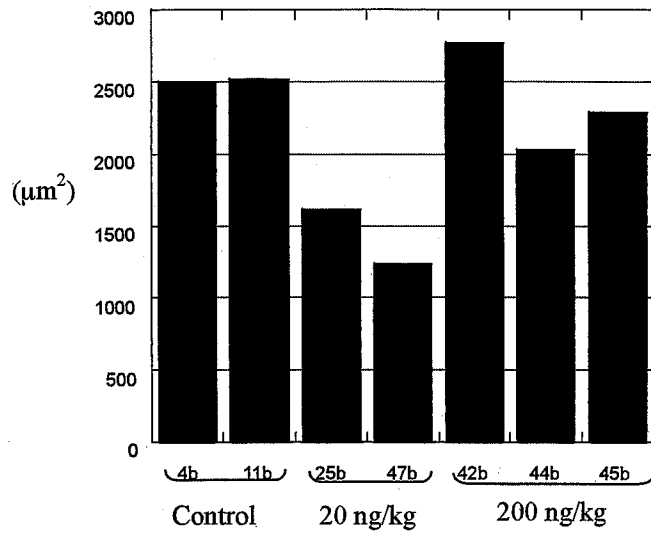


図1 精巣上体単位面積 (10,000 μm²) あたりの精巣上体管面積

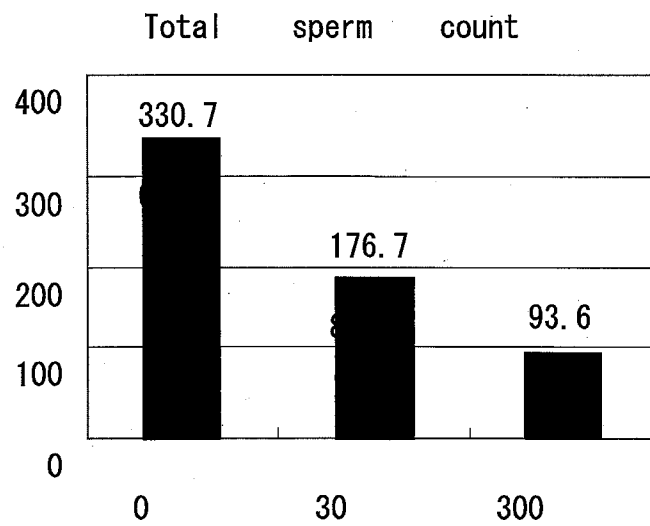


図2 F1a 児の精子数

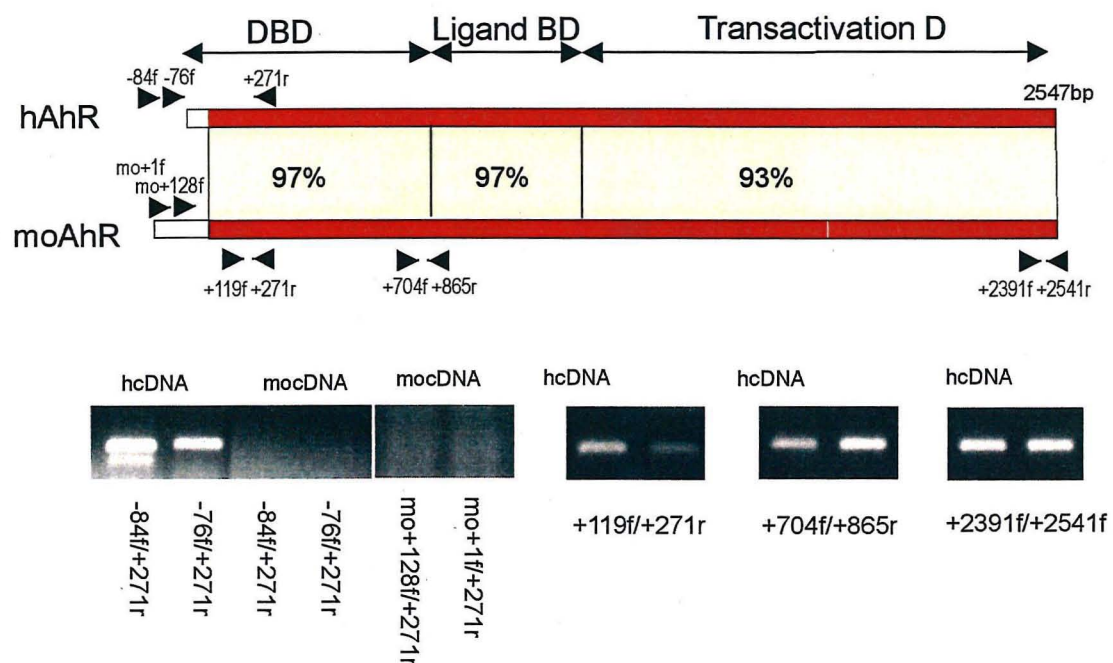


図3 アカゲザル AhR とヒト AhR アミノ酸配列の相同性比較