

国立環境研究所特別研究報告

Report of Special Research from the National Institute for Environmental Studies, Japan

SR - 50 - 2003

ダイオキシン類の体内負荷量および
生体影響評価に関する研究
(ダイオキシン類対策高度化研究)

Exposure and health effects assessment of dioxins

平成 12 ~ 14 年度

FY 2000 ~ 2002

NIES



独立行政法人 国立環境研究所

NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

<http://www.nies.go.jp/index-j.html>

ダイオキシン類の体内負荷量および
生体影響評価に関する研究
(ダイオキシン類対策高度化研究)

Exposure and health effects assessment of dioxins

平成 12 ～ 14 年度

FY 2000 ～ 2002

ダイオキシン類対策高度化研究「ダイオキシン類の体内負荷量および生体影響評価に関する研究」
(期間 平成 12 ~ 14 年度)

特別研究責任者：森田昌敏

特別研究幹事：米元純三

報告書編集担当：米元純三

序

本報告書は、平成 12 年度から 14 年度にかけて実施したダイオキシン類対策高度化研究「ダイオキシン類の体内負荷量および生体影響評価に関する研究」をとりまとめたものである。

このプロジェクトは、平成 9 年度から 11 年度にかけて実施された特別研究「環境中の「ホルモン様化学物質」の生殖・発生影響に関する研究」の成果を踏まえて企画された。この先行する特別研究において、ラット、マウスを用いた動物実験により、ダイオキシンについて、内分泌かく乱作用の感受性が高いこと、成熟期に比べて、胎児期・新生児期の感受性が高いことを明らかにした。ヒトにおけるダイオキシン類のリスク評価のためには、ヒトにおける曝露量、体内負荷量がどうなっているのか、それによってヒトにおいてどのような影響がでているのか、それをどのように評価したらよいのか、が必要になってくる。また、ヒトの集団といっても、乳児から老人までさまざまな人々が含まれている。中には感受性の高い集団が存在する。ヒトの集団のリスク評価においては、感受性の異なる人々から構成されていることを念頭に置かなくてはならない。

このような背景を踏まえ、本研究では、ヒトの曝露量評価、生体負荷量評価を、特に感受性が高いと考えられる胎児、乳児に焦点を当てて行った。

胎児環境でのダイオキシン曝露として羊水、胎脂のダイオキシン濃度を調べた。また、乳児の最大の曝露源である母乳について、母乳中ダイオキシン濃度と母親の食事との関係について調査した。

生体影響指標に関する研究では、新たな指標検索の基礎的検討として、DNA マイクロアレイを用いた新規ダイオキシン応答遺伝子の検索を行った。また、従来の血液サンプルに加えて、母乳サンプルにおける生体影響指標測定の可能性について検討した。

ダイオキシンに対する感受性の決定要因に関する研究においては、ダイオキシンの影響発現を仲介すると考えられている Ah レセプターやダイオキシンによって鋭敏に動くと考えられている薬物代謝酵素、CYP1A1 について分子レベルでの検討を行った。また、ダイオキシンの感受性要因としてのステロイドホルモンのシグナル伝達と、細胞周期のかかわりについて検討を行った。

ヒトのサンプルの入手の困難さ、インフォームドコンセントの問題などがあり、必ずしも十分なサンプル数が得られなかったが、ここで得られた、ヒトに関するデータは、ダイオキシンのリスク評価において貴重な基礎資料となるものと思われる。

おわりに、研究を進める上で研究所外の多くの方々に、ご協力とご助言をいただいた。ここに深く感謝の意を表します。

平成 15 年 9 月

独立行政法人 国立環境研究所
理事長 合 志 陽 一

目 次

1	研究の目的と経緯	1
1.1	研究の目的.....	1
1.2	研究の構成.....	1
2	研究の成果	2
2.1	ダイオキシン類の曝露量，体内負荷量の評価に関する研究.....	2
2.1.1	羊水および胎脂中のダイオキシン類濃度.....	2
2.1.2	食習慣の異なる地域における母乳中ダイオキシン類濃度.....	3
2.2	生体影響指標の適用可能性の検討および新規指標の検索・開発に関する研究.....	5
2.2.1	PCR 法による血液中 CYP 類発現解析法の確立	6
2.2.2	埼玉県および大阪府の住民における血液中ダイオキシン類濃度と CYP1A1，CYP1B1 発現との関連	7
2.2.3	母乳細胞を用いた CYP 類発現解析法の確立	15
2.2.4	ダイオキシン応答遺伝子の探索.....	16
2.3	ダイオキシン類に対する感受性の決定要因に関する研究.....	19
2.3.1	多型検出法の確立	19
2.3.2	AhR リガンド結合にかかわる領域の同定.....	20
2.3.3	感受性要因としてのステロイドホルモンのシグナル伝達と細胞周期.....	21
2.4	まとめ.....	25
[資 料]		
	研究の組織と研究課題の構成	31
1	研究の組織	31
2	研究課題と担当者	31
	研究成果発表一覧	32
1	誌上発表	32
2	口頭発表	34

1 研究の目的と経緯

1.1 研究の目的

ダイオキシン類のヒトの健康への影響、ことに感受性が高いと考えられる胎児、新生児への影響が懸念されている。ヒトがダイオキシン類にどの程度曝露されており、またそれによってどの程度影響が起きているかについてはほとんど分かっていないのが現状である。特に胎児、新生児への影響については、それを評価する適切なバイオマーカーがないことが大きな原因である。

毒性が強く、難分解性、蓄積性の高いダイオキシン類（ジベンゾダイオキシン、ジベンゾフラン、コプラナーPCB）への曝露の実態、体内負荷量の把握、バイオマーカーによる生体影響評価は、緊急かつ重要な課題である。それは我が国においてはゴミ処理の多くを焼却に頼り、排ガス規制の緩さと相まって大気中のダイオキシン濃度が先進諸国の中でも際だって高いこと、また、かつて水田に大量に散布された農薬に不純物としてダイオキシンが含まれており、土壌汚染、河川・海の汚染、底質の汚染を通して魚介類の汚染に寄与していると考えられることから、魚食の多い日本人においては、ダイオキシン類の摂取量が相対的に高いと考えられるからである。

1998年、WHOにおいてダイオキシンの一日耐容摂取量(TDI)の見直しが行われ、従来の10 pg/kg/dayから1~4 pg/kg/dayへと改訂された。この根拠とされたのはアカゲザルの子宮内膜症のほか、妊娠動物への投与による子への影響、すなわち生殖・発生影響に関する動物実験であり、ヒトに関するデータは用いられていない。今回のTDIの設定においてはBody burden(体内負荷量)アプローチが採用された。これはダイオキシンによる作用は、同じ体内負荷量では種を越えてほぼ同じという考えに基づいている。しかしながら実験動物とヒトとは影響項目によっては、その作用の起きる体内負荷量が大きく異なるものがある。ヒトへの生殖影響がどの程度の体内負荷量で起きるかについてはまだよく分かっていない。ヒト(特に妊婦、胎児、新生児)がどの程度のダイオキシンの体内負荷量があるのか、その場合、どの程度の反応が起きているのか、どの程度の生体影響の

スクがあるのかを明らかにする必要がある。

本研究では、1)ダイオキシン類の曝露量、体内負荷量を評価し、2)生体影響指標(バイオマーカー)の検索・開発を行い、3)体内負荷量との関係を検討し、その中で感受性の決定要因を明らかにする。これらにより、ダイオキシン類の生体影響、特に胎児、新生児への影響にかかわるリスク評価のための基礎資料を提供することを目的とする。

1.2 研究の構成

ダイオキシン類の成人、母体、胎児における曝露量、体内負荷量と生体影響指標との関係を検討し、ダイオキシン類の生体影響、特に胎児、新生児への影響にかかわるリスクを評価する。

以下の課題に関する研究を行う。

課題1 ダイオキシン類の曝露量、体内負荷量の評価に関する研究

ヒトにおけるダイオキシン類の曝露量、体内負荷量を評価するために、血液、脂肪 組織中のダイオキシン類濃度を測定する。また、胎児、新生児への影響の観点から産婦人科学的試料についても測定する。

課題2 生体影響指標の適用可能性の検討および新規指標の検索・開発に関する研究

ダイオキシン類の曝露によって鋭敏に動くと考えられる生体指標について、ヒトのサンプルでの測定法の確立を行う。収集したサンプルについて、上記の検討に基づき、生体指標の測定を行う。生体影響指標と曝露量、体内負荷量との関係からこれらの指標の適用可能性を検討する。また、ダイオキシン類の作用メカニズムに関する知見などに基づき新規指標の検索・開発を行う。

課題3 ダイオキシン類に対する感受性の決定要因に関する研究

ダイオキシン類に対する感受性種差、ヒトにおける感受性差を決定している要因を Ah レセプターを中心に分子レベルで明らかにする。また、感受性要因としてのシグナル伝達と細胞周期のかかわりを明らかにする。

2 研究の成果

2.1 ダイオキシン類の曝露量，体内負荷量の評価に関する研究

これまでの動物実験の結果や疫学調査の結果から，ダイオキシンへの感受性は，胎児期，乳児期が高いと考えられている。ヒトにおいて胎児がどのくらい曝露されているのかを知る目的で，大学の産婦人科の協力を得て，羊水，胎脂（出産時に新生児の皮膚表面に付着している脂肪分）中のダイオキシン濃度を測定した。また，乳児が母乳からどのくらい曝露され，その母乳の濃度は食事によってどの程度影響を受けるのかを調べる目的で，母乳中ダイオキシン類濃度と食事との関係について検討を行った。

2.1.1 羊水および胎脂中のダイオキシン類濃度

成人と比べ，胎児は臓器が未分化あるいは発達途中であるため化学物質に対し感受性が高く，妊娠期のダイオキシン類曝露によって胎児に不可逆的でより深刻な影響が現れるのではないかと懸念されている。妊娠期のダイオキシン類曝露のリスク評価を行う際，その影響とともに曝露量の評価を行う必要があるが，胎児そのもののダイオキシン類含量の分析例は数少なく，母親の血中濃度等から類推するしかなかった。本調査では，より正確な胎児のダイオキシン類曝露量の評価を行うため，東京大学医学部産科婦人科学教室の協力を得て，羊水と胎脂中のダイオキシン類濃度を測定し，胎児のダイオキシン類曝露の評価を試みた。

(1) 羊水中ダイオキシン類濃度

妊娠期間中，胎児に由来する老廃物の一部は羊水に移行し，胎児は羊水中の化学物質に曝露されている。すなわち，羊水のダイオキシン類濃度は，胎児のダイオキシン類曝露の実態を反映していると言える。インフォームドコンセントのもと，出産時に羊水を採取し，ダイオキシン分析に供した。16 検体について，TEF* の与えられているダイオキシン（PCDDs），フラン（PCDFs）およびコプラナー PCBs（Co-PCBs），計 29 種類の異性体を対象とし，定法に従い試料を精製した後，高分解能 GC/MS で，内部標準法により定量を行った。羊水中のダイオキシン類濃度は，湿重量およびヘキサン抽出物

（脂質）あたり，それぞれ， 0.016 ± 0.015 pg-TEQ*/wet-g， 53.1 ± 30.8 pg-TEQ/g-fat であった（図 1）。29 異性体のうち最も濃度が高かったのは，PCB#118（2,3,4,4',5-塩化ビフェニル）であったが，TEQ に占める Co-PCBs の寄与は小さく，全体の 2 割余りであった。

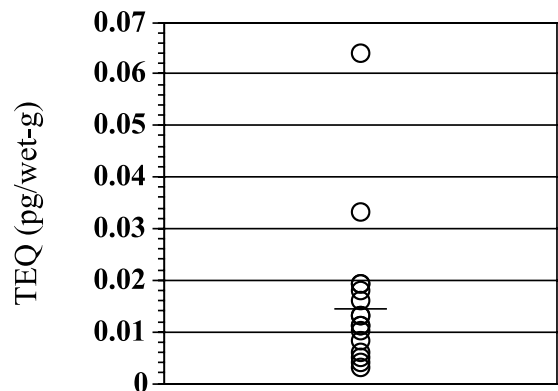


図 1 羊水中ダイオキシン類の湿重量あたりの濃度
平均値をバーで示す(0.016 pg TEQ/wet-g)。n=16

(2) 胎脂中ダイオキシン類濃度

妊娠期間中，胎児に由来する老廃物の一部は胎脂として胎児に付着し，出生時に採取することができる。胎脂は胎児由来の老廃物であり，そのダイオキシン類曝露の実態を反映していると考えられるが，その分析例は皆無である。インフォームドコンセントのもと，出産時に胎脂を採取し，ダイオキシン分析に供した。18 検体について，TEF の与えられているダイオキシン（PCDDs），フラン（PCDFs）およびコプラナー PCBs（Co-PCBs），計 29 種類の異性体を対象とし，定法に従い試料を精製した後，高分解能 GC/MS で，内部標準法により定量を行った。胎脂中のダイオキシン類濃度は，湿重量およびヘキサン抽出物（脂質）あたり，それぞれ， 2.39 ± 1.14 pg-TEQ/wet-g， 24.9 ± 10.6 pg-TEQ/g-fat であった（図 2）。29 異性体のうち最も濃度が高かったのは，羊水同様 PCB#118 であった。また，TEQ に占める Co-PCBs の寄与は，羊水よりも大きく，全体の約 3 割余りであった。

(3) まとめ

羊水中の脂質含量は 0.1 %未満ときわめて少なく，ま

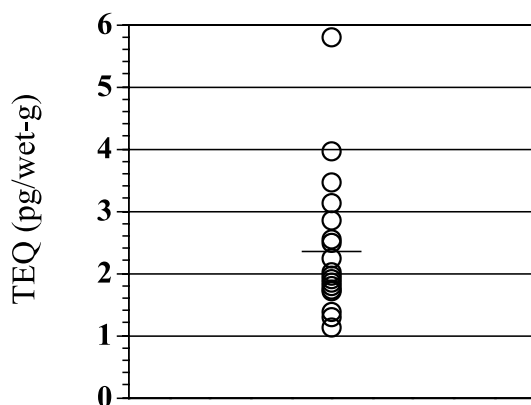


図2 胎脂中ダイオキシン類の湿重量あたりの濃度
平均値をバーで示す(2.39 pg TEQ/wet-g)。n=18

た羊水ではPCDFsなど多くの異性体が検出限界以下であったため(TEQ算出時には検出限界の1/2を採用し加算),羊水の脂質あたりのダイオキシン類濃度は高く見積もられている。一概に,羊水で高く,胎脂で低いとは言えない。Choiらは,2000年に採取したヒト脂肪組織中のダイオキシン類濃度は,PCDDs/PCDFsが 11.9 ± 7.4 およびCo-PCBsが 15.3 ± 8.2 pg-TEQ/g-fatと報告しており,今回測定した胎脂のダイオキシン類濃度範囲とほぼ一致した。したがって,脂質あたりの濃度では,胎児も母親と同等であると言える。しかし,ヒト脂肪組織では,TEQへの寄与がPCDDs/PCDFsよりもCo-PCBsの方が大きく,羊水や胎脂とは異性体組成が異なり,体内の脂肪組織に蓄積するダイオキシン類と,体外へ排泄されるダイオキシン類の組成が異なることが示された。いずれにしても,妊娠中に胎児はダイオキシン類曝露を受けていることが示され,今後,さらに胎児のダイオキシン類曝露の調査を続ける必要があると考えられる。

* TEF, TEQ

ダイオキシン類は,塩素の数と入る位置により多くの異性体,同族体が存在する。それらの存在量や毒性を個別に表すのは大変煩雑なので,アリルヒドロカーボン(Ah)レセプターという受容体を介して,その作用をおよぼすという共通の作用メカニズムをもつ化合物については,一番毒性の強い2,3,7,8-四塩化ジベンゾ-p-ダイオキシン(TCDD)を1として,それに対する相対的な毒性の強さ,毒性等価係数(TEF)が定められている。現在のところ,ダイオキシン7種類,ジベンゾフラン10種類,コプラナーPCB12種類にTEFが付与されている。

環境中のダイオキシン類は単独の物質として存在していることはまれで,多くの場合,混合物として存在している。混合物としてのダイオキシン類の量は,個々の化合物のTEFに存在量をかけたものの和,毒性等価量(TEQ)として表される。

2.1.2 食習慣の異なる地域における母乳中ダイオキシン類濃度

これまでの動物実験や,ヒトの疫学調査の結果から,ダイオキシンに対する感受性は,胎児期,乳児期が高いと考えられている。一方,ダイオキシン類の代謝は非常に緩やかで,ヒトでの半減期は5年から10年といわれ,主に脂肪組織に蓄積し,ふん中にわずかに排泄される。唯一の例外は母乳で,母乳は脂肪に富むことから,母乳からは比較的多くのダイオキシン類が排泄される。母乳中には10~30 pptのダイオキシン類が含まれているため,乳児のダイオキシン摂取量は体重あたり成人の30倍近くになる。乳児は感受性が高いと考えられることもあってその健康への影響が懸念されている。通常の人口集団の場合,ダイオキシンの主な摂取経路は食事である。特に日本人の場合は,そのうちの60%程度が魚介類に由来すると考えられている。以上のような背景を踏まえて,乳児のダイオキシン曝露を評価し,母乳中ダイオキシン濃度への魚食の影響を調べる目的で日本の沿岸の3つの市町村で母乳の調査を行った。

対象地域は,北海道のA市,沖縄県のB町,長崎県のC町の3地域である。インフォームドコンセントのもと,それぞれの地域から,7,20,7名の方から母乳の提供を受けた。また,質問紙による自記式の食事調査を行った。対象者の平均年齢および範囲は,A,B,C地域それぞれ,28.4歳(25~31歳),29.8歳(20~41歳),27.6歳(21~35歳)であった。13種類のPCDD,15種類のPCDF,12種類のCo-PCBをGC/MSにより測定した。I-TEQの算出には,このうちTEFの与えられている7種類のPCDD,10種類のPCDF,12種類のCo-PCBの測定結果を用いた。年間を平均した魚類,肉類,乳製品・卵の一日あたり摂取量は,質問紙の結果に基づき算定した。

母乳中のダイオキシン類濃度の平均と範囲は,A,B,Cの各地域において,それぞれ8.9(3.8~16.4),7.2(5.3~10.0),13.1(2.1~29.7) pg I-TEQ/g-fatであった(図3)。これは厚生労働省から報告されている日本

人の母乳中レベルの範囲内であった。地域間の比較では、B 地域が C 地域に比べて有意に低かった。Co-PCB 濃度は、年齢と相関する傾向がみられた ($p=0.08$) がダイオキシン濃度ではみられなかった。各地域ごとの魚類、肉類、乳製品・卵の摂取量を図 4 に示す。摂取量は量と頻度から指標化した。A 地域は、魚類、肉類の摂取が他の 2 地域に比べて少ない。A 地域の肉の摂取は B 地域に比べて有意に低かった ($p < 0.05$)。乳製品・卵の摂取量は各地域で差はなかった。地域間の摂取量のデータからは、地域間の母乳中ダイオキシン、Co-PCB の差を説明できない。

3つの地域のデータをあわせ、魚類、肉類、乳製品・

卵の摂取の多少（摂取インデックス 200 以上を「多い」、200 以下を「少ない」とした）と母乳中のダイオキシン、Co-PCB 濃度の関係を調べた（図 5 A, 5 B）。ダイオキシン、Co-PCB とも魚類の摂取の多少でのみ有意差が認められた。さらに魚類と肉類の摂取の多少の組み合わせによって分類した 4 つのグループにおけるダイオキシン、Co-PCB 濃度を調べた（図 6 A, 6 B）。魚類、肉類とも多く摂取しているグループが、両者とも少ないグループに比べて濃度が有意に高かったが、肉の摂取の多少にかかわらず、魚類の摂取が多いことが母乳中のダイオキシン、Co-PCB 濃度に寄与している傾向が示された。

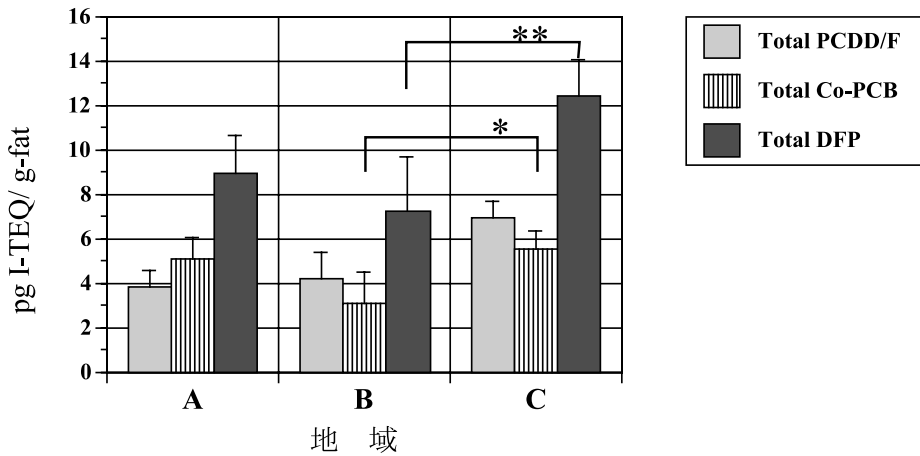


図 3 3つの地域における母乳中ダイオキシン類濃度(pg I-TEQ/g-fat) (平均±標準誤差)
Total PCDD/F: ダイオキシンとフランの合計, Total Co-PCB: コプラナー PCB の合計, Total DFP: PCDD/F と Co-PCB の合計。C 地域は B 地域に比べて Co-PCB, Total DFP が有意に高かった (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

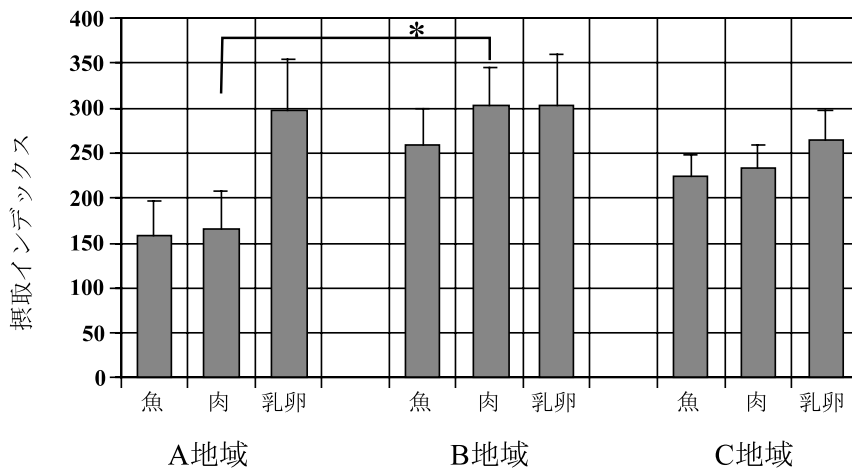


図 4 3つの地域における食品(魚類, 肉類, 乳製品・卵)の摂取量(平均±標準誤差)
摂取量は、摂取量と頻度から指標化した。肉類の摂取は B 地域が A 地域に比べて有意に高かった(* $p < 0.05$)。

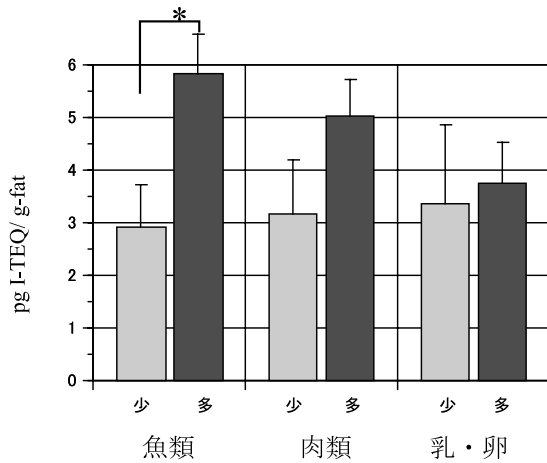


図5 A 食品の摂取の多少と母乳中 Co-PCB 濃度との関係
 摂取インデックス 200 以上をその食品の摂取が多い、
 200 未満を少ないとした。魚類の摂取の多いものが少ない
 ものより有意に濃度が高かった (* $p < 0.05$)。

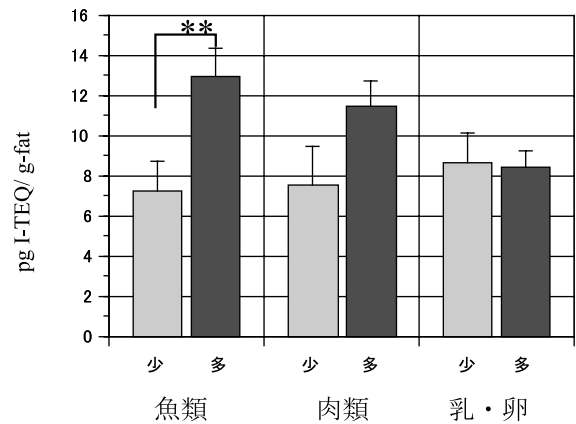


図5 B 食品の摂取の多少と母乳中ダイオキシン濃度との関係
 摂取インデックス 200 以上をその食品の摂取が多い、
 200 未満を少ないとした。魚類の摂取の多いものが少ない
 ものより有意に濃度が高かった (* $p < 0.01$)。

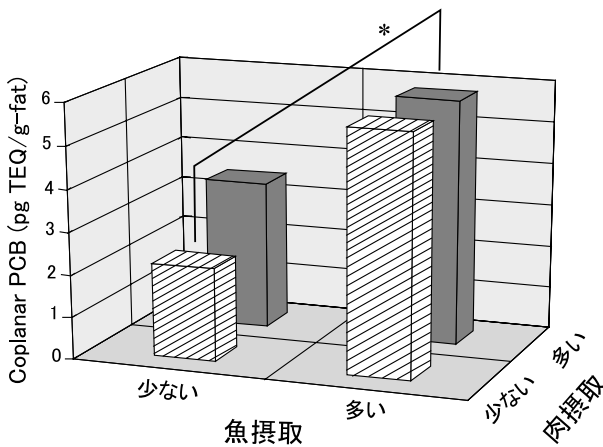


図6 A 3つの地域のデータをあわせた魚摂取と肉摂取の多
 少の組み合わせと母乳中 Co-PCB 濃度との関係
 魚・肉共に摂取の多いグループが、共に少ないグループ
 に対して有意に濃度が高かった (* $p < 0.05$)。

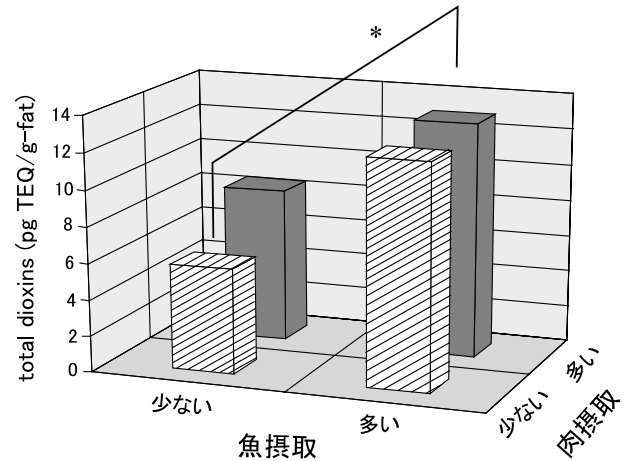


図6 B 3つの地域のデータをあわせた魚摂取と肉摂取の多
 少の組み合わせと母乳中ダイオキシン濃度との関係
 魚・肉共に摂取の多いグループが、共に少ないグループ
 に対して有意に濃度が高かった (* $p < 0.05$)。

2.2 生体影響指標の適用可能性の検討および新規指標 の検索・開発に関する研究

ダイオキシンの曝露量を知ると同時に、ダイオキシンの曝露によって生体に反応や影響が出ているかどうかを知ることはリスク評価の上で重要である。

ダイオキシンの作用の多くはアリルヒドロカーボンレセプター (Ah レセプター) を介して発現すると考えられている。ダイオキシン類は脂溶性のため容易に細胞膜を透過し、細胞質で Ah レセプターにリガンドとして結合する。リガンドを結合した Ah レセプターは、核内に移行し、Arnt と呼ばれるタンパクと結合し、二量体を形成する。この二量体が標的遺伝子の上流にある

DRE または XRE という部位に結合して標的遺伝子の転写を制御すると考えられている (図7)。ダイオキシンの標的遺伝子としては、薬物代謝酵素 P4501A1 (CYP1A1), P450 1B1 (CYP1B1), グルタチオン-S-トランスフェラーゼ Ya, UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼなどが知られている。一方、ダイオキシンと女性ホルモン、エストロゲンとの相互作用がよく知られている。そのメカニズムとして、リガンドと結合した Ah レセプター-Arnt 複合体とエストロゲンレセプターとの相互作用が提唱されている。

ここでは、これまでのところ、ダイオキシン曝露のもっとも鋭敏な生体影響指標と考えられている CYP1 類

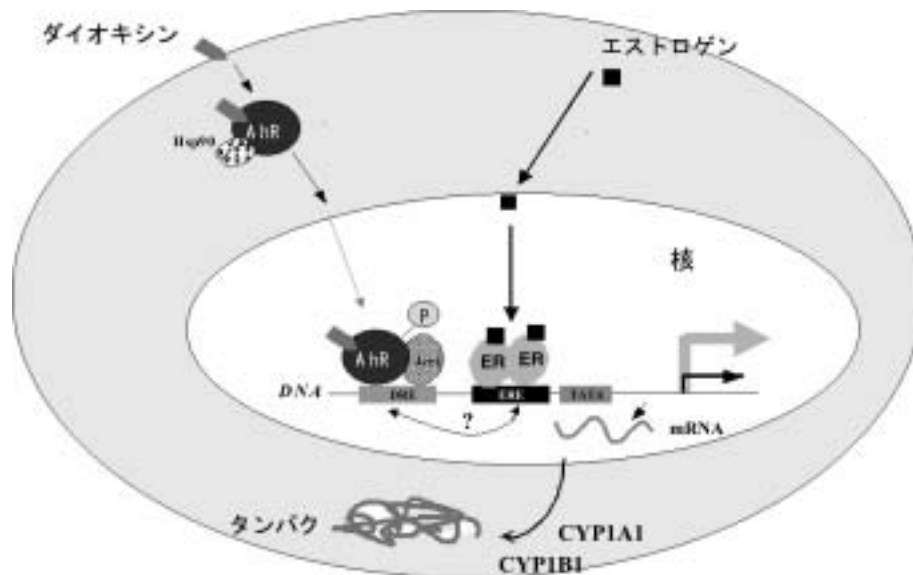


図7 ダイオキシンの作用の模式図

ダイオキシンは容易に細胞膜を透過し、細胞質で Ah レセプターにリガンドとして結合する。リガンドと結合した Ah レセプターは核内に移行し Arnt と呼ばれるタンパクと 2 量体を形成する。この 2 量体が標的遺伝子上流にある DRE という部位に結合して、標的遺伝子の転写を制御すると考えられている。エストロゲンも核内レセプターと結合し、転写制御因子として作用する。リガンドと結合した Ah レセプター - Arnt 複合体とエストロゲンレセプターとの相互作用が提唱されている。

の血液サンプルでの発現解析法を確立し、それらが曝露の指標として利用可能かどうかについて、一般住民の血液サンプルを用いて検討した。さらに、ダイオキシン類濃度が高いと考えられる母乳の母乳細胞における CYP 類の測定を試みた。また、新たな生体影響指標を探る一環として、新規のダイオキシン応答遺伝子の探索をエストロゲン応答遺伝子の中から探る試みをマイクロアレイを用いて行った。

2.2.1 PCR 法による血液中 CYP 類発現解析法の確立

チトクローム P 450 (CYP) はステロイドホルモンの合成や外因性の薬物代謝を担う酵素群である。このうち CYP1 系酵素の分子種である CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 は多環芳香族炭化水素やダイオキシン類によってメッセンジャー RNA (mRNA) 発現が誘導されることが動物実験あるいはヒト培養細胞を用いた実験により知られている。疫学的研究においては、肺がん患者と CYP1A1 mRNA の発現量との間に相関が認められるという報告もある。CYP1A1 および CYP1B1 mRNA はヒトリンパ球でも発現が認められることから、ダイオキシン類曝露による人体への影響の分子指標としての可能性が検討されてきた。しかしながら、サンプルとして全血を用いた場合、含まれる血球系細胞の内、CYP1A1 および CYP1B1 mRNA の発現が見られるのは主に単球お

よび大食球 (マクロファージ) であり、これらの mRNA は相対的に非常に微量にしか存在しない。このため一般的な方法であるノザンプロットや RNase プロテクションアッセイ法ではこれら遺伝子を定量することは難しい。リアルタイム PCR 法は目的遺伝子に特異的なプライマー (合成短鎖 DNA) によってそれぞれの cDNA のみを 1 サイクルごとに倍増させ、その過程で生じるプローブの分解物からの蛍光を測定して目的遺伝子を定量する方法であり、非常に高感度な測定が可能である。本研究ではこのリアルタイム PCR 法を用いることにより、1 測定あたり 100 分子程度の標的遺伝子の検出を目標とした。

リアルタイム PCR 法での条件検討として、プラスミド DNA の増幅を行った。CYP1A1 および CYP1B1 cDNA をプラスミドにサブクローニングし、 2.24×10^7 copies / μ l になるように希釈し (Std 1), 10 倍の希釈率でスタンダードサンプルを作製した (Std 2 ~ Std 8)。ABI PRISM 7700 Sequence Detector による解析は 1 サンプルにつき 2 つのウェルを使用し二重に測定した。検出方法は TaqMan probe による蛍光測定を用いた。スタンダードサンプルの他にクロスコンタミネーションのモニターのためのネガティブコントロールとして蒸留水を加えたウェル (no template control) を作製した。ABI PRISM 7700 Sequence Detector での増幅条件

は、CYP1A1 についてはアニーリング/エクステンション温度条件を 58 ~ 66 で変えてスタンダードの増幅曲線をもとに最適条件を検討した。CYP1B1 についてはアニーリング/エクステンション温度を 60 で行った。

CYP1A1 の増幅を行った結果 (図 8), アニーリング/エクステンションの温度条件は低温 (58 ~ 60) では Std 6 までしか増幅できず, 増幅曲線の平衡値 (プレート) が低下する傾向にあることから, 非特異的増幅物の生成による基質 (プライマー, dNTP) の枯渇が引き起こされていると考えられた。アニーリング/エクステンションの温度は 64 が最も検出感度が高く, 少なくとも Std 1 ~ 4 については平衡値に差異が見られない。しかしながら Std 5, Std 6 の平衡値はこれに比して低く, Std 7, 8 については増幅が検出されるサイクル (threshold cycle) が Std 6 と変わらなかった。また Std 1 ~ 7 までの threshold cycle をプロットすると Std 1 が若干検量線から外れる傾向にあった。さらに高温 (66) で検討した結果では Std 8 の増幅は見られなかったが, Std 6 と Std 7 の threshold cycle に差が見られ, 改善された (図 9)。66 での Std 2 ~ 7 までの増幅をもとに作成した検量線は直線性を示した。以上の結果より, アニーリング/エクステンションの条件を 66 とした時, Std 2 ~ 7 までのコピー数 (1.12×10^2

$\sim 1.12 \times 10^7$ copies / well) については定量性があると考えられた。実際の血液サンプルから RNA を抽出し, 測定した場合 CYP1A1 RNA の含量は 100 ~ 10000 copies / 100 ng RNA 程度であることから, 大部分のサンプルはこの範囲に収まり, 測定が可能であると考えられた。

CYP1B1 では Std 1 ~ 7 まで増幅曲線は平衡化しなかった。この理由は不明であるが, Std 1 ~ 7 までの増幅をもとに検量線を作成すると直線になること, CYP1B1 は血球での含量が CYP1A1 に比べて高いことから, この条件で測定には十分であると考えられた (図 10)。

2.2.2 埼玉県および大阪府の住民における血液中ダイオキシン類濃度と CYP1A1, CYP1B1 発現との関連

CYP1A1 および CYP1B1 が実際にダイオキシン類曝露による人体への影響の分子指標になりうるかを検討するため, 埼玉県および大阪府において集められた血液から全 RNA を抽出し, 先に検討したリアルタイム PCR 法によって測定を行った。

血液サンプルは採血後, 直ちに凍結し郵送されたものを用いた。検体が集められた地域は埼玉および大阪で, 埼玉においては A1 地区 13 検体, A2 地区 21 検体, B

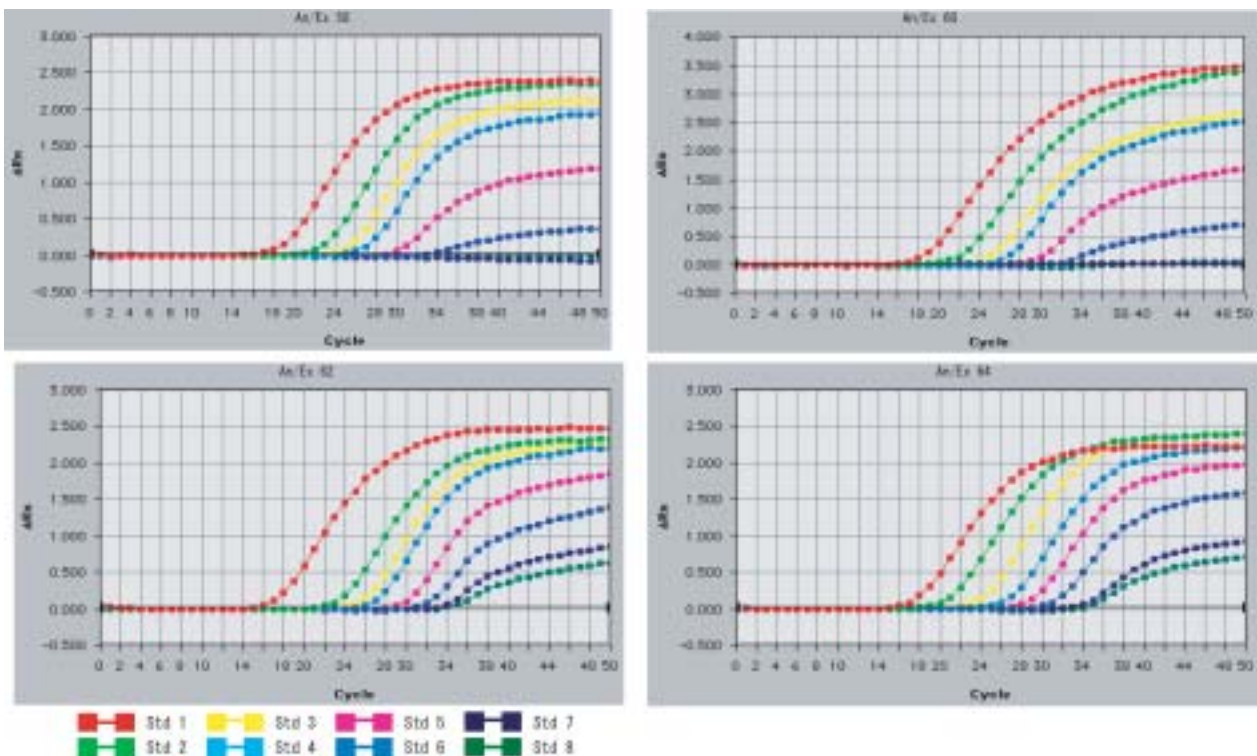


図 8 リアルタイム PCR による CYP1A1 の増幅とアニーリング/エクステンション温度との関係

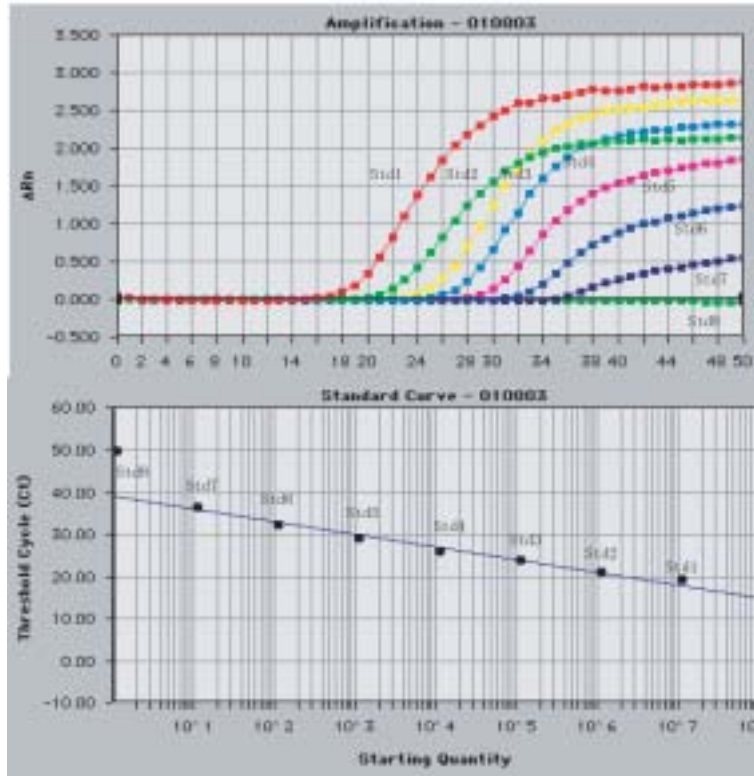


図9 リアルタイム PCR による CYP1A1 の増幅曲線および検量線
 アニーリング/エクステンションの条件を 66 とした時, Std2 ~ 7 までの増幅をもとに作成した検量線は直線性を示した。



図10 リアルタイム PCR による CYP1A1 の増幅曲線および検量線
 Std1 ~ 7 までの増幅をもとに作成した検量線は直線性を示した。

地区 8 検体の計 42 検体で、大阪においては A 地区 24 検体、B 地区の 12 検体の計 36 検体を用いた。郵送された血液サンプルを凍結状態のまま液体窒素中で破壊し、この内の約 1 g を使用して RNA を抽出した。この粗精製 RNA を Isogen LS および RNeasy kit (キアゲン) を用いて精製した。抽出した RNA は純度検定のため 1% アガロースゲルによる電気泳動で 18S, 28S リボソーム RNA の分解と、ゲノム DNA の混入の有無を確認した。送付された全血液サンプルにおいて、抽出された RNA から 18S および 28S リボソーム RNA のバンドが確認され、ゲノム DNA の混入は確認されなかった。

次に精製された RNA サンプル 2 µg を用いて cDNA の合成を行った。

CYP1A1 および CYP1B1 遺伝子発現の定量は TaqMan probe 法を用いたリアルタイム PCR により行った。測定には 96 穴プレートを用いて内部標準 (Std 2 ~ 7), サンプル (cDNA), クロスコンタミネーションのモニターのためのネガティブコントロールとして cDNA サンプルの代わりに蒸留水を加えたサンプルについて各々 2 穴ずつを使用し、ABI PRISM 7700 を用いてリアルタイム PCR を行った。得られたそれぞれのサンプルの増幅曲線より、基準蛍光強度にいたるサイクル数 (threshold cycle) を算出した。内部標準の標的配列のコピー数 (濃度) とサンプルの threshold cycle との関係から検量線を作成し、サンプルの threshold cycle から検体の cDNA 中の CYP1A1 および CYP1B1 cDNA 量を算出した。

(1) 地域および地区での CYP 発現量の差

CYP1A1 mRNA 量 (copies/ng RNA ± 標準誤差) は埼玉では A1 地区で 3.9 ± 1.7 , A2 地区で 4.0 ± 2.1 , B 地区で 2.9 ± 1.3 であり、埼玉全体では 3.8 ± 1.9 であった。大阪では A 地区で 6.4 ± 5.3 , B 地区で 11.8 ± 17.0 copies/ng total RNA であり、大阪全体では 8.3 ± 11.0 であった。

CYP1A1 発現量については埼玉での地区間 (A1, A2, B) では B 地区において若干低い傾向が見られたものの、有意な差は認められなかった。大阪での地区間 (A, B) での CYP1A1 発現量については有意な差は認められなかった (図 11)。埼玉全体と大阪全体を比較すると、大阪の検体での CYP1A1 発現量は埼玉の検体に対して有意に ($p < 0.01$) 高い結果となった (図 11)。

CYP1B1 mRNA 量は埼玉 A1 地区では 118.9 ± 69.8 , A2 地区で 124.9 ± 98.6 , B 地区で 288.7 ± 127.0 であり、埼玉全体では 117.0 ± 80.8 であった。大阪 A 地区で 170.1 ± 98.4 , B 地区で 132.8 ± 73.5 であり、大阪全体では 157.7 ± 91.5 であった。

CYP1B1 に関しては埼玉では A2 地区がやや高く、B 地区が低い傾向にあったが有意な差ではなかった (図 12)。大阪では A 地区が B 地区に比べ低い傾向を示したが有意な差ではなかった。また、埼玉全体と大阪全体との二地域間に有意な差は見られなかった (図 12)。

これらの CYP1A1 の測定値は、Vanden Heuvel らの報告における、平均値 7.00 copies /ng Lymphocyte RNA に近い値である一方、Krovat らの報告による 39 copies /ng Lymphocyte RNA と比較すると低い。この理由とし

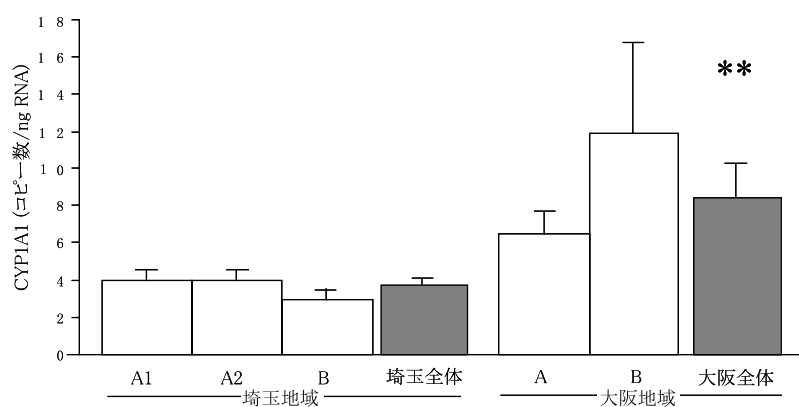


図 11 埼玉 3 地区、大阪 2 地区および埼玉全体、大阪全体での CYP1A1 発現量の比較
値は ng RNA あたりのコピー数 (平均 ± 標準誤差)。大阪全体は埼玉全体より有意に高かった (* $p < 0.05$)。

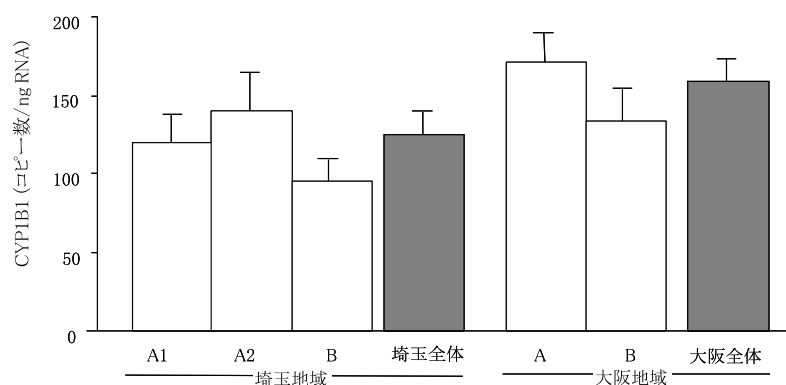


図 12 埼玉 3 地区，大阪 2 地区および埼玉全体，大阪全体での CYP1B1 発現量の比較値は ng RNA あたりのコピー数 (平均 ± 標準誤差)。

表 1 埼玉と大阪の住民における血中ダイオキシン類濃度 (平均 ± 標準誤差)

埼玉	N	(pg TEQ/g-fat)
A1	13	24.9 ± 3.63
A2	21	24.5 ± 2.22
B	8	27.0 ± 2.96
埼玉全体	42	25.1 ± 1.64
大阪		
A	24	24.4 ± 3.80
B	12	34.4 ± 4.79
大阪全体	36	27.8 ± 3.06

て，両者の測定方法および本研究での測定方法がそれぞれに異なっている点が挙げられる。リアルタイム PCR 以外の方法は電気泳動によって増幅物であるバンドを画像解析するのが一般的であるが，PCR による特定遺伝子の増幅では，バンドが検出できるサイクル数においては増幅が限界に近づいており，正確さを欠くことがある。また，これらの報告では RNA 抽出材料として分離したリンパ球あるいは単核球を用いていることから，全血からの RNA に混入すると考えられる赤血球の残存リボソーム RNA についても測定値に影響を与えている可能性も考えられた。

一方，CYP1B1 mRNA の値は Spencer らの報告 16.3 ~ 491.8 copies/ng Lymphocyte RNA に近い値となった。

今回の測定では CYP1A1 発現量に埼玉と大阪で有意な差が見られた。これは大阪で得られた検体には 10 copies/ng RNA 以上の非常に高い発現を示すものが 6 検体含まれていたためである。これに対して埼玉で得られた検体には 10 copies/ng RNA 以上の発現を示すものが含まれていなかった。しかしこれらの高発現を示す検体が必ずしも高いダイオキシン類血中濃度 (TEQ) を示

しているわけではなく，さらに今回の測定では大阪と埼玉の検体のダイオキシン類血中濃度 (TEQ) に有意な差は見られなかったことから (表 1)，両地域の差の原因がダイオキシン類血中濃度の差によるものであるとは考えにくい。

また CYP1B1 発現量には両地域の間には差は見られないことから，血中ダイオキシン類濃度以外の CYP1A1 発現に対する因子が存在し，それが両地域で異なっていると考えられる。さらにその因子は CYP1B1 発現には影響を及ぼしにくいものと考えられる。

(2) ダイオキシン類の曝露量と CYP 発現量の相関

ダイオキシン類の曝露量 (TEQ) と CYP1A1 mRNA 量の相関を検討した結果，埼玉全体で負の相関が認められた ($R^2 = 0.154$, $p = 0.0102$, 図 13)。埼玉の地区別では曝露量との有意な相関は認められなかった (図 13)。大阪においては地域全体あるいは地区別でも曝露量との有意な相関は得られなかった (図 14)。CYP1B1 mRNA 量においてはいずれの地域，地区においても，曝露量との有意な相関は得られなかった (図 15, 16)。

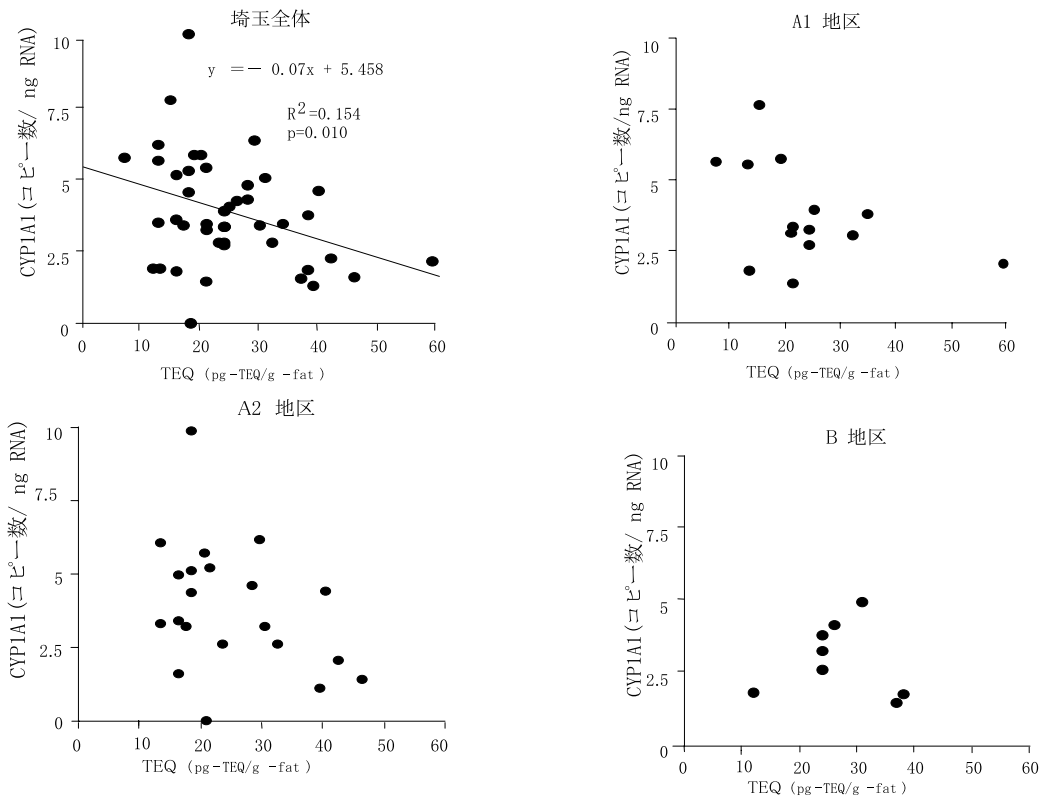


図 13 埼玉 3 地区と埼玉全体における血中ダイオキシン濃度と CYP1A1 発現との関係
埼玉全体では弱い負の相関が認められた。

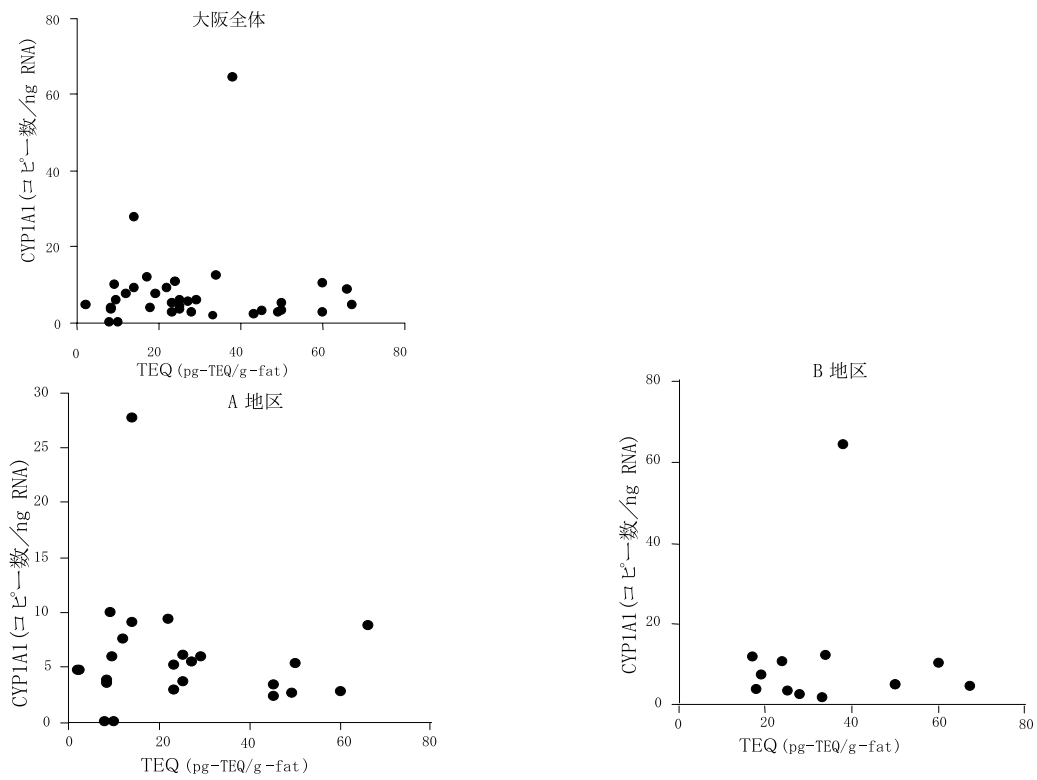


図 14 大阪 2 地区と大阪全体における血中ダイオキシン濃度と CYP1A1 発現との関係

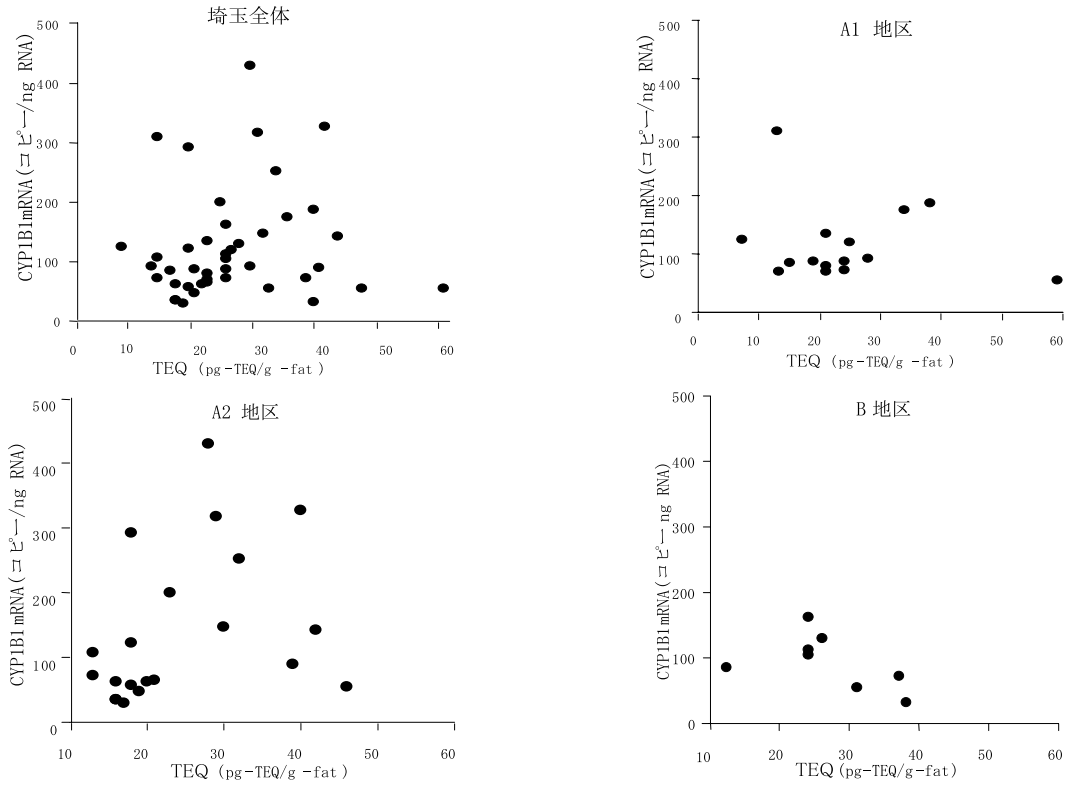


図 15 埼玉 3 地区と埼玉全体における血中ダイオキシン濃度と CYP1B1 発現との関係

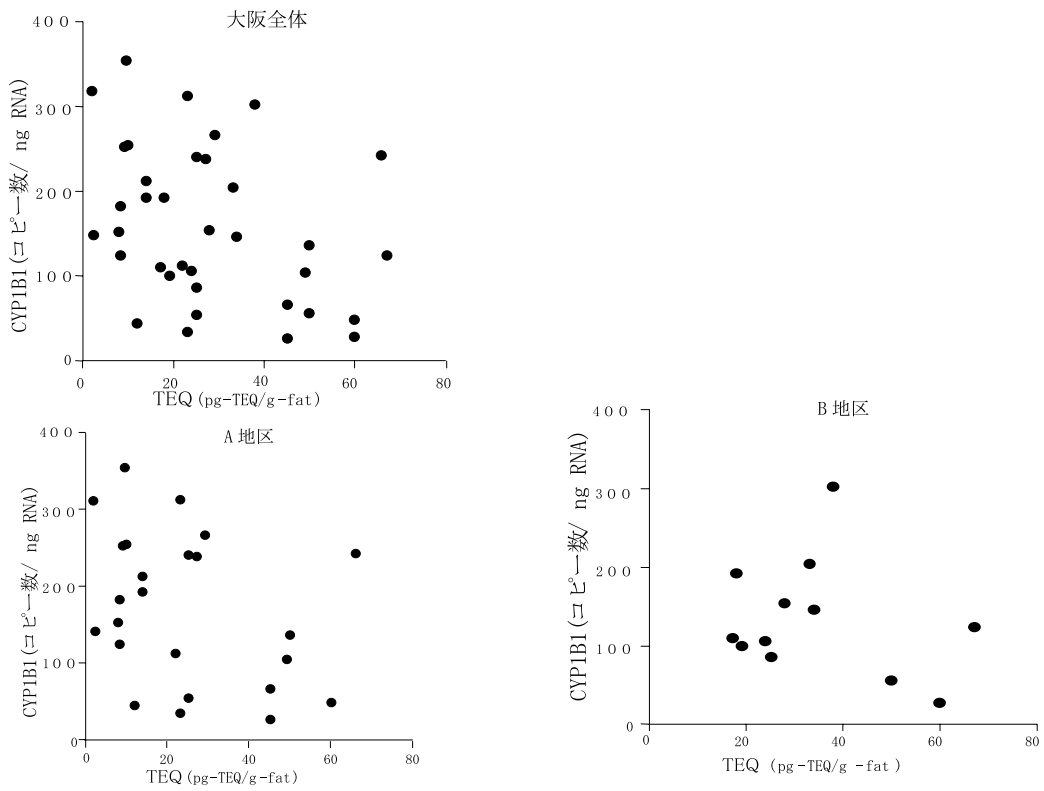


図 16 大阪 2 地区と大阪全体における血中ダイオキシン濃度と CYP1B1 発現との関係

今回の測定でダイオキシン類の血中濃度と CYP1A1, CYP1B1 の発現との間に正の相関は見られず, 逆に埼玉全体で弱い負の相関が見られた。このことは測定されたダイオキシン類の血中濃度が CYP1A1 発現に影響を及ぼすレベルではなかったと考えられる。

(3) 年齢と CYP 発現量の相関

年齢と両地域における CYP1A1 発現量には有意な相関が認められなかった(図 17A, B)。一方, CYP1B1 との間には大阪でのみ負の相関 ($R^2 = 0.16$, $p = 0.0157$) が認められた(図 18A, B)。

ヒトではダイオキシン類は主に脂肪組織に蓄積され, 加齢と共に増加する傾向が知られているが, 今回の測定

においては年齢との間に相関が見られなかった。この結果からも今回の CYP1A1, CYP1B1 の発現時には血中ダイオキシン類の曝露は影響していないものと考えられる。

(4) CYP 発現量の性差

CYP1A1 発現量における男女の比較, および CYP1B1 における男女の比較では両地域とも有意な差は認められなかった。しかしながら, これら二つの遺伝子においては女性の方が個人差が大きい傾向が両地域で認められた(図 19A, B)(図 20A, B)。CYP1A1 および CYP1B1 mRNA 発現量の性差については, リンパ球では CYP1B1 において差がないという報告があり, これは今回のデー

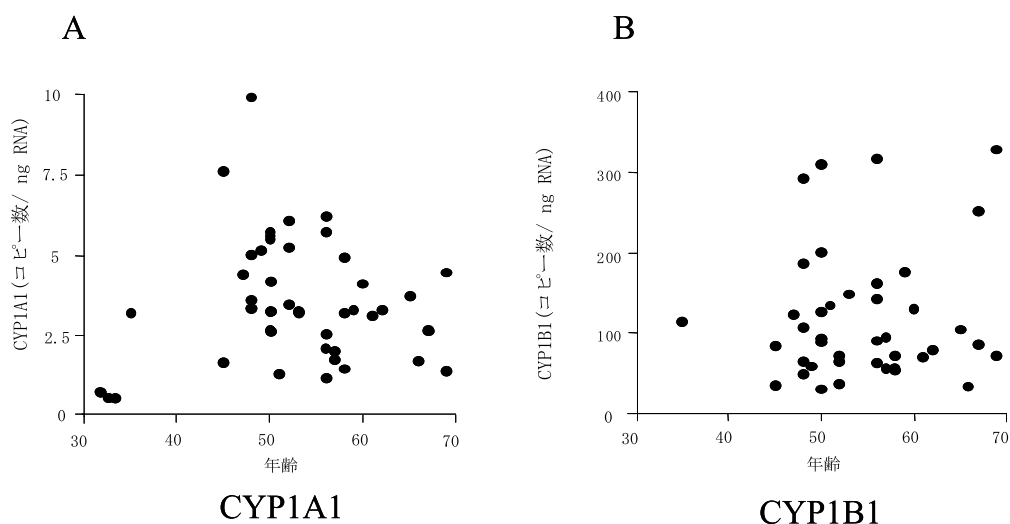


図 17 埼玉における CYP1A1 発現(A), CYP1B1 発現(B)と年齢との関係

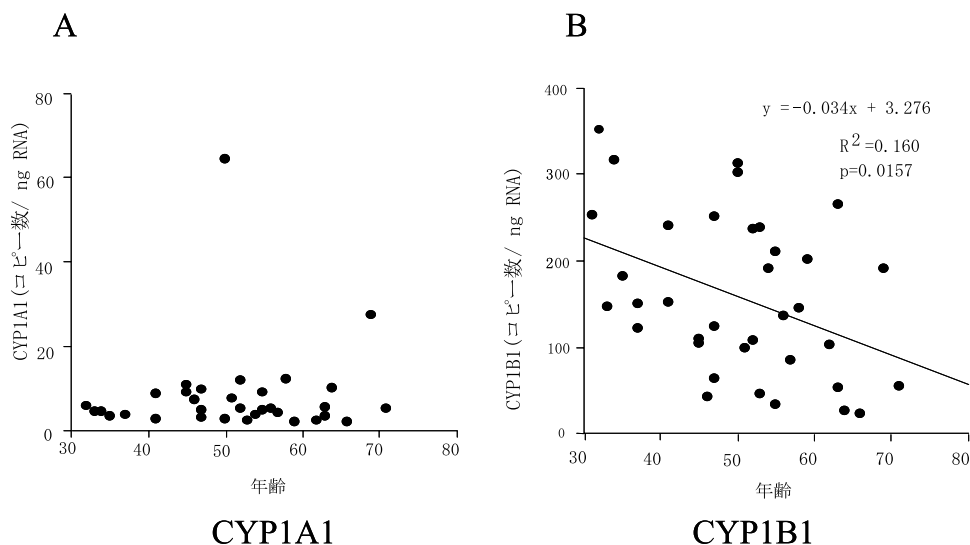


図 18 大阪における CYP1A1 発現(A), CYP1B1 発現(B)と年齢との関係
CYP1B1 発現量と年齢の間には弱い負の相関が認められた。

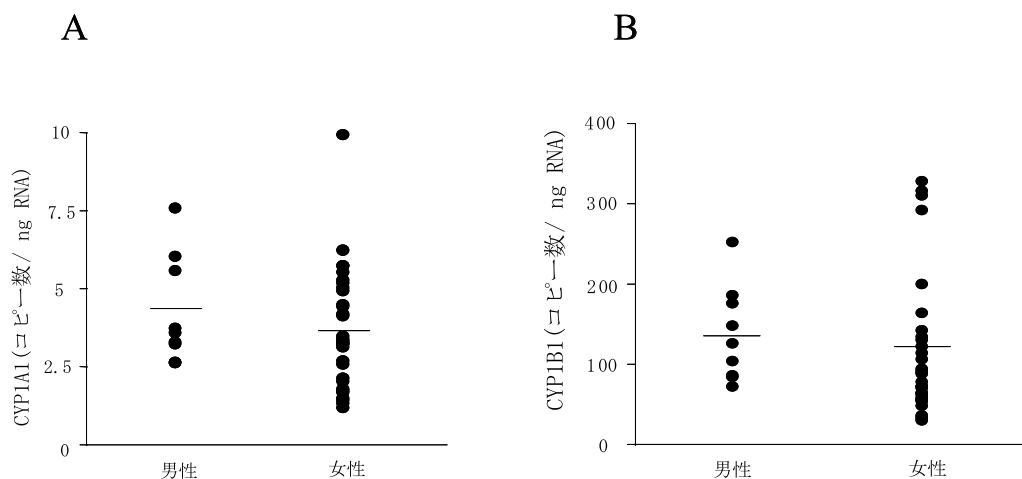


図 19 埼玉における CYP1A1 発現(A), CYP1B1 発現(B)と性差

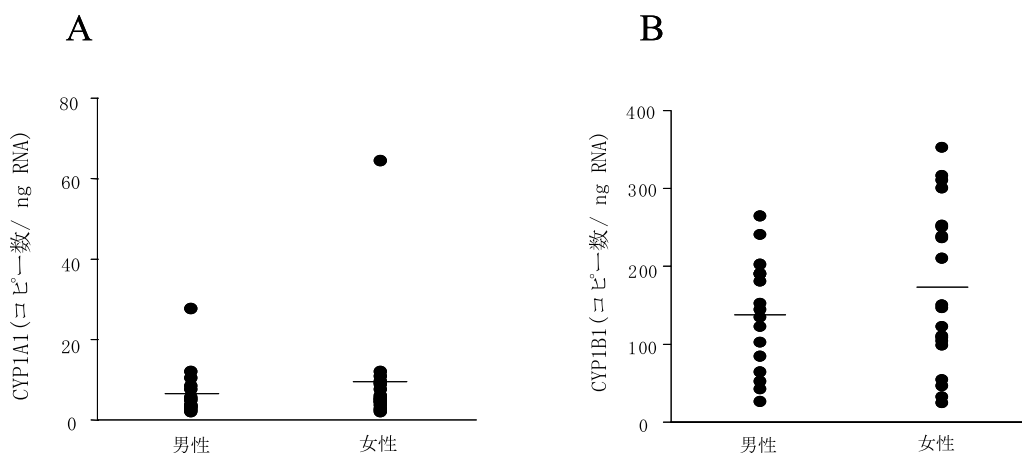


図 20 大阪における CYP1A1 発現(A), CYP1B1 発現(B)と性差

タと一致するものである。また CYP1A1 については全血あるいはリンパ球由来の mRNA を用いた性差に関する報告はないが、肺癌患者の肺においては女性のほうが高かったという報告がある。またエストロゲンがダイオキシンによる CYP1A1 の誘導を修飾するという報告もあり、これらの報告を考慮すると、今回の検討で CYP1A1 mRNA 量に関して女性の方がばらつきが大きい理由の一つに、性周期および閉経前後のエストロゲン量の変化による影響があるのかもしれない。

(5) CYP1A1 発現量と CYP1B1 発現量との相関

CYP1A1 発現量と CYP1B1 発現量との間には埼玉で正の相関が認められた ($R^2 = 0.117$, $p = 0.0263$) (図 21)。しかしながらそれぞれの遺伝子と血中ダイオキシン類濃度との間に正の相関が見られなかったことから、二つの遺伝子の転写活性化がダイオキシン類の曝露量に対応して起こったとは考えにくい。大阪においては正の相関の

傾向が認められたが、有意なものではなかった (図 22)。これら二つの遺伝子の共通の転写因子、ダイオキシン類のレセプターである Ah レセプターやその共役因子である Arnt には量的な個人差が存在することが報告されている。むしろこのような転写因子の個人差が CYP1A1 と CYP1B1 発現量との間の相関に反映している可能性がある。

(6) まとめ

今回の検討において、埼玉および大阪両地域においてそれぞれの地区別の CYP1A1 と CYP1B1 発現量には有意な差が認められなかった。血中ダイオキシン類濃度においても地区ごとで有意な差が認められなかった。また個人によって血中ダイオキシン類濃度に大きな差が見られたが、それらは CYP1A1 および CYP1B1 発現量に反映されていなかった。

大阪と埼玉での両地域の間にはダイオキシン類の血中濃

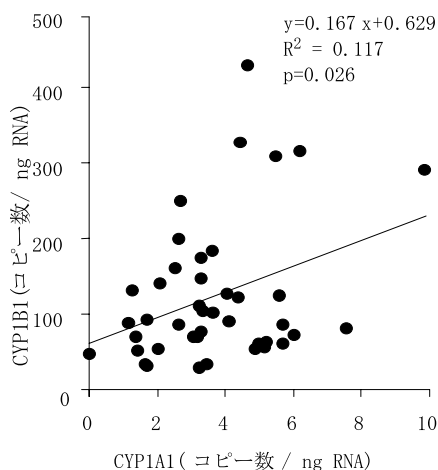


図 21 琦玉における CYP1A1 発現と CYP1B1 発現との関係
弱い正の相関が認められた。

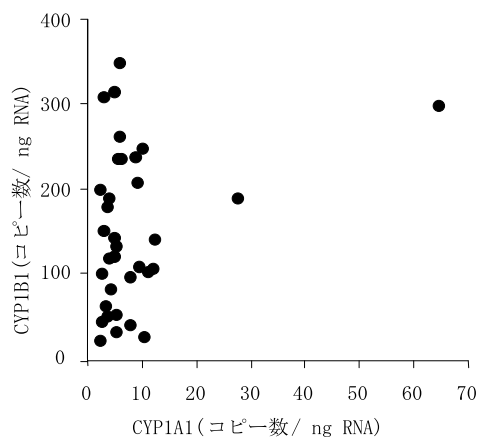


図 22 大阪における CYP1A1 発現と CYP1B1 発現との関係

度に差が無かったが、CYP1A1 の発現量は大阪が琦玉に比べ有意に高かった。これは大阪には CYP1A1 mRNA 発現量の高い検体が含まれていたことが考えられる。またこれらの検体が必ずしも高い血中ダイオキシン類濃度を示しているわけでもなかった。

以上のことから、今回の検討におけるダイオキシン類の血中濃度は CYP1A1, CYP1B1 の発現に影響を及ぼすレベルではなかったと考えられる。また、今回の検討における CYP1A1 および CYP1B1 発現量の個人差にはダイオキシン類以外の要因が関与していると考えられる。大阪の CYP1A1 mRNA 発現量が高い検体については、転写因子群を含めた遺伝的な個人差と、食物や喫煙等の生活習慣による個人差に起因している可能性も考えられた。

2.2.3 母乳細胞を用いた CYP 類発現解析法の確立

ダイオキシン類への曝露は、そのほとんどが食事由来と考えられている。母乳には通常食物より高い濃度のダイオキシン類が含まれており、器官発達・成長期である乳児に対する影響が懸念されている。また母体の側でも脂肪が合成、貯蓄されている乳腺では、他の組織に比べてダイオキシン類の曝露量が相対的に高くなっていることが予想される。ヒト母乳中には乳腺より剥離した細胞（以下母乳細胞）が含まれている。この細胞がダイオキシン類に反応し、ダイオキシン類の鋭敏な指標となる CYP 系酵素の発現が見られれば、ダイオキシン類に対する人体への影響を評価できる材料になりうる可能性がある。そこで母乳細胞の単離法の確立、ダイオキシン関

連遺伝子の発現および培養条件下での TCDD 曝露による反応性について CYP 系酵素の発現により検討した。

母乳中に含まれる細胞はごく微量であり遠心操作なしには回収することが不可能であったが、遠心を行うことにより乳脂肪が上層でフタ状に固化し、細胞の回収および RNA の抽出が困難になる。そのためふり状のホルダーが挿入された遠心管を用いて、脂質と母乳細胞の分離を行なった。単離された母乳細胞は油滴を含んだ浮遊性の球状細胞が主であり、少量の上皮性角化細胞と思われる付着性の細胞が混ざっていた（写真 1）。母乳細胞から全 RNA 抽出後、ダイオキシンの遺伝子転写に対する反応に不可欠である AhR と Arnt の mRNA の発現を RT-PCR によって解析したところ両遺伝子とも発現が確認された。次にダイオキシンで誘導される遺伝子である、CYP1A1 および CYP1B1 の発現についてリアルタイム PCR 法で定量した。これらの遺伝子の発現はリンパ球

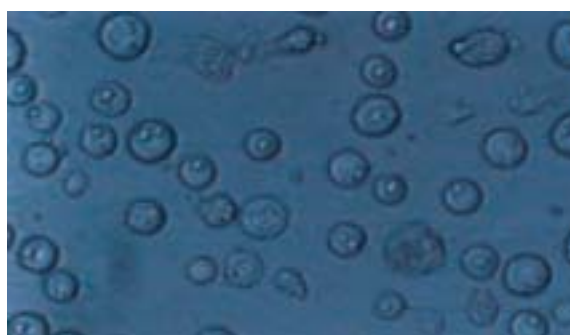


写真 1 培養条件下での母乳細胞
母乳細胞は油滴を含んだ浮遊性の球状細胞が主であり、少量の上皮性角化細胞と思われる付着性の細胞が混在している。

では CYP1B1 の発現が CYP1A1 に比べて高いのに対して、母乳細胞では CYP1A1 の発現が高く、CYP1B1 の発現が低いことが分かった(表 2)。CYP1A1 は CYP1B1 に比べて TCDD への反応性が高いため、この結果から母乳細胞は血球系の細胞よりも曝露影響を調べる上でより適した材料であると考えられた。

次に母乳細胞の TCDD に対する反応性を調べる目的で、単離した母乳細胞を DMEM/F12, 10% FBS で培養し、TCDD を 4 時間曝露した後、全 RNA を抽出し CYP1A1 および CYP1B1 の発現を検討した。その結果、CYP1A1 は 100 pM より誘導がかかり、10 nM でコントロールの 3 倍以上の mRNA が検出されたが、これに対し CYP1B1 は 10 nM でも誘導されなかった(図 23)。実際の母乳中に含まれるダイオキシン類の量は数 10 pg/g fat (TEQ) であり、母乳中の脂肪が 5 ~ 10% であることを考えると数 ng、およそ 10 pmol/程度であると考えられる。このことから、培養条件下での母乳細胞において通常の母乳中のダイオキシン類濃度では CYP1A1

の誘導を引き起こすとは考えにくい。しかしながら実際の母乳細胞のダイオキシン類曝露量および曝露形態が CYP1A1 を誘導し得るものかどうかは依然不明である。また、出産後の母乳の採取時期でも母乳細胞の量やダイオキシン反応性が異なることも予想されるため、母乳細胞の生体指標材料の可能性についてはさらなる検討が必要とされる。

2.2.4 ダイオキシン応答遺伝子の探索

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) は生体に様々な影響をおよぼすことが報告されている非常に毒性の高い化合物である。その作用機構の一部は TCDD による遺伝子発現の変化を介していると思われるが、詳細については不明である。

そこで、新たな TCDD 応答遺伝子を探索するために、DNA マイクロアレイを用いた検討を行った。効率良く TCDD 応答遺伝子を見つけるために、TCDD がその作用に影響することが知られているエストロゲンに着目

表 2 母乳細胞における CYP1A1, CYP1B1 発現の測定例
値は 100ng RNA あたりのコピー数(平均 ± 標準偏差)

母乳細胞での CYP1A1、1B1 および GAPDH mRNA 発現

Sample Name	CYP1A1	CYP1B1	GAPDH	CYP1A1/GAPDH
mit1	22690.7 ± 1871.6	N.D.	843594.3 ± 19255.3	0.0454
mit2	28566.2 ± 2326.0	N.D.	627023.0 ± 14143.5	0.0560
mit3	50704.3 ± 2229.2	228.5 ± 43.8	485894.1 ± 30684.0	0.0768
mit4	82512.5 ± 3746.3	1284.6 ± 537.4	510001.6 ± 918.8	0.0978
mit5	66844.5 ± 3266.2	849.3 ± 307.1	660118.6 ± 37974.4	0.1066
mit6	56282.1 ± 3614.5	N.D.	500206.2 ± 6812.4	0.1158

(copies ± S.D./100ng RNA)

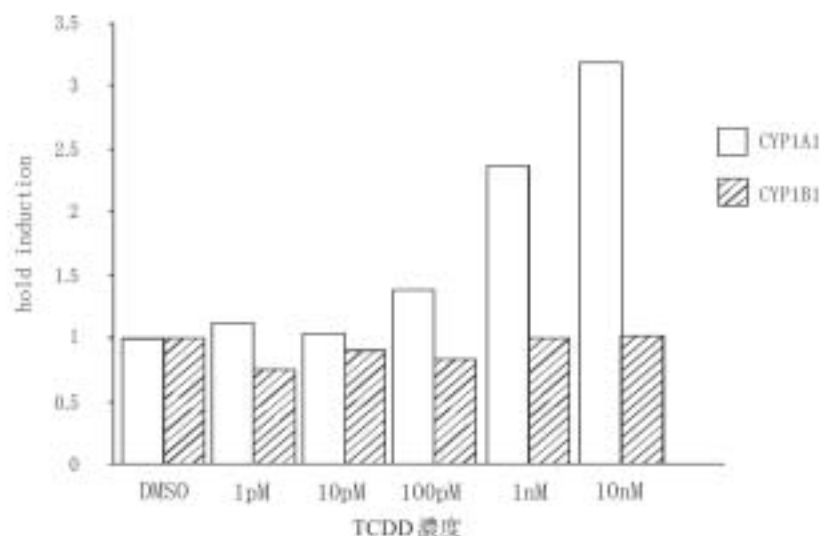


図 23 培養母乳細胞の CYP 発現に対する TCDD の影響

し、エストロゲン応答遺伝子がスポットしてあるマイクロアレイを用いた。

(1) エストロゲン応答遺伝子をスポットしたマイクロアレイを利用した TCDD 応答遺伝子の探索

新規 TCDD 応答遺伝子を探索するために、マイクロアレイ法を行った。現在、様々な種類のマイクロアレイが販売されており、いずれを用いるかが重要な点となっている。今回我々は、TCDD の内分泌攪乱作用に着目し、TCDD とエストロゲンの共通標的遺伝子が複数存在することを想定することによって、estrogen-responsive genes-spotted microarray (Infogenes, Co., Ltd.)(図 24)を利用した。

MCF-7 (ヒト乳がん細胞)あるいはRL95-2 (ヒト子宮内膜がん細胞)に 0.1, 1, 10 nM TCDD あるいはコントロールとして 0.1% DMSO を 24 時間曝露した後、mRNA を抽出しマイクロアレイ法に利用した。各 TCDD 濃度について 2 ~ 3 回行った。

TCDD 曝露により MCF-7 で 74 遺伝子、RL95-2 で 67

遺伝子の蛍光レベルが変化した。但し、TCDD-responsive gene としてスポットしてあった既知の TCDD 応答遺伝子を含む。

(2) Quantitative real-time PCR を利用した TCDD 応答性の確認

マイクロアレイは再現性を得にくいというのが欠点の 1 つである。そこで、(1)の実験で得られた遺伝子の発現が実際に細胞中で TCDD 曝露により変化するかどうかを確認するために、Quantitative real-time PCR を行った。それに先立ち、統計処理を行い、マイクロアレイ解析結果にばらつきのあった遺伝子を除外し、遺伝子を 31 個に絞った。それらすべてについて、MCF-7 および RL95-2 から抽出した total RNA を用い、real-time PCR を行い、TCDD 曝露による遺伝子発現の変化を確認した(図 25)。

TCDD 曝露により発現が増加することが報告されている CYP1A1 は TCDD の濃度依存的に増加した。Gene-10 は TCDD 曝露により発現が抑制され、10nM TCDD では



図 24 エストロゲン応答遺伝子をスポットしたマイクロアレイの概要
エストロゲン応答遺伝子 165 遺伝子、TCDD 応答遺伝子 10 遺伝子、内在性対照遺伝子 28 遺伝子、計 203 遺伝子がスポットしてある。

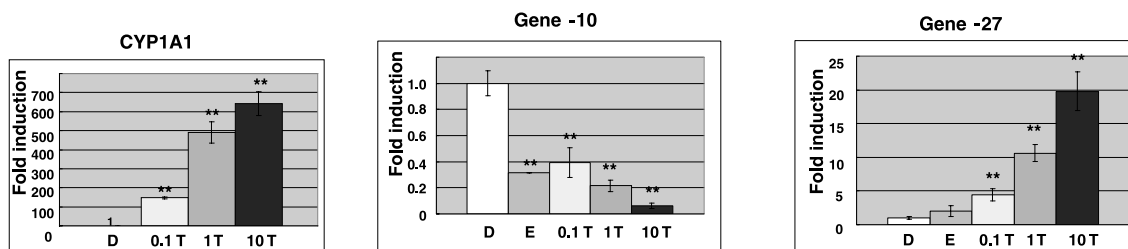


図 25 MCF-7 細胞において TCDD がエストロゲン応答遺伝子、gene-10、gene-27 に及ぼす影響 (Quantitative real-time PCR) CYP1A1 は陽性対照。

DMSO 曝露時の 1/10 以下であった。Gene-27 は TCDD 曝露により発現が誘導された。real-time PCR を行ったすべての遺伝子について、PCR 産物のシーケンスを行い、目的の遺伝子が増幅されていることを確認した。

TCDD 曝露により real-time PCR で遺伝子発現変化の確認された遺伝子の数に着目すると、両細胞ともに、TCDD の濃度依存的に TCDD 応答遺伝子の数が増加したが、1 nM と 10 nM では差がないか、ほとんど同じであった (図 26 a, b)。

また、MCF-7 と RL95-2 では 12 遺伝子が共通だったが、そのうち 2 遺伝子は細胞により逆の反応を示した。また、TCDD に対する反応も細胞間で強弱がみられた。

(3) マウス胎児組織における TCDD 応答性の確認

(2) の実験で得られた遺伝子の発現が生体中で TCDD の影響を受けるかどうかを確認するために、マウス胎児を用いて TCDD に対する応答性を調べた。

TCDD 曝露により、マウス組織で発現量の変化する遺伝子が確認された (図 27)。同じ遺伝子でも、組織によって変化のパターンが異なっていた。また、雌雄で同じ動きをする遺伝子もあれば、雄あるいは雌のいずれかのみで発現の変化する遺伝子もあった。

マイクロアレイ法および real-time PCR 法の利用により、新規の TCDD 応答遺伝子を複数同定した。これらの遺伝子には様々な機能のものが含まれていた (表 3)。また、今回確認したいいくつかの遺伝子は、マウス胎児組

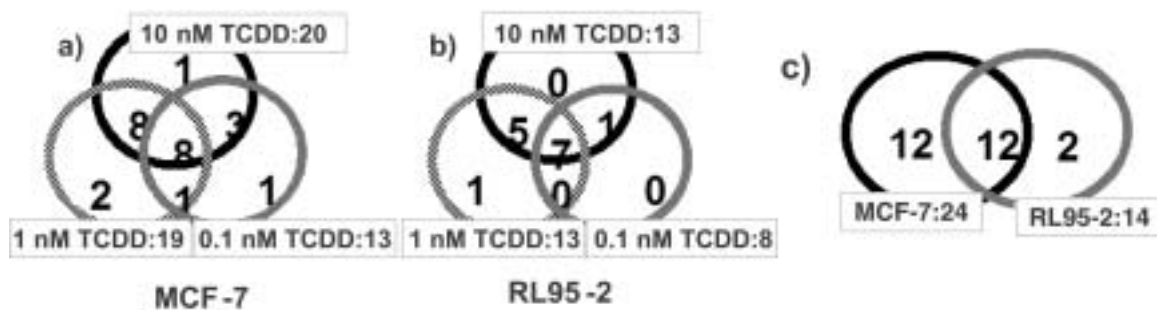


図 26 エストロゲン応答遺伝子発現変化に及ぼす TCDD 濃度および細胞種の影響

- a) MCF-7 細胞における TCDD 濃度と発現変化した遺伝子数。b) RL95-2 細胞における TCDD 濃度と発現変化した遺伝子数。c) 発現変化した遺伝子数の細胞による違い。

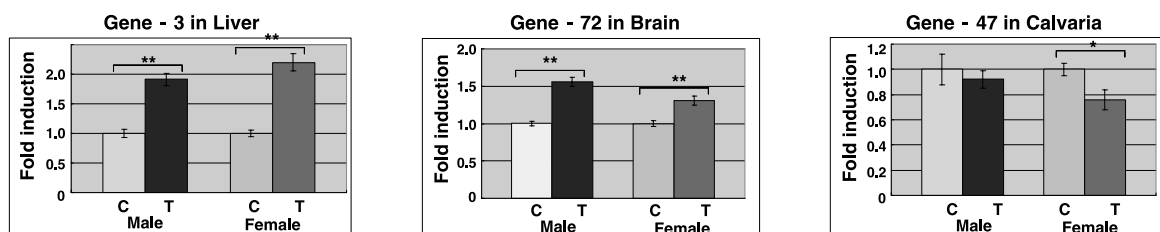


図 27 マウス胎児組織において TCDD が遺伝子発現に及ぼす影響 (Quantitative real-time PCR)

C : 対照, T : TCDD 投与。(*p < 0.05, **p < 0.01, 対照に比べ有意な発現変化)

表 3 MCF-7 および RL95-2 細胞において見いだされた新規 TCDD 応答遺伝子

MCF-7 および RL95-2 細胞における新規 TCDD 応答遺伝子の数	< 機能 >		
	MCF-7	RL95-2	
up-regulated genes	10	8	酵素関連
down-regulated genes	14	6	シグナル伝達
total	24	14	脳関連
			他の機能
			機能未知
			クローンなど

織中でも TCDD の影響を受けていた。

以上の結果から、TCDD の曝露が、これまで報告されているよりも多くのエストロゲン応答遺伝子の発現に影響を及ぼし、さらに、生体においても影響を及ぼす可能性が示唆された。

本実験は、新規の TCDD 応答遺伝子の同定と同時に、生体で重要な働きをするエストロゲンとの共通の標的遺伝子を同定しており、生体に及ぼす TCDD の影響、さらにはその作用機序解明の手がかりになると期待される。

2.3 ダイオキシン類に対する感受性の決定要因に関する研究

ダイオキシン類の毒性は、種や系統によって感受性が大きく異なることが特徴である。感受性を規定する要因として、Ah レセプターのリガンド結合部位、CYP1A1 の多型に注目して分子レベルでの検討を行った。また、ダイオキシンの毒性の修飾因子としてのエストロゲンレセプター、エストロゲンシグナル伝達の関与について細胞レベルでの検討を行った。

2.3.1 多型検出法の確立

ダイオキシン類に対する毒性には動物種および系統間で感受性差が存在することが知られている。ヒトにおいてダイオキシン類の感受性に対する遺伝的な要因が存在しているかどうかは不明である。仮に何らかの遺伝的多型に起因した感受性差が存在した場合には、リスクアセスメントにおける重要な因子の一つとなり得るだろう。特にごく低用量の曝露でも生体影響を引き起こすような高感受性を示す人が存在する場合には、最小無毒性量の概念にも影響することになると予測される。感受性差の原因として最も大きな割合を占めると考えられるのは Ah レセプター (AhR) の機能である。アミノ酸置換あるいは欠失によってダイオキシン (2,3,7,8-TCDD) に対する親和性に差があることが知られている。しかしながらヒトにおいては AhR タンパクに機能的な差を生じるような多型は日本人集団中には見いだされていない。しかし構造遺伝子の多型ばかりでなく AhR 遺伝子の転写調節領域に発現量を決定する多型が存在する場合にはダイオキシン類への感受性に差異が生じる可能性がある。このような多型の存在の有無を調べるため、AhR の遺伝子座 (アレル) ごとの発現量を比較する実験系を構築

した。一方、CYP1A1 はベンツピレンなどの発がん前駆物質を代謝して発がん性を発生させることから、ダイオキシンの毒性発現における感受性を本遺伝子の発現が決定している可能性がある。日本人の集団においてはこの CYP1A1 遺伝子に数箇所の多型が知られ、発癌との関連が分子疫学研究により示唆されていることから、CYP1A1 遺伝子多型の検出を試みた。

ヒト血液サンプルからのゲノム DNA 抽出には有核細胞 (リンパ球) の分離が不可欠であるため、凍結全血をまず低張液で溶血させ、遠心してリンパ球を得た。次に細胞を界面活性剤で溶解した後、タンパク成分を塩析除去しイソプロパノール沈殿によってゲノム DNA を得た。

日本人集団での CYP1A1 遺伝子の高頻度多型は *Msp*I 多型および Ile462Val 多型である。*Msp*I 多型の検出には polyA シグナルの下流 130 ~ 469 番を PCR 法にて増幅した 340b のフラグメントを制限酵素 *Msp*I で切断した。*Msp*I 消化後、電気泳動により *Msp*I サイトを持たないアレルからの増幅物は 340b、*Msp*I サイトを持つ遺伝子座からの増幅物は 140b と 200b に分離して検出された (図 28)。

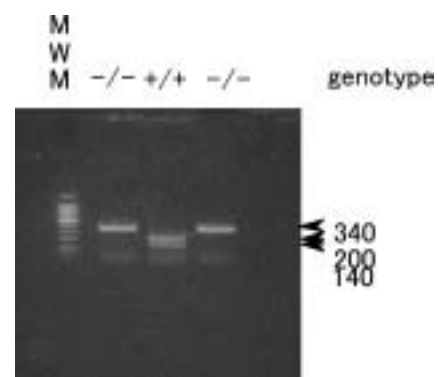


図 28 PCR-RFLP 法による CYP1A1 *Msp*I 多型の検出
Msp サイトを持たないアレルからの増幅物は 340b、*Msp* サイトを持つ遺伝子座からの増幅物は、140b と 200b に分離して検出された。

Ile462Val 多型については 3' 末端を一塩基置換部位にデザインしたプライマーを各アレルごとに作り、ゲノム DNA からの増幅物の有無を電気泳動で確認した (アレル特異的 PCR 法) (図 29)。本方法には耐熱酵素の性質により 3' 末端ミスマッチでも増幅が起こるため、数種の耐熱 polymerase を検討したところ、改変 *Taq* polymerase (GeneTaq) が最も信頼性が高かった。

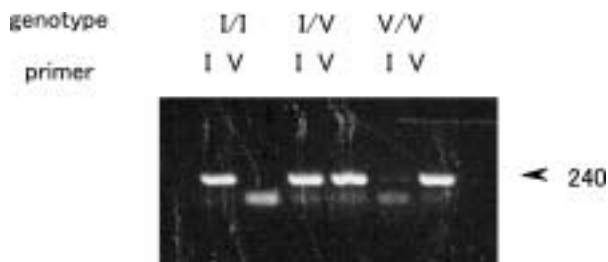


図 29 アレル特異的 PCR 法による CYP1A1 Ile462Val 多型の検出

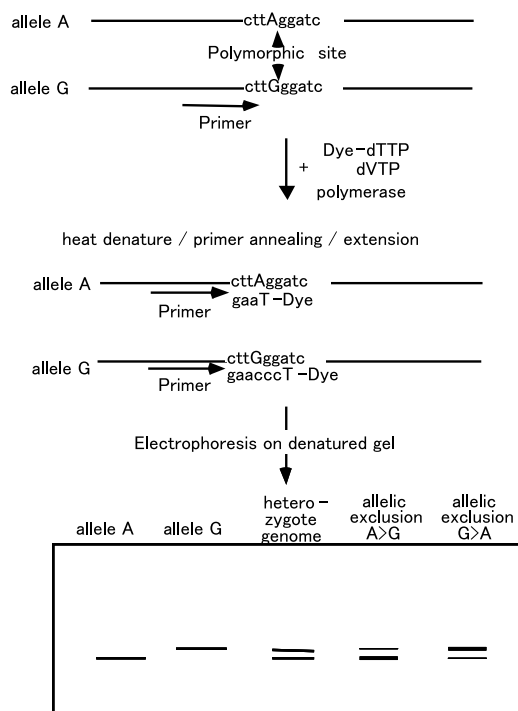


図 30 異なるアレル由来の mRNA 発現の解析方法

アレル間の発現差については、蛍光ジヌクレオチドを用いたプライマー伸長法による検出を試みた。まず AhR の高頻度多型である R554K をそれぞれの 3 特異的プライマーによるアレル特異的 PCR 法で検出して多型を同定した。次に多型周辺 300b を PCR で増幅し、各アレルそれぞれをプラスミドにサブクローニングした。各プラスミドの比を変えて混合してスタンダードを作成した。これらスタンダードから上述のプライマーで多型周辺 300b を増幅し、増幅物を精製してプライマー伸長のテンプレートとした。プライマー伸長法は多型の 5b 上流を 3 端にデザインしたプライマーと dATP, dCTP, dTTP および蛍光 ddTTP を用いて pfu polymerase により伸長反応させた (図 30)。伸長反応後、12% アクリルアミド-尿素ゲルで電気泳動し、蛍光イメージアナライザーで分離されたフラグメントを分析した (図 31)。結

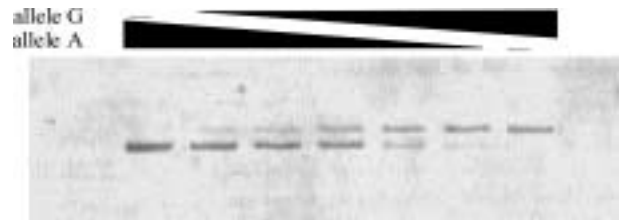


図 31 プライマー伸長法による異なるアレル由来の mRNA の分離
それぞれのアレル由来の PCR 産物は分離したバンドとして検出され、各バンドの強度比は混合比と平行であった。

果として、それぞれのアレル由来の PCR 産物は分離したバンドとして検出され、各バンドの強度の比は混合比と平行であることが示された。本方法により、cDNA サンプルをテンプレートに用いることで各アレルの発現比を求めることが可能であると考えられた。アレル間の発現差は転写調節領域の多型以外にも 3' 非翻訳領域やイントロンでの多型にも起因すると考えられ、本方法は構造遺伝子以外の多型の発現に有効な手段となると考えられる。

2.3.2 AhR のリガンド結合にかかわる領域の同定

ダイオキシン類の毒性のほとんどはレセプター型転写因子である AhR によって引き起こされることがノックアウトマウスの実験で明らかとなった。また、マウス系統間において AhR の TCDD に対する親和性の差が TCDD 感受性の差に関与していることが示されている。

一方、AhR はダイオキシン類以外にもベンツピレンやメチルコランスレンといった多環芳香族炭化水素やフラボン、キノンなど様々な分子がリガンドとなりうる。さらに AhR は結合するリガンドによって活性化する遺伝子とそれに伴って発現する酵素の種類が異なるという性質が示されている。これは多種の分子の共通のレセプターである AhR が、どんな分子であってもリガンド結合後には全く同一の反応をしているわけではなく、リガンドによって異なる挙動をしていることを示唆している。すなわちリガンドの AhR への親和性の他に、リガンド結合後の AhR と転写共役因子等の関連タンパクを含めた反応によりその分子の毒性が決定されることが考えられる。

AhR の TCDD 結合には PAS B と呼ばれる領域の前後 200 ~ 300 残基が必要であることが示されているが、リガンドとなる多種の分子全てが共通のドメインに結合し

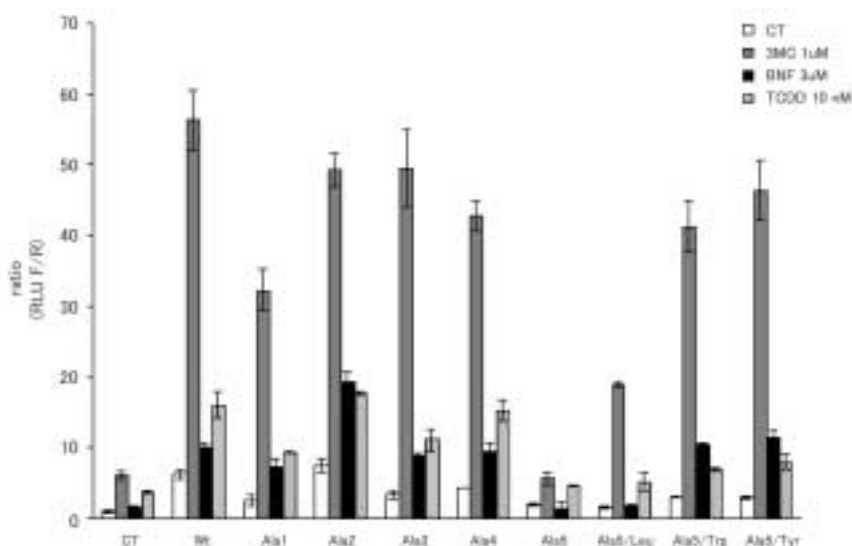


図 32 アミノ酸を置換した変異体 AhR の転写活性化とリガンド特異性
 CT : コントロール, 3MC : 3-メチルコランズレン, BNF : 1-ナフトフラボン, TCDD.

ているかはいまだ明らかとなっていない。そこでアラニンスキャンニング法で AhR のリガンド結合に関わるアミノ酸を同定し、多分子認識機構およびリガンド特異的遺伝子発現のメカニズムを解明しようと試みた。

AhR の PAS B ドメイン前後 250 アミノ酸から 5 個所の芳香族アミノ酸 (Phe および Tyr) を選び、それぞれ Ala に変えた変異体を作成した。これら AhR 変異体の転写誘導活性を HeLa 細胞に Arnt および XRE 依存性ルシフェーゼレポーター遺伝子と共に導入し、転写活性化をスクリーニングした。するとこのうち一つの変異体が誘導活性を示さず、さらにこのアミノ酸について Ala 以外に変えた変異体をいくつか作って誘導活性を調べてみると、Tyr, Trp といった芳香族アミノ酸に替えたものでは wild type と同様の活性が 3-メチルコランズレン、1-ナフトフラボン曝露で見られた。TCDD については Phe 以外の芳香族アミノ酸ではほとんど活性が戻らなかった。しかし Leu に変えたものでは、3-メチルコランズレンでは誘導されたが、1-ナフトフラボンおよび TCDD では誘導が見られなかった (図 32)。これらのことから、このアミノ酸がリガンド特異的結合に関与していると考えられた。

2.3.3 感受性要因としてのステロイドホルモンのシグナル伝達と細胞周期

TCDD の生体影響には、サルにおける子宮内膜症の増悪、ラット長期曝露実験におけるメス肝臓の発がんのように、エストロゲンホルモンの関与が示唆されるデー

タが報告されている。前特別研究、「環境中の「ホルモン様化学物質」の生殖・発生影響に関する研究」においてエストロゲン受容体の応答性の有無が TCDD 応答遺伝子 CYP1A1 の発現に関与していることが示唆された。そこで、本研究では、更に TCDD に対する感受性の決定要因としてどのようにエストロゲン受容体およびエストロゲンシグナル伝達が関わっているかを検討した。

(1) ホルモン受容体の発現レベルが異なる細胞間での TCDD 応答性の違い

乳腺上皮細胞がん由来株 (MCF-7), 子宮内膜がん由来株 (RL95-2) 前立腺がん由来株 (LNCaP) の 3 種を用いて、TCDD 曝露による CYP1A1 の発現応答を比較した。3 種の細胞とも TCDD の曝露によって CYP1A1 mRNA の発現及び EROD (7-ethoxyresorufin O-deethylase) 活性が誘導されたが、最も応答の低かった LNCaP と比べ MCF-7 及び RL95-2 の活性誘導は、それぞれ 15 倍及び 10 倍であった (図 33)。一方、Ah レセプター (AhR), Arnt の定常状態の発現を mRNA レベルで調べたところ 3 種の細胞株間では顕著な差は認められなかった。

さらに、TCDD で誘導されることが知られている他の遺伝子 2 種、CYP1B1 と plasminogen activator inhibitor-2 (PAI-2) の発現誘導を調べたところ、MCF-7 では、定常状態における CYP1B1 発現が高く、TCDD 曝露による発現誘導が認められなかった (図 34)。しかし、RL95-2 では、CYP1B1 の誘導が認められた。LNCaP

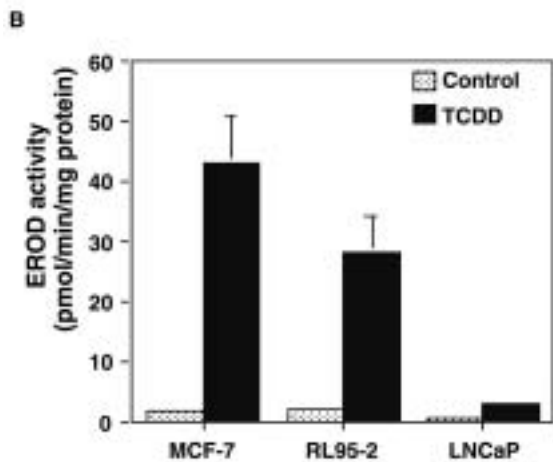
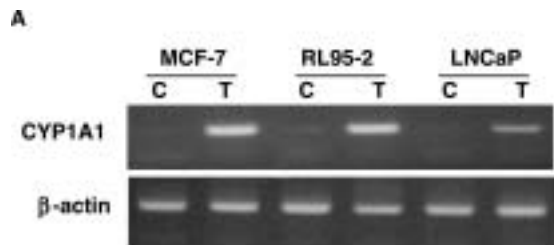


図 33 CYP1A1 mRNA 発現及び EROD 活性に対する TCDD の影響

A) CYP1A1 mRNA 発現, B) EROD 活性。細胞を 0.1% DMSO 及び 10 nM TCDD で 24 時間処理後、発現の測定のため全 RNA を抽出、RT-PCR 法により mRNA 量を調べた。EROD 活性は、細胞粗抽出液を用いて Poul & Founts の方法により比色法で調べた。

ではどちらの遺伝子も TCDD に対する応答は認められなかった。CYP1B1 は CYP1A1 と同様にエストロゲンの代謝酵素でもあり、正常な卵巣においては、性周期に依存した発現を示す。また、ヒトの乳がん組織で発現が高いことが知られており、このことは今回の実験で MCF-7 で定常時においてすでに高かった知見と一致している。PAI-2 は、乳がん、子宮内膜がん及び皮膚がんなどのがんの進展及び浸潤に関与するマーカー遺伝子として有用であるとの議論がさかんな分子である。MCF-7 と RL95-2 のようなエストロゲンシグナルに応答する組織においては、TCDD 曝露による CYP1B1 もしくは PAI-2 の応答が見られるが、前立腺のように通常アンドロゲン応答が優位な組織では認められないものと考えられた。

そこで、これら 3 種株における各種ステロイドホルモン受容体 (エストロゲン受容体 (ER- α , ER- β), アン

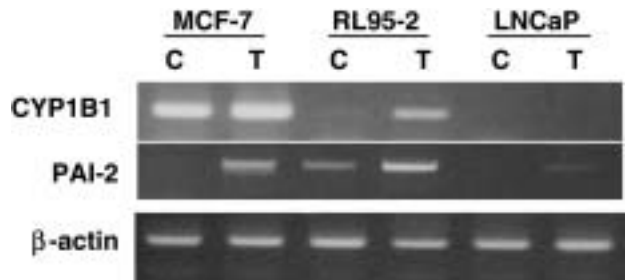


図 34 CYP1B1 mRNA 及び PAI-2 mRNA の発現に対する TCDD の影響

細胞の処理及び RT-PCR は図 33 と同様に行った。各遺伝子の PCR 産物は、CYP1B1 mRNA が 213, PAI-2 mRNA が 792 bp であった。

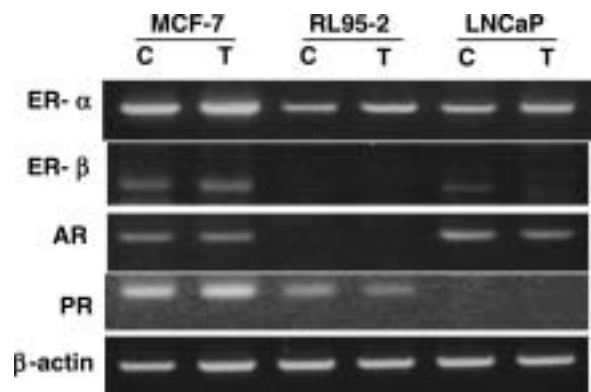


図 35 各種ホルモン受容体レベルと TCDD 応答性

ER- α (438 bp), ER- β (220 bp), AR (203 bp), PR (193 bp) の mRNA レベルを RT-PCR 法により調べた。C:コントロール, T: TCDD。

ドロゲン受容体 (AR), プロゲステロン受容体 (PR)) の mRNA 発現レベルを調べた (図 35)。ER- α の発現は 3 種の細胞とも認められたが MCF-7 が最も高く、他の 2 種のレベルは同様であった。ER- β は、MCF-7 のみ発現が認められた。AR は、MCF-7 と LNCaP で発現が認められた。PR の発現は MCF-7, RL95-2, LNCaP の順であった。しかしながら、TCDD 曝露によってこれらステロイドホルモン受容体の発現には変化が認められなかった。ここで用いた 3 種の細胞間での TCDD 曝露による応答遺伝子の発現誘導の違いは、部分的にはこれら受容体の発現レベルの違いが反映していると考えられた。すなわち、図 33 で示した EROD 活性のオーダーと ER- α のレベルの差とは一致しておらず、RL95-2 と LNCaP は ER- α レベルは同じであるが、LNCaP は EROD 活性及び PAI-2 の発現はかなり低い。このことは、ホルモン受容体だけでは説明がつかず、他の因子の

関与が考えられる。また、CYP1B1 の発現は、MCF-7 で定常状態のレベルですでに高い。これは MCF-7 において ER が高いことと関係があるかもしれない。

以上の実験結果は、曝露される側のホルモン受容体発現レベルや応答能の感受性の違いによって TCDD の応答性も変化する可能性があることを示唆している。

(2) 細胞回転速度の異なる細胞間での TCDD 応答の違い

女性生殖系における子宮内膜細胞、卵巣上皮細胞や胎盤絨毛細胞等は、他の体細胞と違い、性周期や妊娠期間中に細胞増殖を繰り返す。この細胞増殖には、エストロゲンが強く関与している。そこで、次に、細胞回転速度の異なる 2 種のヒトがん細胞株、胎盤絨毛がん細胞由来の BeWo 及び RL95-2 を用いて、TCDD 応答能の違いを検討した。細胞の発生、老化や腫瘍化には、細胞回転の制御が鍵と考えられている。その鍵分子のひとつテロメラーゼの発現応答に着目した。

テロメラーゼはテロメア DNA の修復を行う酵素である。テロメア DNA は、真核生物の染色体末端領域に存在する繰り返し配列（哺乳類の TTAGGG など）をもつ領域を指し、その機能構造体をテロメラーゼと呼んでいる（図 36）。通常、体細胞はテロメラーゼの活性がかなり低いので、テロメアの反復配列は完全には複製できず、細胞分裂のたびに短くなり、限界まで短縮すると分裂停止のシグナルが出て細胞は増殖できなくなると考えられている。これに対して、がん化した細胞では染色体異常にともなってこの遺伝子が活性化されるために、短いテロメアがテロメラーゼによって細胞分裂のたびに修復される。このため、がん細胞が無限に増殖できると考えら

れている。ヒトテロメラーゼのサブユニット hTERT の誘導は、がん細胞の増殖におけるテロメラーゼの活性化に起因するものである。このことから hTERT のプロモーター領域に Myc タンパクが直接結合し、転写を促すとの報告がある。テロメラーゼはまた、エストロゲンによっても活性化されることが示されている。このことから、TCDD もエストロゲンと同様にテロメラーゼの活性化に影響を及ぼして腫瘍の増殖や抑制に影響を及ぼす可能性が考えられる。

そこで、最初に BeWo 及び RL95-2 におけるテロメラーゼ活性をストレッチ PCR 法を用いて調べた。その結果をそれぞれ図 37 及び図 38 に示した。興味深いことに、BeWo 及び RL95-2 では、細胞の倍化速度が異なり、BeWo は 27 時間で、RL95-2 の 20 時間より遅い速度で増殖する。このことを反映して恒常状態の BeWo では、ラダーバンドが多く、テロメラーゼ活性が高い。1 nM エストロゲン（E2）でさらに活性化され、逆に 10 nM E2 では、コントロールレベルよりやや高いレベルであった。TCDD 曝露では 1 nM 及び 10 nM とともに顕著な活性上昇が認められ、E2 との共曝露では、逆に低下していた。一方、RL95-2 では、恒常状態の活性が低く、E2 の 1 nM 及び 10 nM と濃度依存的に活性が上昇していた。TCDD 曝露では影響が認められず、E2 との共曝露で活性の促進が認められた。このことを確かめるために、テロメラーゼの触媒サブユニットである hTERT の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 法によって定量した（図 39）。

BeWo 細胞においては、濃度依存性に多少の違いがあるもののテロメラーゼ活性を調べたときと同様に hTERT の発現が、E2 及び TCDD 曝露で対照とくらべ

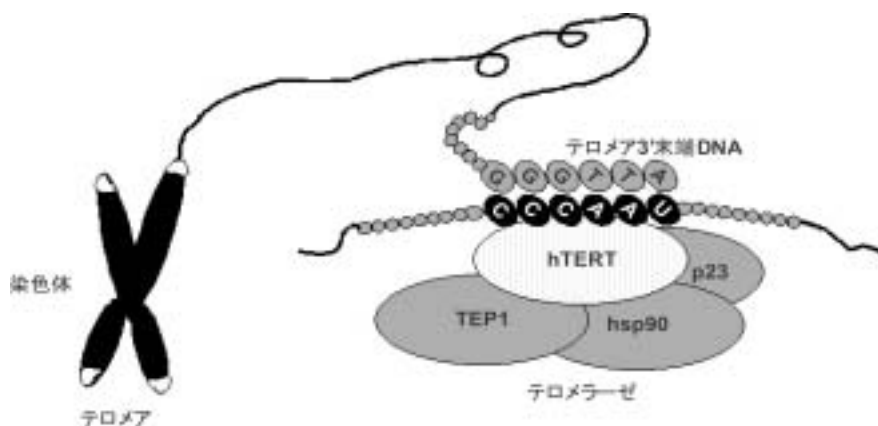


図 36 染色体，テロメア及びテロメラーゼの機能構造体の模式図

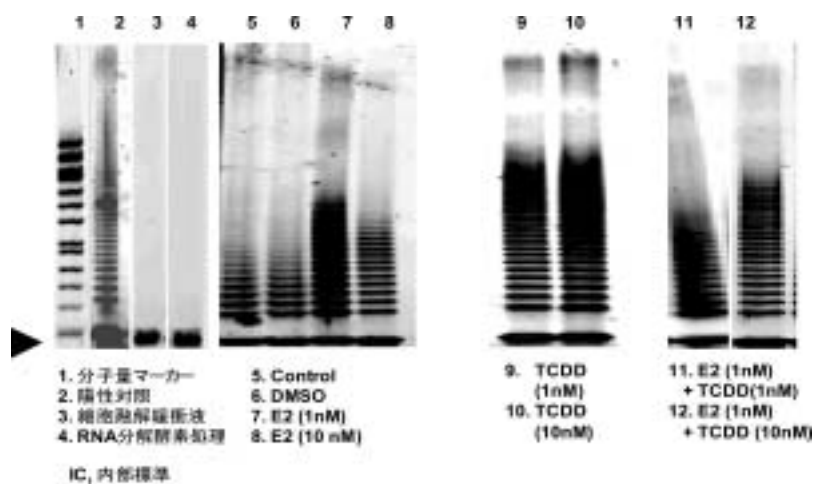


図 37 BeWo 細胞におけるテロメラーゼ活性に対するエストロゲン及び TCDD の影響
細胞を各薬剤で 24 時間処理後、細胞を融解し、これを材料としてストレッチ PCR 法
によりテロメラーゼ活性を調べた。陽性対照には MCF-7 細胞融解液を用いた。

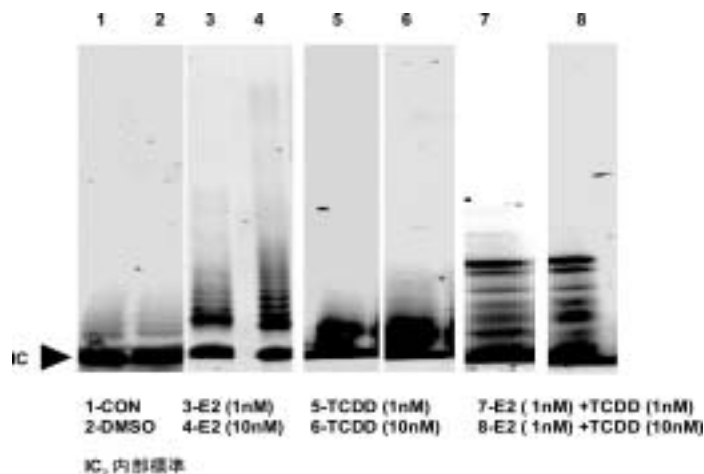


図 38 RL95-2 細胞におけるテロメラーゼ活性に対するエストロゲン及び TCDD の影響
細胞を各薬剤で 24 時間処理後、細胞を融解し、これを材料としてストレッチ PCR 法に
よりテロメラーゼ活性を調べた。

有意に上昇した。E2 による発現上昇には濃度依存性が認められたが、TCDD では認められなかった。活性を調べたときの結果と考え合わせると、10 nM では E2 も TCDD も活性上昇は飽和状態に達しているものと考えられた。また、E2 と TCDD の共曝露による発現上昇は、TCDD 単独のときよりも低かった。BeWo においては、E2 と TCDD は互いに拮抗する関係にあるものと示唆された。RL95-2 では、E2 による発現上昇が認められたものの TCDD 単独曝露ではまったく影響が認められなかった。E2 と TCDD の共曝露では、E2 単独より発現の上昇が認められた。RL95-2 では、BeWo と異なり、TCDD は E2 の作用を促進する可能性が考えられた。この TCDD の応答が何によって規定されるのかを追及す

るため、BeWo 及び RL95-2 における細胞周期の分画を調べた(図 40)。

細胞周期の分画に関する実験は、融合状態が 80 % となった細胞を採取し、細胞を浮遊状態させた後に FACS (Becton Dicknson) に注入して解析した。解析には ModFit LT (Becton Dicknson) を用いた。BeWo においては、hTERT の発現を調べたときの結果を反映するように E2 及び TCDD 曝露ともそれぞれ S 期細胞を増加させた。E2 と TCDD の共曝露ではそれぞれの単独曝露のときより S 期細胞の増加は小さかった。一方、RL95-2 では、10 nM TCDD の単独曝露及び E2 との共曝露のときに G0/G1 期細胞の増加に伴う S 期細胞の減少が見られた。

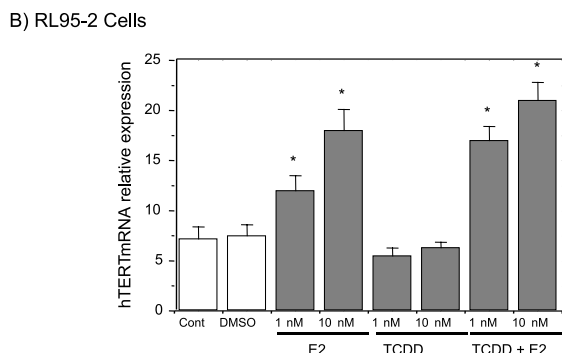
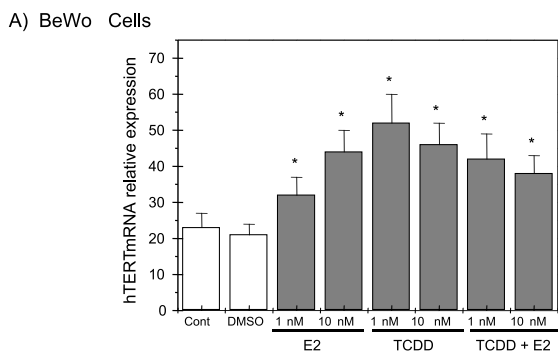


図 39 hTERT mRNA の発現に及ぼすエストロゲン及び TCDD の影響
細胞を各薬剤で 24 時間処理後、全 RNA を抽出、リアルタイム RT-PCR 法により各サンプルの発現レベルを定量した。A) Bewo 細胞, B) RL95-2 細胞 値は 3 ~ 4 例の平均 ± 標準偏差。DMSO からの有意差を * $P < 0.05$ で示す。

さらに、細胞周期に対する影響を確かめるために S 期細胞で活性化されることが知られている c-myc mRNA の発現を調べた。BeWo 細胞では、細胞周期の解析結果と同様に E2 及び TCDD の単独曝露、E2 と TCDD の共曝露ともそれぞれ c-myc mRNA の発現は上昇していた(図 41)。RL95-2 では、細胞周期の解析では S 期細胞の増加は認められなかったにもかかわらず、c-myc mRNA の発現が各単独曝露群で顕著な上昇を示しており、共曝露では、TCDD 単独曝露群より低かった(図 42)。

以上の結果より、細胞の回転速度によって、TCDD の影響が異なることがわかった。特に、FACS を用いた細胞分画の存在比に関する実験結果から、BeWo 細胞は G1/S 期の移行時に TCDD に対する感受性が高いことが示唆された。

2.4 まとめ

ヒトがどのくらいダイオキシンに曝露され、体内にどのくらい蓄積し、それがどのような生体反応を起しているのか、どのような影響の可能性のあるのかについて

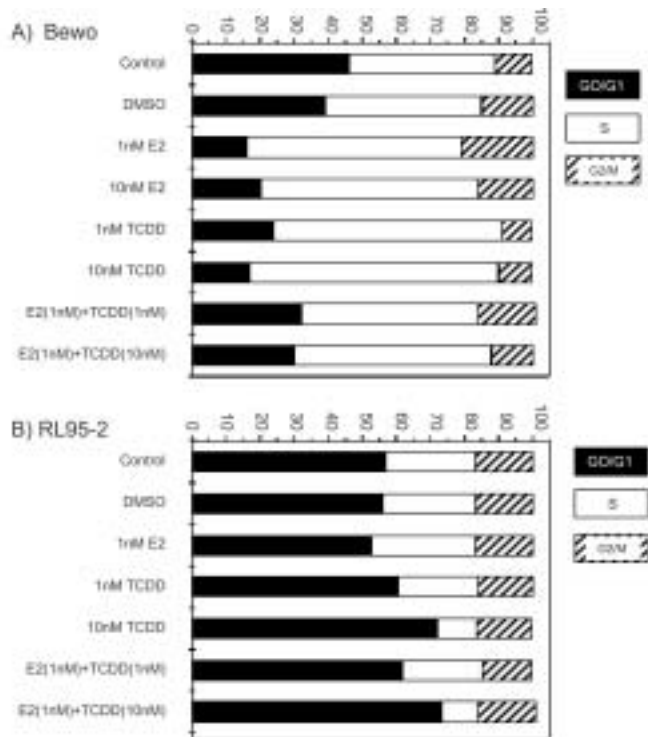


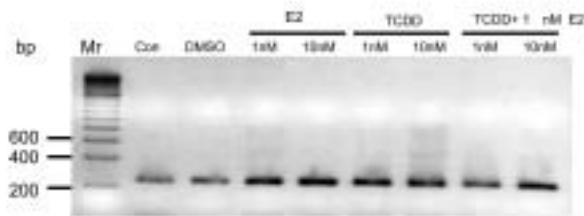
図 40 細胞周期分画に及ぼすエストロゲン及び TCDD の影響
細胞を各薬剤で 24 時間処理後、細胞を固定した後、フローサイトメーターによって DNA 含量及び細胞周期分画を解析した。A) Bewo 細胞, B) RL95-2 細胞 値は 3 ~ 4 例の平均 ± 標準偏差。DMSO からの有意差を * $P < 0.05$ で示す。

はよくわかっていないのが現状である。ダイオキシンの作用としては、近年、内分泌かく乱作用が注目されている。内分泌かく乱作用に対して感受性が高いと考えられる胎児期、新生児期の影響が懸念されている。

胎児期の曝露を知る目的で、羊水、胎脂中のダイオキシン類濃度を測定した。脂質あたりに換算すると、それぞれ成人の血清、脂肪と同等のレベルであり、胎児はダイオキシン曝露を受けていることが明らかとなった。また、羊水、胎脂の異性体組成は、脂肪組織のそれと異なり、体内に蓄積するダイオキシン類と、体外に排泄されるダイオキシン類の組成が異なることが示されたことは興味深い。

新生児の曝露を評価する目的で母乳中のダイオキシン類濃度の測定と、母乳中濃度に与える食事の影響を日本の 3 つの地域で調べた。3 地域の母乳中のダイオキシン類濃度は、平均で 7.2 ~ 13.1 pg I-TEQ/g-fat でこれまで報告されている日本人の母乳中レベルの範囲内であった。食事との関係では、魚摂取の多いところが必ずしもダイオキシン類濃度が高いわけではなかった。しかし、

A) アガロースゲル電気泳動



B) 相対値

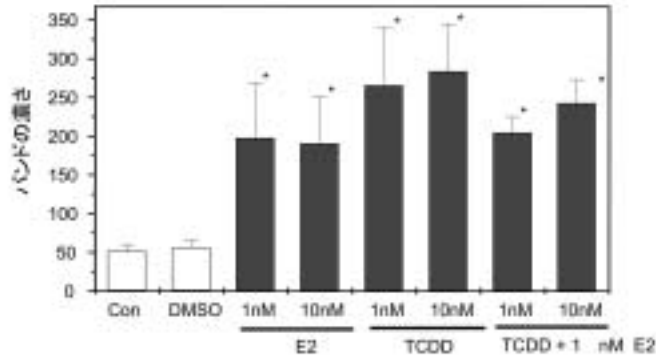
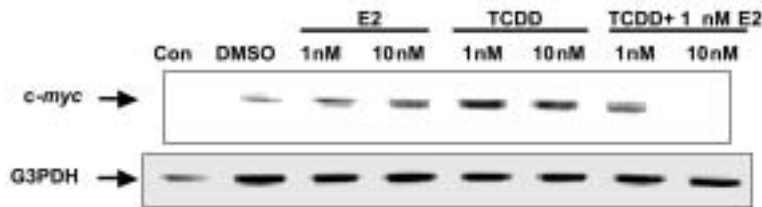


図 41 Bewo 細胞における c-Myc mRNA の発現に及ぼすエストロゲン及び TCDD の影響
細胞を各薬剤で 24 時間処理後、全 RNA を抽出、RT-PCR 法により各サンプルの発現レベルを
定量した。A) アガロース電気泳動で観察した発現の代表例、B) 電気泳動で観察されたバンド
を画像解析装置で読み取った値をグラフ化したもの。
値は 3 ~ 4 例の平均 ± 標準偏差。DMSO からの有意差を * $P < 0.05$ で示す。

A) アガロースゲル電気泳動



B) 相対値

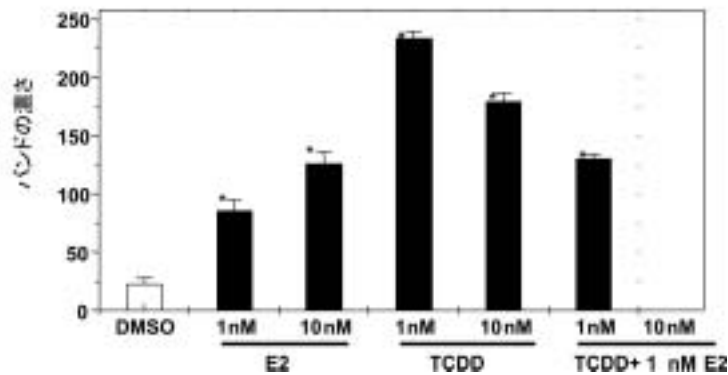


図 42 RL95-2 細胞における c-Myc mRNA の発現に及ぼすエストロゲン及び TCDD の影響
細胞を各薬剤で 24 時間処理後、全 RNA を抽出、RT-PCR 法により各サンプルの発現レベルを
定量した。A) アガロース電気泳動で観察した発現の代表例、B) 電気泳動で観察されたバンド
を画像解析装置で読み取った値をグラフ化したもの。
値は 3 ~ 4 例の平均 ± 標準偏差。DMSO からの有意差を * $P < 0.05$ で示す。

3つの地域をあわせて解析すると、魚類の摂取が多いことが母乳中のダイオキシン，Co-PCB濃度に寄与している傾向が示された。

ダイオキシン類の曝露が生体にどのような反応を引き起こしているかを知る目的で、ダイオキシン曝露の鋭敏な生体影響指標と考えられている薬物代謝酵素CYP1A1，CYP1B1の発現をヒト血液サンプルで調べた。まず、リアルタイムPCRによりCYP1A1，CYP1B1の発現を高感度に検出する系を確立した。この方法を用いて、埼玉と大阪の住民の血液サンプルについて、CYP1A1，CYP1B1の発現を測定し、血中ダイオキシン類濃度との関連を検討した。血中ダイオキシン類濃度は、埼玉、大阪でそれぞれ平均25.1，27.8 pg I-TEQ/g-fatで、両地域で差はなかった。CYP1A1の発現と血中ダイオキシン濃度との間に正の相関はみられず、埼玉では弱い負の相関が認められた。このことは、今回測定された血中ダイオキシン濃度は、CYP1A1発現に影響を与えるレベルではないと考えられた。血液中のCYP1A1の発現は、バックグラウンドレベルの曝露の生体影響指標とはなりにくいようである。

CYP1A1はダイオキシンにより誘導されるもっとも鋭敏な酵素であるが、血液中のリンパ細胞においては発現はCYP1B1より低い。一方、母乳は血液に比べてダイオキシン類濃度も高く、母乳に含まれる細胞においてはCYP1A1の発現はCYP1B1よりも高い。CYP1A1はCYP1B1よりもダイオキシンに対する反応性が高いため、母乳細胞は血球系の細胞よりも曝露影響を調べる上で有利な試料かもしれない。そこで、母乳細胞からのCYP1A1，CYP1B1発現の解析法を確立した。今後、母

乳細胞の生体影響指標の試料としての可能性について検討を行う予定である。

新たな生体影響指標を探る一環として、新規のダイオキシン応答遺伝子の探索をエストロゲン応答遺伝子の中から、マイクロアレイを用いて行った。TCDD曝露により、MCF-7細胞で74遺伝子、RL95-2細胞で67遺伝子の発現が変化した。この中から実際の細胞でのTCDDへの応答性をreal-time PCRで確認し、31の遺伝子の発現変化を見いだした。エストロゲン応答遺伝子をスポットしたマイクロアレイを用いることにより、効率よく新規のダイオキシン応答遺伝子を同定することができた。これらの遺伝子にはさまざまな機能のものが含まれ、いくつかのものについては胎児組織でTCDDへの応答性を確認している。これらの結果は、新規指標の開発、生体に及ぼすダイオキシンの影響、その作用機序の解明に役立つものと期待される。

ダイオキシン類の毒性には、動物種や系統によって感受性差が存在することが知られている。感受性要因を明らかにすることは、リスク評価にとって重要である。このような観点から感受性を規定する要因として、Ahレセプターのリガンド結合部位、CYP1A1の多型に注目して分子レベルでの検討を行った。また、ダイオキシンの毒性にエストロゲン、エストロゲンシグナル伝達に関与していることを細胞を用いた実験で示した。また、細胞が細胞周期のどの位置にあるかでTCDDに対する感受性が異なることを示した。

今後は、以上の成果を踏まえ、感受性の高い胎児期、乳児期のリスクを評価するための生体影響指標、リスク評価手法の開発に関する研究が必要とされる。

[資 料]

I 研究の組織と研究課題の構成

1 研究の組織

[A 研究担当者]

統括研究官	森田昌敏
首席研究官	兜 眞徳
環境ホルモン・ダイオキシンプロジェクトグループ	
プロジェクトグループリーダー	森田昌敏 (併)
健康影響研究チーム	米元純三・曽根秀子・西村典子
STA フェロー	Poonam Sarkar
NIES ポスドクフェロー	田中順子
CREST 技術員	座波ひろ子
共同研究員	椎崎一宏
環境健康研究領域	
領域長	遠山千春
分子細胞毒性研究室	大迫誠一郎・石村隆太
化学物質環境リスクセンター	
健康リスク評価研究室	青木康展

[B 客員研究員]

堤 治 (東京大学)	(平成 12 ~ 14 年度)
宮原裕一 (信州大学)	(平成 13 ~ 14 年度)
丹野恵一 (神戸市立看護大学)	(平成 12, 14 年度)
富田多嘉子 (静岡県立大学)	(平成 12 年度)
池田雅彦 (静岡県立大学)	(平成 12 ~ 13 年度)
吉田 緑 (佐々木研究所)	(平成 12 ~ 13 年度)

2 研究課題と担当者 (* 客員研究員)

(1) ダイオキシン類の曝露量, 体内負荷量の評価に関する研究

米元純三・兜 眞徳・堤 治*・宮原裕一*・丹野恵一*

(2) 生体影響指標の適用可能性の検討および新規指標の検索・開発に関する研究

曽根秀子・田中順子・椎崎一宏・座波ひろ子・富田多嘉子*・池田雅彦*・吉田 緑*

(3) ダイオキシン類に対する感受性の決定要因に関する研究

曽根秀子・Poonam Sarkar・椎崎一宏・青木康展・大迫誠一郎・石村隆太

Ⅱ 研究成果発表一覧

1 誌上発表

発表者・題目・掲載誌・巻(号)・頁・刊年

Yonemoto J.: The effects of dioxin on reproduction and development, *Ind. Health*, 38: 259-268, 2000

米元純三: オスの生殖機能への内分泌攪乱物質の影響, *治療学*, 34: 485-488, 2000

米元純三, 曾根秀子: ダイオキシンと性ホルモンとの相互作用, *廃棄物学会誌*, 別冊 11: 162-172, 2000

Shimba S., Hayashi M., Sone H., Yonemoto J., Tezuka M.: 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) induces binding of a 50 kDa protein on the 3' untranslated region of urokinase-type plasminogen activator mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 272: 441-448, 2000

宮原裕一, 米元純三: 物理化学的特性, 生体内代謝動態, 内分泌毒性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: 2422-2427, 2000

Nohara K., Fujimaki H., Tsukumo S., Ushio H., Miyabara Y., Kijima M., Tohyama C., Yonemoto J.: The effects of perinatal exposure to low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on immune organs in rats, *Toxicol.*, 154: 123-133, 2000

Sarkar S., Jana N.R., Yonemoto J., Tohyama C., Sone H.: Estrogen enhances induction of cytochrome P-4501A1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in liver of female Long-Evans rats, *Int. J. Oncol.*, 16: 141-147, 2000

Jana N., 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

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

米元純三: 「奪われし未来 - 増補改訂版 - 」書評, *廃棄物学会誌*, 24: 267, 2001

Ohsako S., Miyabara Y., Nishimura N., Kurosawa S., Sakaue M., Ishimura R., Sato M., Aoki Y., Sone H., Tohyama C., 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 5 α -reductase type 2 in contrast to decrease of androgen receptor in the pubertal ventral prostate, *Toxicol. Sci.*, 60: 132-143, 2001

Sakaue M., Ohsako S., Ishimura R., Kurosawa S., Kurohmaru M., Hayashi Y., Aoki Y., Yonemoto J., Tohyama C.: Bisphenol-A affects spermatogenesis in the adult rat even at a low dose, *J. Occup. Health*, 43(4): 185-190, 2001

Nishimura N., Miyabara Y., Suzuki J.S., Sato M., Aoki Y., Satoh M., Yonemoto J., Tohyama C.: Induction of metallothionein in the livers of female Sprague-Dawley rats treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, *Life Sci.*, 69: 1291-1303, 2001

Takeyama M., Sone H., 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

米元純三: 知っておきたい用語の解説 - 環境ホルモン, *小児科臨床*, 55(11): 104-107, 2002

Sone H., Yonemoto J.: Interaction between dioxin signaling and sex hormones, *J. Health Sci.*, 48(5), 385-392, 2002

Nishimura N., Miyabara Y., Sato M., Yonemoto J., 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, *Toxicol.*, 171: 73-82, 2002

Ishimura R., Ohsako S., Miyabara Y., Sakaue M., Kawakami T., Aoki Y., Yonemoto J., Tohyama C.: Increased glycogen content and glucose transporter 3 mRNA level in the placenta of Holtzman rats after exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 178: 161-171, 2002

- 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. Biophys. Res. Commun.*, 292 (2): 368-377, 2002
- Ikeda M., Inukai N., Mitsui T., Sone H., Yonemoto J., Tohyama C., Tomita T.: Changes in fetal brain aromatase activity following in utero 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin exposure in rats, *Environ. Toxicol. Pharm.*, 11: 1-7, 2002
- Ishimura R., Ohsako S., Miyabara Y., Sakaue M., Kawakami T., Aoki Y., Yonemoto J., 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-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 185: 197-206, 2002
- 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, *Toxicol.*, 172: 49-58, 2002
- Ohsako S., Miyabara Y., Sakaue M., Ishimura R., Kakeyama M., Izumi H., Yonemoto J., 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
- Nishimura N., Miyabara Y., Sato M., Yonemoto J., 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, *Toxicol.*, 171: 73-82, 2002
- Kakeyama M., Sone H., Miyabara Y., 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 Toxicol.*, 24: 207-217, 2003
- Nishimura, N., Yonemoto J., Miyabara Y., Sato M., Tohyama C.: Rat thyroid hyperplasia induced by gestational and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, *Endocrinol.*, 144: 2075-2083, 2003
-

宮原裕一, 西村典子, 大迫誠一郎, 石村隆太, 野原恵子, 曾根秀子, 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

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

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 (IFTS) 学術集会, 松江, 2000.7

米元純三: 21 世紀の健康と環境, 第 48 回日本教育医学会大会, 水戸, 2000.8

Ohsako S., Ishimura R., Aoki Y., Tohyama C., Yonemoto J.: Decrease of androgen sensitivity in the ventral prostate of male rats exposed maternally to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), 20th Int. Symp. Halogenat. Environ. Org. Pollut. & POPs (Dioxin 2000), Monterey, 2000. 8

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 Int. Symp. Halogenat. Environ. Org. pollut. & POPs (Dioxin 2000), Monterey, 2000. 8

Kabuto M., Sone H., Imai H., Kurokawa Y., Yonemoto J.: Dioxins in milk or blood in relation to thyroid hormones and other possible biomarkers among people in a highly polluted area in Japan, 20th Int. Symp. Halogenat. Environ. Org. pollut. & POPs (Dioxin 2000), Monterey, 2000. 8

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

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

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, 曾根秀子, 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

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 5 α -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, 2000.10

久寿米木幸寛, 川野道宏, 米元純三, 森田昌敏, 遠山千春, 曾根秀子: エストロゲン応答遺伝子の探索と同定, 日本内分泌攪乱化学物質学会第 3 回研究発表会, 横浜, 2000.12

川野道宏, 中島民江, 鈴木智尋, 吉田 緑, 米元純三, 遠山千春, 曾根秀子: 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, 日本内分泌攪乱化学物質学会第 3 回研究発表会, 横浜, 2000.12

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, 日本内分泌攪乱化学物質学会第 3 回研究発表会, 横浜, 2000.12

掛山正心, 遠山千春, 曾根秀子: 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, 日本内分泌攪乱化学物質学会第 3 回研究発表会, 横浜, 2000.12

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, 日本内分泌攪乱化学物質学会第 3 回研究発表会, 横浜, 2000.12

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, 日本内分泌攪乱化学物質学会第 3 回研究発表会, 横浜, 2000.12

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

- 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 Rats, 40th. Annu. Meet. Soc. Toxicol., San Francisco, 2001.3
- 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. 40th. Annu. Meet. Society of Toxicology, San Francisco, 2001.3
- Nishimura N., Miyabara Y., Sato M., Tohyama C., Yonemoto J.: Thyroid hyperplasia induced by gestational and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, 9th Int. Congr. Toxicol. Brisbane, 2001.7
- Yonemoto J., Jana N.R., Sarkar S., Ishizuka M., Tohyama C., Sone H.: Role of target steroid hormones in cellular responsiveness to CYP1A1 induction by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in MCF-7, RL95-2 and LNCaP cells, 21st Int. Symp. Halogenat. Environ. Org. Pollut. & POPs, "Gyeongju, (Korea)", 2001.9
- Ikeda M., Mitsui T., Tamura M., Setani K., Kakeyama M., Sone H., Tohyama C., 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 Int. Symp. Halogenat. Environ. Org. Pollut. & POPs (Dioxin 2001), "Gyeongju (Korea)", 2001.9
- Nishimura N., Miyabara Y., Sato M., Tohyama C., Yonemoto J.: Alterations in thyroid function in Holtzman rats following gestational and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 21th Int. Symp. Halogenat. Environ. Org. Pollut. & POPs (Dioxin 2001), "Gyeongju (Korea)", 2001.9
- Kabuto M., Yonemoto J., Sone H., Imai H., Todoroki H., Kaneko T., Yamamoto R., Yamaguchi T.: Correlation between fish intake and dioxin in human milk at the individual level, 21th Int. Symp. Halogenat. Environ. Org. Pollut. & POPs (Dioxin 2001), "Gyeongju (Korea)", 2001.9
- 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, 2001.11
- 米元純三, 遠山千春, 尾根田暁, 永田良一: 妊娠期 2,3,7,8-TCDD 投与ラットの多世代影響, 日本内分泌攪乱化学物質学会第4回研究発表会, つくば, 2001.12
- 田中順子, 小口しのぶ, 木山亮一, 米元純三, 曾根秀子: エストロゲン応答遺伝子マイクロアレイを利用した TCDD 応答遺伝子の探索, 日本内分泌攪乱化学物質学会第4回研究発表会, つくば, 2001.12
- Miyabara Y., Takeuchi Y., Nishimura N., Yokoi C., Ohsako S., Sone H., Yonemoto J., Tohyama C.: Effects of arylhydrocarbon receptor gene on disposition of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin through pregnancy and lactation in mice, 4th Annu. Meet. Jpn. Soc. Endocr. Disrupters Res., Tsukuba, 2001.12
- Nishimura N., Yonemoto J., Miyabara Y., Sone H., Ohsako S., Maeda S., Kuriyama-F.Y., Tohyama C.: Study on the mechanisms of a decrease in circulating levels of thyroxine in response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in aryl hydrocarbon receptor-null mice and transthyretin-null mice, 4th Annu.Meet.Jpn.Soc.Endocr.Disrupters Res., Tsukuba, 2001.12
- Setani K., Ikeda M., Kakeyama M., Tamura M., Suzuki C., Yamashita J., Sone H., Tohyama C., Tomita T.: Effects of *in utero* and lactational exposure to TCDD on the differentiation of sexually dimorphic nucleus in the preoptic area, 4th Annu. Meet. Jpn. Soc. Endocr. Disrupters Res., Tsukuba, 2001.12
- Nishimura N., Yonemoto J., Miyabara Y., Sone H., Ohsako S., Maeda S., Fujii-Kuriyama Y., Tohyama C.: Mechanisms of a reduction of thyroid hormone levels in response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in aryl hydrocarbon receptor-null mice and transthyretin-null mice, 4th Annu.Meet.Jpn.Soc.Endocr.Disrupters Res., Tsukuba, 2001.12
- Nishimura N., Yonemoto J., Miyabara Y., Sone H., Ohsako S., Maeda S., Fujii-Kuriyama Y., 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., Soc. of Toxicol. 41th Annu. Meet., Nashville, 2002.3

米元純三, 宮原裕一, 大迫誠一郎, 曾根秀子, 野原恵子, 西村典子, 石村隆太, 前田秀一郎, 池田雅彦, 遠山千春: 実験動物における 2,3,7,8-TCDD の体内負荷量と各種エンドポイントとの関係, 第 72 回日本衛生学会総会, 津, 2002.3

Nishimura N., Yonemoto J., Miyabara Y., Sone H., Ohsako S., Maeda S., Kuriyama-F.Y., 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. Soc. Toxicol.: 41th Annu. Meet., Nashville, 2002.3

Sarkar P., Sone H., Tohyama C., Yonemoto J.: Induction of telomerase by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and estrogen in BeWo cells, Soc. Toxicol.: 41th Annu. Meet., Nashville, 2002.3

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, 2002.6

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 Int. Symp. Microsomes and Drug Oxidations, Sapporo, 2002.7

Ohsako S., Fukuzawa H N., Ishimura R., Sone H., Fujii-Kuriyama Y., Tohyama C.: Alterations in the reproductive system of male mice by perinatal TCDD exposure are dependent on AhR gene, 14th Int. Symp. on Microsomes and Drug Oxidations, Sapporo, 2002.7

Ohsako S., Yonemoto J., Tohyama C.: Low-dose exposure to dioxin, its male reproductive toxicity and health risk assessment, 5th FAOPS CONGRESS KUALA LUMPUR, Kuala Lumpur, 2002.9

Nishimura N., Yonemoto J., 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, 2002.9

Yonemoto J., Nishimura N., Yokoi C., Takeuchi Y., 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, 22th Int. Symp. Halogenat. Environ. Org. Pollut. & POPs (Dioxin 2002), Barcelona, 2002.8

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, 22th Int. Symp. Halogenat. Environ. Organic Pollutants & POPs (Dioxin 2002), Barcelona, 2002.8

Yonemoto J., Nishimura N., Yokoi C., Takeuchi Y., Tohyama C.: Lactational rather than *in utero* exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin caused hypothyroxinemia at weaning of Holtzman rats, 日本内分泌攪乱化学物質学会第 5 回研究発表会, 広島, 2002.11

西村典子, 米元純三, 横井千紗子, 竹内陽子, 遠山千春: ダイオキシンおよび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, 日本内分泌攪乱化学物質学会第 5 回研究発表会, 広島, 2002.11

座波ひろ子, 曾根秀子, 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, 日本内分泌攪乱化学物質学会第 5 回研究発表会, 広島, 2002.11

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ー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, 日本内分泌攪乱化学物質学会第 5 回研究発表会, 広島, 2002.11

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ールの作用メカニズム 2.甲状腺ホルモンへの影響, 日本内分泌攪乱化学物質学会第 5 回研究発表会, 広島, 2002.11

Miyabara Y., Ohtani S., Takeuchi Y., Yonemoto J., Tohyama C.: Bioaccumulation of dioxins in the liver of wild Large Japanese field mice (*Apodemus speciosus*). 日本内分泌攪乱化学物質学会第 5 回研究発表会, 広島, 2002.11

田中順子, 曾根秀子, 木山亮一, 米元純三: エストロゲン応答遺伝子マイクロアレイを利用した TCDD 応答遺伝子の探索, 第 25 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2002.12

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, 2002.12

田中順子, 米元純三: エストロゲン応答遺伝子マイクロアレイを利用した TCDD 応答遺伝子の探索, 第 2 回千葉大学 DNA マイクロアレイ Workshop, 千葉, 2003.2

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: クロスフォスティング実験, 第 73 回日本衛生学会, 大分, 2003.3

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 回日本衛生学会, 大分, 2003.3

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 回日本衛生学会, 大分, 2003.3

Nishimura N., Yonemoto J., Yokoi C., Takeuchi Y., Ikushiro S., Tohayma C.: Lactational not *in utero* exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin disrupts thyroid hormone homeostasis in Holtzman rats, Soc. Toxicol. 42nd Annu. Meet., Salt Lake City, 2003

REPORT OF SPECIAL RESEARCH FROM
THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES, JAPAN

国立環境研究所特別研究報告

SR - 50 - 2003

平成 15 年 9 月 30 日発行

編 集 国立環境研究所 編集委員会

発 行 独立行政法人 国立環境研究所

〒 305-8506 茨城県つくば市小野川 16 番 2

電話 029-850-2343 (ダイヤルイン)

印 刷 前田印刷株式会社筑波支店

〒 305-0033 茨城県つくば市東新井 14-3

Published by the National Institute for Environmental Studies
16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506 Japan
September 2003

無断転載を禁じます

