

課題名 C-0906 受容体AhRの転写活性化を伴わないダイオキシン類の新たな毒性発現メカニズムの解明

課題代表者名 遠山 千春 (東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター健康環境医工学部門)

研究実施期間 平成21～23年度

累計予算額 13,325千円(うち23年度 3,825千円)
予算額は、間接経費を含む。

研究体制

- (1) cPLA₂遺伝子欠損マウスにおけるダイオキシン曝露による水腎症に関する研究、及びダイオキシン曝露マウス腎臓におけるサイトカインの解析に関する研究(東京大学・大学院医学系研究科)
- (2) ダイオキシン曝露マウス尿管の形態と機能の解析(東京大学・大学院医学系研究科、(独)国立環境研究所・環境リスク研究センター)

研究協力機関

University of California, Davis.

研究概要

1. はじめに(研究背景等)

ダイオキシン類の毒性は、生殖機能や記憶・学習機能への悪影響、および発癌性など多岐にわたる。さらに、発生や発達の特定の時期に影響を受け易いことが知られている。毒性の多様性は、想定される毒性現象に関して発生・発達の様々な時期のうち、もっとも低用量で生じる毒性のエンドポイントに焦点を当てて検証する必要がある。こうした方法は、これまで多くの研究者により採用されている毒性試験の主要な方法であるが、他方、これら毒性に共通する根本的なメカニズム解明を行うことによって、ダイオキシン毒性の多様性の解明を行うことも重要である。すなわち、ダイオキシン類の毒性発現メカニズムを解明することによって毒性発現の範囲と程度を推定することが可能となり、より適切なリスク評価を行うための基本情報が提供できる。このダイオキシン毒性発現の分子メカニズムのこれまでのパラダイムは、「まずダイオキシンが転写因子AhRと結合し、そして、ダイオキシン・AhR複合体が結合する標的遺伝子に異常な転写活性化が生じ、その結果として毒性が発現する」というものであった。しかしこれまでのパラダイムだけでは、ダイオキシン類が多様な毒性現象を引き起こすメカニズムを説明できなかった。ごく最近、細胞を用いた研究によって「ダイオキシン類が受容体AhRの転写活性化を伴わない反応を引き起こす」ことが示された。この新しく発見されたダイオキシン類が細胞質で引き起こす反応は、これまでのパラダイムでは説明されない反応であり、これまで明らかにされてこなかったダイオキシン類の毒性発現メカニズムを説明する反応である可能性がある。この可能性は、新しく発見された反応を仲介する因子であるcPLA₂やCOX-2が学習や炎症や細胞質内の応答などの幅広い生命現象を調節する因子であることから、高いものであると考えられる。

2. 研究開発目的

ダイオキシン類が引き起こす、ほぼすべての種類の毒性と同様に、ダイオキシン類による水腎症の発症にはAhRが必須であることから、AhRが転写因子として作用する標的遺伝子のダイオキシンによる異常な転写誘導が水腎症発症の契機となると考えられてきた。我々は、プロスタノイド合成の誘導性酵素であるシクロオキシゲナーゼ2(COX-2)が、AhRのシグナル伝達の川下において水腎症発症にとって極めて重要な役割を果たしていることを明らかにしていた。このCOX-2のダイオキシン曝露による誘導は、これまで前提とされてきたAhRの転写活性化を前提とするパラダイムとは異なる分子基盤であるAhRのノンジェノミック作用で引き起こされる可能性が、研究協力者であるカリフォルニア大学教授松村博士によって提唱されていた。そこで、AhRのノンジェノミック作用がダイオキシン毒性を引き起こすか検証する動物実験系の研究開発を目的とした。さらに、サイトカイン類がAhRのノンジェノミック作用と毒性発現を仲介する分子である可能性から、ダイオキシンを曝露した新生仔マウスの腎臓におけるサイトカイン類の変化を解明することを目的とした。さらに、ダイオキシンが多様な毒性現象を引き起こすこと、毒性影響の生じる時期について発達時期特異性が存在することなど、リスク評価に大きな影響を与える問題が、AhRのノンジェノミック作用に起因するのではないかと考えられた。そこで、ダイオキシンがマウス

に引き起こす腎奇形である水腎症をエンドポイントとして、毒性発現メカニズムを明らかにすることを目的とした。

具体的には、「AhRのノンジェノミック作用がどのように腎機能を攪乱して水腎症を引き起こすのか解明すること」を目標として、ダイオキシン曝露が引き起こす水腎症について、直接の原因となる腎・尿管の機能と構造の変化を明らかにすることを目的とした。

3. 研究開発の方法

(1) cPLA₂遺伝子欠損マウスにおけるダイオキシン曝露による水腎症に関する研究、及びダイオキシン曝露マウス腎臓におけるサイトカインの解析に関する研究

AhRのノンジェノミック作用が動物個体におけるダイオキシン毒性に及ぼす影響を検証する方法を開発することを目別に、マウスを用いた曝露実験系を構築した。マウス系統は、ダイオキシンに対して高感受性であるC57BL/6Jを、ダイオキシンとしては毒性が最も強い2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)を用いた。AhRのノンジェノミック作用を評価するために、AhRのノンジェノミック経路で重要な位置にあるcPLA₂について欠損型と野生型を比較するという方法を採用した。エンドポイントとしては、曝露によってマウス新生仔に生じる奇形である水腎症を用いた。水腎症はダイオキシン毒性の主要なものであり、症状の進行によって腎実質消失による腎機能不全という重篤で不可逆的な結果を引き起こす。ダイオキシン曝露によるマウス授乳期水腎症について、本研究の代表者らは、COX-2発現上昇が原因であることを明らかにしていた。また、COX-2はAhRのノンジェノミック経路によって発現上昇することが、細胞を用いた実験系では明らかにされていた。これらのことを総合して、水腎症をエンドポイントすることが適切であると判断した。

ダイオキシン曝露による授乳期水腎症においては、COX-2と共に炎症関連因子に含まれるサイトカイン類の発現上昇が起こることが明らかになっていた。サイトカインは細胞間のシグナル伝達を担う液性因子であり、広範な生命現象を仲介する調節因子である。サイトカイン類を網羅的に定量することで、ダイオキシン曝露が引き起こす毒性発現の原因となる分子の特定や多様な毒性現象が生じるメカニズムの解明につながる可能性があると考えられた。そこで、ダイオキシン曝露による腎臓中のサイトカイン量の変化の解析を本サブテーマの研究目的とした。

曝露実験は以下の手順で行った。ダイオキシンに対して高感受性であるC57BL/6系統を遺伝的背景とするcPLA₂α欠損マウスを用いて、ヘテロ欠損型の雌雄を交配した。出産後1日目の母マウスにTCDDを経口投与することで産仔に対して経母乳曝露した。経母乳曝露された新生仔について、PCR法によるcPLA₂α遺伝子型の判別を行い、ホモ遺伝子欠損型と野生型の産仔の腎臓について組織学的解析を行った。具体的には、HE染色した腎切片についてBryantらの方法に従って水腎症の有無とその程度を判定した。また、尿中PGE₂をELISA法で、腎臓中COX-2mRNA量をRT-qPCR法で、それぞれ定量した。

炎症性サイトカインの解析のためには、C57BL/6系統のAhR野生型マウスを用いて、出産後1日目の母マウスに体重1 kg あたり10 µg のTCDDを経口投与することで経母乳曝露した。授乳量が同程度となるようにするため、産仔数を日齢(PND) 1で6匹に調整した。出生後のPND 1, 3, 5, 7, 9 に麻酔下で解剖を行った。サイトカインの定量は、微量サンプルを用いて多項目同時測定が可能なLuminexシステムを利用して行い、TCDD曝露に伴い変動するサイトカインのスクリーニングを行った。発現レベルの上昇がみとめられたサイトカインについてはRT-qPCRによる確認を行った。

(2) ダイオキシン曝露マウス尿管の形態と機能の解析に関する研究

AhRのノンジェノミック作用が如何にしてダイオキシン毒性を引き起こすか解明することを目別に、マウスを用いた曝露実験を行うこととした。マウス系統はC57BL/6Jを、ダイオキシンとしてはTCDDを用いた。ダイオキシン曝露がマウス新生仔に水腎症を引き起こす直接の原因としては尿管の物理的閉塞ではないことが明らかになっており、泌尿器系の何らかの機能異常であることが予想されていた。この泌尿器系の異常として、尿管の層構造の消失による蠕動運動阻害が有力と考えられた。そこで、尿管横断面切片の組織学的解析と尿管蠕動運動の解析によって、それぞれ構造と機能の側面からダイオキシンによる影響を評価することとした。また、尿排出能を担う重要な構造体である腎乳頭の発達の度合いを検証した。加えて、ダイオキシンが腎臓の生理機能を攪乱する可能性についても検証した。腎機能としては、本研究の過程で尿産生量が増加しているという観察を解剖学的に得たことから、尿産生量の指標として膀胱中尿重量を、尿濃縮能の指標として尿浸透圧を測定した。曝露実験手順は次のとおりである。出産後1日目の母マウスに0, 10, 20, 80 µg/kg の何れかの用量のTCDDを経口投与することで産仔に対して経母乳曝露した。PND 3, 5, 7, 9, 11, 14 において解析を行った。

4. 結果及び考察

(1) cPLA₂遺伝子欠損マウスにおけるダイオキシン曝露による水腎症に関する研究、及びダイオキシン曝露マ

ウス腎臓におけるサイトカインの解析に関する研究

マウス産仔に経母乳曝露を行ったところ、TCDD曝露による水腎症の発症率は野生型では100%であったのに対し、cPLA₂α遺伝子欠損型の曝露群では35.7%と顕著に低かった。また、重症度についても、cPLA₂α遺伝子欠損型の曝露群では野生型に比して顕著に抑制された。この結果から、cPLA₂αはダイオキシン曝露による授乳期水腎症の発症を引き起こす重要な分子であることが明らかになった。cPLA₂αが如何にして水腎症発症に影響を与えるかを明らかにするために、TCDD曝露によるマウス授乳期水腎症の原因となるCOX-2について発現レベルの指標としてmRNA量を、活性レベルの指標としてPGE₂量を測定した結果、TCDD曝露によるCOX-2のmRNA量と活性の増加は、cPLA₂αに依存することが明らかになった。また、水腎症発症に伴って発現量の減少する遺伝子であるNKCC2、ROMK AQP2についても、cPLA₂αcPLA₂αに依存することが明らかになった。これらの結果から、TCDD曝露によるマウス授乳期水腎症について、cPLA₂αは原因となる分子の上流に位置して発症に影響を与える分子であることが明らかになった。

ダイオキシン曝露マウスの腎臓において、曝露と発症を仲介する分子の探索を行うために、Luminexシステムを利用してサイトカイン類の定量を行った。その結果、ケモカインであるIP-10、MCP-1、MIGと炎症性サイトカインであるIL-1β、TNF-α、IL-6の量が増加することを発見した。しかしながら、これらのサイトカイン類の変化がcPLA₂α遺伝子の有無に依存するという結果は得られなかった。このことから、これらのケモカインと炎症性サイトカインはcPLA₂αの関与するAhRのノンジェノミック作用と水腎症を仲介する分子ではない可能性が高いと考えられる。また、これまで想定されてきたパラダイムの分子基盤であるAhRのジェノミック経路と、本研究でダイオキシン毒性に影響を与えることが明らかになったcPLA₂αを経由する経路の関係を検証するために、前者の経路によって発現レベルの上昇することの知られている遺伝子のmRNA量を測定した。その結果、AhRのジェノミック経路の活性化の指標となる遺伝子の発現にcPLA₂αは影響を及ぼさないことが明らかになった。他方、AhRのノンジェノミック経路に位置するとされるcSrcに関連してcSrc kinaseのmRNA量がcPLA₂α依存的にTCDD曝露によって増加した。また、cPLA₂αの発現レベルがTCDD曝露で上昇することも明らかになった。以上の結果から、cPLA₂αはAhRのジェノミック経路には影響を与えないこと、cSrc kinaseやCOX-2の発現レベルに重要な役割を果たすことが示され、本研究の目的であるノンジェノミック経路が機能しない動物実験モデルが構築できたものと考えられる。特筆すべきことは、cPLA₂αの構成する経路の下流にダイオキシン曝露による水腎症発症が位置することである。すなわち、ダイオキシン毒性の少なくとも1つは、AhRのノンジェノミック作用によって引き起こされるものと考えられる。

(2)ダイオキシン曝露マウス尿管の形態と機能の解析

TCDD曝露個体の腎臓で、PND 3では腎乳頭の長さには曝露影響が認められなかったが、PND 5, 7では対照群と比較してTCDD曝露群の方が短い傾向にあった。腎臓の短軸長に対する腎乳頭の長さの比率は、PND 5ではTCDD曝露群の方が小さい傾向にあり、PND 7ではTCDD曝露群の方が有意に小さかったが、尿管の層構造に関しては、大きな形態変化が認められなかった。蠕動運動に関しては、曝露影響が認められなかった。以上の結果から、ダイオキシン曝露が、尿排出に重要な腎と尿管の構造に変化を引き起こすことは明らかになったが、当初想定した尿管層構造の消失のような蠕動運動障害に直ちに結びつくような変化は見出すことができなかった。このことに対応して、蠕動運動にも水腎症発症に至るような変化が観察されなかった。

一方、水腎症発症に結びつきうる腎機能変化として尿濃縮阻害を新たに想定し、尿濃縮能の指標として尿浸透圧と尿量の指標として尿重量を測定した。その結果、TCDD曝露群では尿浸透圧が有意に減少し、また、尿重量が顕著に増加した。以上の結果から、TCDD曝露に授乳期のマウス新生仔の尿量を増やす作用があることが明らかになった。TCDD曝露による尿量の増加と、水腎症発症との関連が示唆されたことから、TCDD曝露による尿量増加を抗利尿ホルモン作用のある1-Desamino-8-D-arginine vasopressin (dDAVP)を用いて抑制する実験を行った。その結果、TCDD単独曝露群に比べてdDAVPを同時に曝露した群では、ダイオキシン曝露による尿量増加の程度が顕著に抑制され、ダイオキシン非投与群レベルとなった。また、腎臓について組織学的解析を行ったところ、dDAVPを同時に曝露した群の水腎症発症率、重症度ともに、TCDD単独曝露群に比べて顕著に低下した。以上の結果から、TCDD曝露による水腎症は、TCDDによる尿産生量増加に起因することが明らかになった。

5. 本研究により得られた主な成果

(1)科学的意義

これまでのダイオキシン毒性の分子基盤についての理解は、受容体AhRによって転写活性化される遺伝子が毒性発現を引き起こすというものであった。最近新たに発見されたAhRのノンジェノミック作用は、in vitro 実験系における現象であり、毒性発現に果たす役割は不明であった。本研究では、ダイオキシン毒性におけるAhRのノンジェノミック作用の役割を検証するモデル実験系を開発することに成功した。このことによって、AhRのノンジェ

ノミック作用に関する研究が今後大きく進展するものと考えられる。さらに、本研究は開発したマウス曝露実験系を利用して、AhRのノンジェノミック作用がダイオキシン曝露による水腎症を引き起こす原因であることを示すことに成功した。この発見は、これまでのパラダイムによらない分子基盤がダイオキシン毒性の原因となることを意味しており、ダイオキシン毒性研究の新しい局面を拓く重要なものである。

ダイオキシン毒性は、種差や系統による差が大きいこと、感受性の高い時期が存在することから、その毒性現象の全貌を把握することが困難である。この困難を克服するために、ダイオキシン類の毒性発現メカニズムを解明することによって毒性発現の条件・範囲・程度を推定することが可能ではないかと考えられてきた。一般に環境化学物質の毒性発現に関わる標的分子の解明はほとんどなされていない。ダイオキシン毒性の研究分野では、最近になってエンドポイントについて原因となる遺伝子について報告がなされてきた。このような状況にあって、本研究では、曝露から発症に至るまでの経路を分子・生理学レベルで明らかにすることができた。ダイオキシンの毒性発現メカニズム研究の最先端を切り開く研究ができたと言える。

(2) 環境政策への貢献

ダイオキシンが発達の時期特異的に幅広い毒性現象を引き起こすことから、その影響の全貌を解明し適切なリスクを評価することが困難であった。リスク評価のためには、比較的単純な用量反応関係の研究も有効ではあるが、これだけではリスク評価の為に基礎的知見として充分とは言えない。毒性が発現する分子メカニズムを解明することによって、初めて様々な動物種に共通で生じる毒性の分子基盤情報が明らかになる。本研究は、これまで知られていなかった分子基盤がダイオキシン毒性の原因であることを示した。この作用が細胞内カルシウムや炎症関連因子といった汎用性の高い生体内分子に変化を及ぼすものであることから、このAhRのノンジェノミック作用が水腎症以外の様々な毒性の解明の鍵となる発見に結びつくことが期待できる。すなわち、信頼に足るリスク評価を下すための基盤となる知見を提供したことになる。

種々の化合物がダイオキシン様毒性を持つかを検証するために、AhRの転写活性化能を指標とするレポーターアッセイシステムが利用されている。本研究は、AhRの転写活性化能に基づかないダイオキシン毒性が存在することを明らかにした。このことは、上記レポーターアッセイシステムのみでダイオキシン毒性を評価することが不適切である可能性を示唆している。ダイオキシン毒性を持つ化学物質のリスク評価に影響し得る新たな科学的知見をもたらしたものと考えられる。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

- 1) B. DONG, N. NISHIMURA, C. F. VOGEL, C. TOHYAMA, and F. MATSUMURA: Biochem Pharmacol, 79, 3, 487-497 (2010)
“TCDD-induced cyclooxygenase-2 expression is mediated by the nongenomic pathway in mouse MMDD1 macula densa cells and kidneys.”
- 2) W. YOSHIOKA, R. E. PETERSON, C. TOHYAMA: J Steroid Biochem Mol Biol, 127, 96-101 (2011).
“Molecular targets that link dioxin exposure to toxicity phenotypes.”

(2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) W. YOSHIOKA, K. AIDA-YASUOKA, T. KAWAGUCHI, N. FUJISAWA, S. OHSAKO, S. HARA, C. TOHYAMA: SOT2012, The Annual Meeting of the Society of Toxicology, San Francisco, USA, (2012)
“Involvement of PGE₂ and urine volume increase in the onset of dioxin-induced hydronephrosis in mice.”
- 2) 遠山千春: 第39回日本毒性学会学術年会 (2012) 学会長招聘講演。「環境毒性学から疾患研究への展開...水腎症発症の分子毒性メカニズムの解明」

7. 研究者略歴

課題代表者: 遠山 千春

東京大学医学部卒業、医学博士、Ph.D.、東京大学大学院医学系研究科教授

研究参画者

(1): 遠山 千春 (同上)

(2): 西村 典子

京都女子大学家政部卒業、医学博士、(独)国立環境研究所環境リスク研究センター主任研究員、2010年退職。

遠山千春

吉岡 亘

予算額は、間接経費を含む。

【要旨】ダイオキシンの発達の時期特異的に多様な毒性現象を引き起こすことから、その毒性現象の全貌を解明し適切なリスクを評価することが困難であった。ダイオキシン毒性発現の分子メカニズムのこれまでのパラダイムは、「まずダイオキシンが転写因子 AhR と結合し、そして、ダイオキシン・AhR 複合体が結合する標的遺伝子に異常な転写活性化が生じ、その結果として毒性が発現する」というものであった。細胞を用いた研究によって最近新しく発見された「ダイオキシン類が受容体 AhR の転写活性化を伴わない反応を引き起こす」というこれまでのパラダイムでは説明されない反応が、ダイオキシン類の多様な毒性発現を説明する反応である可能性が高いと考え、この新たな反応である AhR のノンジェノミックパスウェイがダイオキシン毒性に関与するか検証するための実験系の研究開発を行った。発達時期特異的毒性である水腎症をエンドポイントとして、上記の反応経路の主要な分子である cPLA₂ を欠損したマウスに対し、ダイオキシンとして 2,3,7,8-四塩素化ジベンゾ-*p*-ジオキシン(TCDD)を用いた曝露実験を行った。その結果、水腎症の発症とその原因となる COX-2 の発現上昇が cPLA₂ の欠損により抑制されることが明らかになった。一方、従来のパラダイムで説明される AhR の転写活性化の標的遺伝子は cPLA₂ 遺伝子型に影響を受けなかった。毒性の仲介因子であると想定したサイトカインも同様であった。本研究では、ダイオキシン毒性における AhR のノンジェノミック作用の役割を検証するモデル実験系の開発し、AhR のノンジェノミック作用がダイオキシン曝露による水腎症を引き起こす原因であると示すことに成功した。この発見は、これまでのパラダイムによらない分子基盤がダ

イオキシンの原因となることを意味しており、ダイオキシン毒性研究の新しい局面を拓き、また、リスク評価の精緻化に寄与するものと考えられる。

【キーワード】 ダイオキシン、水腎症、毒性発現メカニズム、cPLA₂、リスク評価

1. はじめに

化学物質の中には、難分解性で環境中に残留するものが存在する。その多くは、過去に農薬や工業用材料として用いられたものである。これらの使用歴のある国では、現在でも汚染が問題となっている¹⁾。また、製造や使用歴のない地域の住民からも、難分解性有機化学物質であるポリ塩化ビフェニル (PCB) が検出された²⁻⁴⁾。さらに海洋生物からも、海域間での濃度差こそあれ、難分解性有機化学物質が検出されている⁵⁾。これらの報告から、難分解性有機化学物質の地球規模での広がりや汚染が危惧されている。

難分解性有機化学物質は、生体系での食物連鎖を経て生物体内に濃縮されることから、高等動物ほど高濃度で蓄積するという性質をもつ。実際に北極圏の高等動物から高濃度の PCB やジクロロジフェニルトリクロロエタン (DDT) が検出され⁶⁾、これが原因と考えられる生殖器異常や奇形の発生が報告されている⁷⁾。このような、残留性が高く生物に有害な影響を及ぼすおそれのある有機物は残留性有機汚染物質 (POPs) と定義され、2001 年には、削減や廃絶にむけた「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約」が採択された。

POPs の 1 つであるダイオキシン類は、塩素の置換された位置と数の違いにより区別される 210 種類の塩素化芳香族炭化水素の総称である。内訳は、ポリ塩素化ジベンゾパラダイオキシン (PCDDs ; polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins) 同族体・異性体の計 75 種と、ポリ塩素化ジベンゾフラン (PCDF ; polychlorinated dibenzo-*p*-furans) 同族体・異性体の計 135 種である。さらに、ポリ塩素化ビフェニル (PCBs ; polychlorinated biphenyl) の同族体・異性体の計 209 種のうち平面構造を有する (コプラナー-PCBs) 12 種も、ダイオキシン類と同様の毒性を示す化合物として知られる。ダイオキシン類は毒性の強さがそれぞれ異なり、最も毒性の強い化合物は 2,3,7,8-四塩素化ジベンゾ-*p*-ダイオキシン (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin ; TCDD) である。TCDD は常温では無色の固体であり、水には難溶である。800℃以上で完全に分解されるが、通常的环境下では難分解性で環境残留性が高い。ダイオキシン類とコプラナー-PCB の中で 29 種類の化合物は、実際に TCDD と同様の生体毒性を持つことが明らかにされており、リスク管理の対象物質として分類されている⁸⁻¹⁰⁾。様々な毒性強度を持つダイオキシン類の中で、個別の強度を評価する手段として毒性等量が用いられる。毒性等量は、最も毒性の強い TCDD を 1 として相対的な毒性を示した毒性等価係数に、実測濃度を掛けた数値の合計である。

ダイオキシン類は、主に廃棄物処理場の燃焼過程において非意図的産物として環境中に放出される環境汚染物質であり、脂溶性であることから、体内から排出されにくく生体内に濃縮されや

すい。ヒトや野生生物は、主に食物連鎖を介してダイオキシン類を生体内に取り込み、その大部分は脂肪組織や肝臓に蓄積する^{11, 12)}。ヒトでは特に脂肪組織への分布が高い傾向にある¹³⁾。TCDD の体内からの消失半減期は生物種によって大きく異なり、本研究で使用したマウス C57BL/6 系統は 11 日と比較的短い¹⁴⁾、WHO によるとヒトは 7.5 年と設定されており、非常に長い¹⁵⁾。

ダイオキシン類によるヒトへの健康被害が報告されている。1968 年に、西日本を中心に発生したカネミ油症では、原因となった米ぬか油および患者の血液や脂肪組織から PCB や PCDF が検出された。油症では、クロルアクネ（塩素挫創）などの皮膚症状、視力低下、痺れなどの神経症状が観察された^{16, 17)}。同様の曝露事故は台湾でも発生した¹⁶⁾。1976 年イタリアのセベソで起きた化学工場の爆発事故では、TCDD に曝露された工場周辺の地域住民が、曝露濃度に比例して塩素挫創を発症した¹⁸⁾。またこの地域での出産調査では、出産児の性比が女子側に偏っていた¹⁹⁾。さらに他の例として、ベトナム戦争でオレンジ剤の撒布に従事し、ダイオキシン類に曝露された米国退役軍人を対象とした調査では、糖尿病などの糖代謝障害と TCDD 曝露との関連性が示唆された²⁰⁾。国際ガン研究機関（IARC）では、ダイオキシン類のうち TCDD をグループ 1（ヒトに対して発ガン性がある）として分類されている。

実験動物を用いた研究では、TCDD の成熟個体への高用量・単回投与により、急激な体重減少^{21, 22)}、肝臓肥大^{23, 24)}、胸腺萎縮²⁵⁾を消耗性症候群と称される伴う病態が引き起こされることが明らかになっている。また発ガンプロモーション作用を有すること²⁶⁾が報告されている。このような TCDD の様々な毒性発現は、転写因子である aryl hydrocarbon receptor (AhR) を介して行われることが、AhR 欠損マウスを用いた研究により証明されている²⁷⁻²⁹⁾。しかし、AhR シグナル伝達経路において AhR よりも下流の詳細なメカニズムについてはほとんど明らかにされていない。

上記の毒性現象に加えて、幼若動物においては、成熟個体で顕著な毒性が観察されない用量でも次世代（胎仔や新生仔）に悪影響が及ぶことが報告されている。例えば、TCDD の長期曝露による流産、妊娠率の低下が示唆され^{30, 31)}、3 世代目の出生仔においても低体重および性周期の異常が明らかになった³²⁾。また、胎仔や新生仔への母体経由の曝露では、奇形の発生、生殖機能の異常、甲状腺機能異常などが報告されている³³⁻³⁵⁾。このように、曝露が引き起こす毒性影響について感受性の高い時期が存在するということがダイオキシン毒性の特徴であり、毒性影響の全貌を解明することを難しいものになっている。この困難を乗り越えてダイオキシン類の毒性影響を評価するために、発生・発達の様々な時期のうち、もっとも低用量で生じる毒性のエンドポイントに焦点を当てて検証されてきた。こうした方法は、これまで多くの研究者により採用されている毒性試験の主要な方法である。他方、これら毒性に共通する根本的なメカニズム解明を行うことによって、ダイオキシン毒性の多様性の解明を行うことも重要である。すなわち、ダイオキシン類の毒性発現メカニズムを解明することによって毒性発現の範囲と程度を推定することが可能となり、より適切なリスク評価を行うための基本情報を共有できるようになる。

ダイオキシン類の毒性発現メカニズムとしてこれまで想定されてきたパラダイムは、「まずダ

イオキシシが転写因子 AhR と結合し、そして、ダイオキシシ・AhR 複合体が結合する標的遺伝子に異常な転写活性化が生じ、その結果として毒性が発現する」というものであった。ダイオキシシ曝露が AhR 依存的に多くの遺伝子の発現量を増やすこと^{36, 37)}、ダイオキシシ類が引き起こすほぼすべての毒性現象の発現に AhR が必須であること³⁸⁻⁴⁰⁾がこのパラダイムの根拠とされている。このパラダイムに則って網羅的な遺伝子発現解析が数多くなされてきた。しかしながら、AhR による転写活性化の標的遺伝子が毒性発現の原因となることが明らかになっている例は、ダイオキシシ曝露による血圧上昇⁴¹⁾を例外として、他の主要な毒性現象については長年の研究にも関わらずみつかっていない⁴²⁾。このように、これまでのパラダイムだけでは、ダイオキシシ類が多様な毒性現象を引き起こすメカニズムを説明できない状況であった。

本研究では、以下に述べる AhR のノンジェノミックな作用についての新たなアイデアを取り入れることによってこれまで解明されて来なかったダイオキシシ毒性の発現メカニズムが明らかになるのではないかと考えた。この AhR のノンジェノミックな作用は、細胞を用いた最近の研究で明らかになった。すなわち、「ダイオキシシ類によって受容体 AhR が核内で引き起こす転写活性化とは別に、AhR は細胞質内のシグナル伝達経路を活性化する」という細胞質内で起こる現象⁴³⁾である。AhR のノンジェノミック作用と呼ぶことが提唱されたこの新しく発見された AhR の作用は、カルシウムシグナルを介して生理活性物質群プロスタノイドの合成酵素や細胞内シグナル伝達を担う分子を活性化する^{44, 45)}ものであり、その下流で幅広い影響を引き起こすと考えられた。したがって、ダイオキシシ類が引き起こす多様な毒性現象の原因となる可能性があると考えられた。しかしながら、AhR のノンジェノミック作用がダイオキシシ曝露された動物個体で機能するか、さらには、ダイオキシシ毒性に関与するかということは不明であった。そこで、本研究では、ダイオキシシ受容体 AhR のノンジェノミック作用がダイオキシシによる発達時期特異的な毒性現象に及ぼす影響を解明することを目標とし、そのために必要な方法を開発することとした。図 1-1 の核内に示した経路が従来のパラダイムによる毒性発現であり、細胞質内に示した経路が新しいパラダイムによる毒性発現である。本研究は、後者を研究対象とした。前者と後者の経路は、AhR までが共通で、その下流で分岐すると考えられている。分岐後の後者の経路を構成する分子の 1 つである cPLA₂ は細胞質型フォスホリパーゼ A₂ であり、細胞膜に存在するリン脂質をアラキドン酸に変換する酵素である。アラキドン酸はシクロオキシゲナーゼ(COX)を始めとする各種酵素群によって生理活性物質群であるプロスタノイドやロイコトリエン等に変換される。cSrc は非受容体型チロシンキナーゼであり、標的蛋白質のリン酸化を介して細胞内シグナル伝達を調節する分子である。

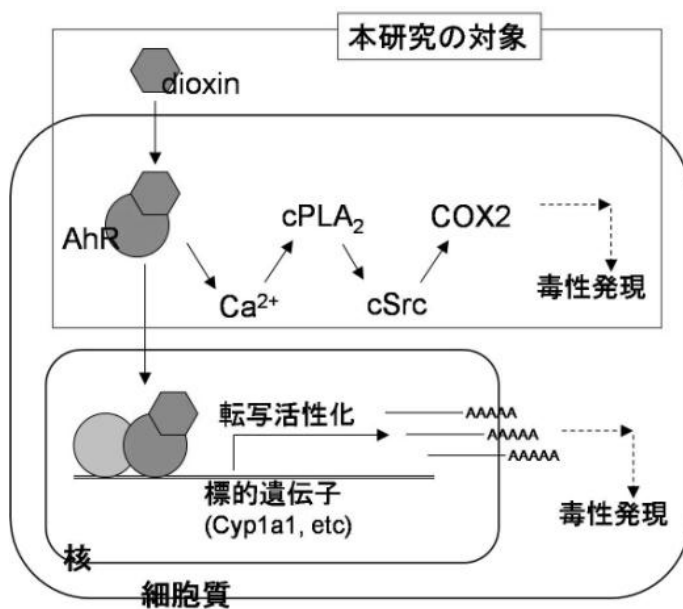


図 1-1. 受容体 AhR の転写活性化を伴わないノンジェノミック作用とダイオキシン毒性の概念図

2. 研究開発目的

本サブテーマでは、ダイオキシン曝露が引き起こす毒性現象に関して、これまで想定されてきたパラダイムに基づかない新しい分子基盤が存在するということを明らかにしようとした。これまで想定されてきたパラダイムとは「ダイオキシンが転写因子 AhR と結合し、ダイオキシン・AhR 複合体が結合する標的遺伝子に異常な転写活性化が生じ、その結果として毒性が発現する」というものである。このパラダイムの中で AhR が発揮する作用は、核内のゲノム(genome)中に存在する標的遺伝子の転写を引き起こす作用であることから、AhR のジェノミック(genomic)作用と呼ぶべきものである。一方、新しい分子基盤とは「ダイオキシンによって活性化した AhR が細胞質内でカルシウムシグナルを介して cPLA₂ とその下流で cSrc や COX-2 を活性化する」という AhR のノンジェノミック作用である。AhR のノンジェノミック作用は様々な培養細胞を用いてダイオキシンによって活性化することが最近明らかにされてきたが、動物個体におけるダイオキシンによる毒性現象に関与するかということについては不明であった。

AhR のノンジェノミック作用がダイオキシン毒性に及ぼす影響を個体レベルで検証する実験系はこれまで存在しなかった。そこで、AhR のノンジェノミック作用の影響を検証できる動物実験系を開発することを目的とした。このために、AhR のノンジェノミック作用が細胞質内で引き起こす一連のシグナル経路(AhR のノンジェノミック経路)で重要な位置をしめる cPLA₂ に着目した。その理由は、AhR 自身はジェノミック経路とノンジェノミック経路の両方に必要な分子であり、AhR のノンジェノミック経路にあって上流に位置する cPLA₂ が本研究で対象とするのに適切だと考えられたことである。実際に細胞を用いた研究では、cPLA₂ の活性を阻害することで AhR のノンジェノミック経路を介したシグナルが下流に伝わらなくなることが示されている⁴⁴⁻⁴⁶⁾。これらのことから、cPLA₂ 欠損マウスを用いて、AhR のノンジェノミック経路が機能しない場合にダイオキシン毒性が発現するか否かを検証する動物実験系を構築することを具体的な目的とした。

3. 研究開発方法

本研究では、AhR のノンジェノミック作用が動物個体におけるダイオキシン毒性に及ぼす影響を検証する方法を開発することを目標として、マウスを用いた曝露実験系を構築した。対象としたマウス系統は、ダイオキシンに対して高感受性である C57BL/6J である。またダイオキシン同族体のうち、毒性が最も強い 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)を用いた。AhR のノンジェノミック作用を評価するために、AhR のノンジェノミック経路で重要な位置にある cPLA₂ について欠損型と野生型を比較するという方法を採用した。TCDD 曝露により cPLA₂ 野生型で生じる毒性現象が欠損型のマウスで生じない場合に、その毒性現象は AhR のノンジェノミック作用によって起こると判断することとした。ダイオキシン曝露が cPLA₂ のサブタイプである

cPLA₂αの発現誘導を行うことが幾つかの培養細胞では知られていた^{47, 48)}。そこで、本研究ではcPLA₂としてサブタイプαを用いて以下の研究を行った。エンドポイントとしては、曝露によってマウス新生仔に生じる奇形である水腎症を用いた。水腎症はダイオキシン毒性の主要なものであり、症状の進行によって腎実質消失による腎機能不全という重篤で不可逆的な結果を引き起こす。ダイオキシン曝露によるマウス授乳期水腎症について、本研究の代表者らは、COX-2 発現上昇が原因であることを既に明らかにしていた²⁹⁾。また、COX-2 は AhR のノンジェノミック経路によって発現上昇することが、細胞を用いた実験系で、研究協力者の Matsumura らによって明らかにされていた⁴⁴⁾。これらのことを総合して、水腎症をエンドポイントすることが適切であると判断した。

ダイオキシン曝露による授乳期水腎症においては、COX-2 と共に炎症関連因子に含まれるサイトカイン類の発現上昇が起こることが明らかになっていた²⁹⁾。サイトカインは細胞間のシグナル伝達を担う液性因子であり、広範な生命現象を仲介する調節因子である。サイトカイン類を網羅的に定量することで、ダイオキシン曝露が引き起こす毒性発現の原因となる分子の特定や多様な毒性現象が生じるメカニズムの解明につながる可能性があると考えられた。そこで、ダイオキシン曝露による腎臓中のサイトカイン量の変化の解析を本サブテーマの研究目的とした。

曝露実験は以下の手順で行った。ダイオキシンに対して高感受性である C57BL/6 系統を遺伝的背景とする cPLA₂α欠損マウスを用いて、ヘテロ欠損型の雌雄を交配した。出産後 1 日目の母マウスに TCDD を経口投与することで産仔に対して経母乳曝露した。経母乳曝露された新生仔について、PCR 法による cPLA₂α遺伝子型の判別を行い、ホモ遺伝子欠損型と野生型の産仔の腎臓について組織学的解析を行った。具体的には、HE 染色した腎切片について Bryant らの方法⁴⁹⁾に従って水腎症の有無とその重症度を判定した。また、尿中 PGE₂ を ELISA 法で、腎臓中 COX-2 mRNA 量を RT-qPCR 法でそれぞれ定量した。

炎症性サイトカインの解析のためには、C57BL/6 系統の AhR 野生型マウスを用いて、出産後 1 日目の母マウスに体重 1 kg あたり 10 µg の TCDD を経口投与することで経母乳曝露した。授乳量が同程度となるようにするため、産仔数を PND1 で 6 匹に調整した。出生後の日齢(PND) 1, 3, 5, 7, 9 に麻酔下で解剖を行った。サイトカインの定量は、微量サンプルを用いて多項目同時測定が可能な Luminex システムを東京大学医学部附属病院神経内科のご厚意により利用させていただき、TCDD 曝露に伴い変動するサイトカインのスクリーニングを行った。発現レベルの上昇が認められたサイトカインについては RT-qPCR による確認を行った。

4. 結果及び考察

(1) cPLA₂遺伝子欠損マウスにおけるダイオキシン曝露による水腎症に関する研究

本研究のために導入した cPLA₂α遺伝子欠損マウス⁵⁰⁾について、まず、AhR の遺伝子の配列解析を行った(図 1-2)。AhR はダイオキシン毒性の決定因子であり、AhR の遺伝子型の違いによっ

てダイオキシン毒性に対する感受性が大きく異なることがその理由である。この解析の結果から、AhR 遺伝子の配列は高感受性型の AhR^{b1} であることが判明した。このことから、このマウス系統が本研究の目的に適うと判断して曝露実験を行ったところ、本系統の cPLA₂α 野生型マウス系統はダイオキシン受容体 AhR が高感受性型であるにも関わらず、曝露影響に関しては予想に反して低感受性であることが判明した。そこで、2009-2010 年にかけて cPLA₂α 遺伝子欠損マウスを C57BL/6J 系統に対して戻し交配を行った。3 世代の戻し交配の後に再び曝露実験を行い、HE 染色により水腎症の有無・重症度を判定したところ、20 µg/kg の用量が全てのマウスで発症する用量であること、曝露により尿中 PGE₂ 量ならびに腎臓中 COX-2 mRNA 量が増加することを見出し、我々の研究目的に適う動物であることが確認できた。

そこで、20 µg/kg の TCDD を母マウスに投与することで cPLA₂ 野生型および欠損型の産仔に母乳を介した TCDD 曝露を行った。生後 14 日 (PND 14)における産仔の TCDD 曝露による水腎症の発症率は野生型では 100%であった。一方、cPLA₂α 遺伝子欠損型の曝露群では、野生型と比べて顕著に低かった (表 1)。また、重症度についても、cPLA₂α 遺伝子欠損型の曝露群では野生型に比して顕著に抑制された。この結果から、cPLA₂α はダイオキシン曝露による授乳期水腎症の発症を引き起こす重要な分子であることが明らかになった。

cPLA₂α が如何にして水腎症発症に影響を与えるかを明らかにするために、TCDD 曝露によるマウス授乳期水腎症の原因となる COX-2 に関して、発現レベルの指標として mRNA 量を、活性レベルの指標として PGE₂ 量を測定した (図 1-3)。その結果、TCDD 曝露による COX-2 の mRNA 量と活性の増加は、cPLA₂α に依存することが明らかになった。また、水腎症発症に伴って発現量の減少する遺伝子である NKCC2, ROMK, AQP2 についても、cPLA₂α に依存することが明らかになった (図 1-4)。これらの結果から、TCDD 曝露によるマウス授乳期水腎症について、cPLA₂α は原因となる分子の上流に位置して発症に影響を与える分子であることが明らかになった。

これまで想定されてきたパラダイムの分子基盤である AhR のジェノミック経路と、本研究でダイオキシン毒性に影響を与えることが明らかになった cPLA₂α を経由する経路の関係を検証するために、前者の経路によって発現レベルの上昇することの知られている遺伝子の mRNA 量を測定した (図 1-5)。その結果、AhR のジェノミック経路の活性化の指標となる遺伝子である CYP1A1, AhRR, IGFBP-1 の発現に cPLA₂α は影響を及ぼさないことが明らかになった。他方、AhR のノンジェノミック経路に位置するとされる cSrc に関連して cSrc kinase の mRNA 量が、cPLA₂α 依存的に TCDD 曝露によって増加した (図 1-6)。ダイオキシン曝露による授乳期水腎症の原因遺伝子である COX-2 についても、曝露による発現上昇は cSrc kinase と同じく cPLA₂α 依存であった。これらの結果は、ダイオキシン曝露による COX-2 の発現増加が、CYP1A1 に代表されるような AhR のジェノミック作用ではなく、cPLA₂α や cSrc が構成する AhR のノンジェノミックパスウェイによって引き起こされることを示唆している。また、cPLA₂α の発現レベルが TCDD 曝露で上昇することも明らかになった。

以上の結果から、cPLA₂α は AhR のジェノミック経路には影響を与えないこと、cSrc kinase や

COX-2 の発現レベルに重要な役割を果たすことが示され、本研究の目的であるノンジェノミック経路が機能しない動物実験モデルが構築できたものと考えられる。AhR のノンジェノミック作用が最近発見されたものであることからその全貌は未だ明らかでなく、今後のさらなる検証が必要であるが、この新しい AhR のノンジェノミック作用を検証するための有用な系の開発に成功したといえる。特筆すべきことは、cPLA₂αの構成する経路の下流にダイオキシン曝露による水腎症発症が位置することである。すなわち、ダイオキシン毒性の少なくとも 1 つは、AhR のノンジェノミック作用によって引き起こされるものと結論付けることが妥当である。

(2)ダイオキシン曝露マウス腎臓におけるサイトカインの解析に関する研究

ダイオキシン曝露マウスの腎臓において、水腎症発症に伴って変化するサイトカインを探索するために、Luminex システムを利用してサイトカインの定量を行った。その結果、ケモカインである IP-10, MCP-1, MIG と炎症性サイトカインである IL-1β, TNF-α, IL-6 の量が増加することを発見した(図 1-7)。これらのサイトカイン類の量の変化と、AhR のノンジェノミック作用あるいは水腎症との関係を検証するために、cPLA₂α遺伝子欠損マウスの腎臓における発現量を IP-10 と IL-1βについて測定した。その結果、これらのケモカインと炎症性サイトカインの mRNA 量は TCDD 曝露によって増加すること、その増加が cPLA₂αには依存しないことが明らかになった(図 1-8)。このことから、IP-10 や IL-1βは cPLA₂α の関与する AhR のノンジェノミック作用と水腎症を仲介する分子ではない可能性が高いと考えられる。本研究で発見したサイトカイン類の顕著な誘導は、ダイオキシン曝露によって引き起こされる、水腎症以外のその他の毒性に関与する可能性がある。この可能性については、非常に興味深いことではあるが、本研究のテーマからは外れるため、今後の課題とすることにした。

GTGTGTGGC	TCCTTTGAC	GCTGGTGGC	CCACGGTGT	CCGGAGAGG	50	CCACTGAGG	ATGAAGAAG	ACGAGAGCAT	TTACAGAAGC	GAAGTACGTC	1550
CTCAGCCCG	AGCGACCCG	AGGACGAAC	GGTGGACGA	CTCGGGGTG	100	GCTGCCCTC	ATGTTTGCTA	CCGAGAGGC	TGTGTTGTAC	GAGATCTCCA	1600
GCTGCCAGG	AGGGTTGTGA	GCGACGCCG	GGCACAGCG	GGGAGCCGG	150	GCCCTTTCT	TCCATAATG	GATCCCTAC	CAATACGCAC	CAAAAGCAAC	1650
AAGCCCTAGA	GCACTGCGG	CCCTCCTGAC	CCTCGGGACC	GGGCGGGCT	200	ACTAGCAGGA	AAGACTGGG	TCCCAGTCA	ACCCCAAGTA	AGGATTCTTT	1700
AGCGTGC GG	TTTCTCCTCC	GCGGCCAGCT	CGGGCAGCCC	GAGTCTCTC	250	CCACCCAGT	TCTTTATGA	GTGCCCTCAT	CCAGCAGGAT	GAGTCCATCT	1750
TGTGCGCGG	ACCTGCGCG	CGGGTGCTG	CGGCCCTCG	CGGCGGCTCA	300	ATCTGTGTC	TCTTCAAGC	CCTGCGCTGT	TAGACAGCCA	TTTTCTCATG	1800
CCTGGGCGCA	GCGCGGGCAG	GGCGCGCCT	CGGGACGCA	GGTGGAGCG	350	GGCTCCGTGA	GCAAGTGGG	GAGTTGGCAA	GACAGCTTTG	CGGCCGAGG	1850
GCAGGGCGCG	GGCACCATA	GCAGCGGGC	CAACATCAC	TATGCCAGCC	400	AAGTGAGGCT	GCGCTGAAAC	ATGAGCAAA	TGGCCATGCT	CAGGACGTGA	1900
GCAAGCGGCG	CAAGCGGTG	CAGAAAAG	TAAAGCCAT	CCCGCTGAA	450	ACCTTGCACT	CTCTGGCGG	CCCTCAGAGC	TCTTTCGGA	TAATAAAAT	1950
GGAATTAAGT	CAATCCTTC	TAAGCGACAC	AGAGACCGG	TGAACACAGA	500	AATGACTTGT	ACAGCATCAT	GAGGAACCTT	GGGATTGATT	TTGAAGATAT	2000
GTTAGACCG	CTGGCAGCC	TGCTGCCCT	CCCGCAAGAT	GTTATTAAATA	550	CAGAAAGCATG	CAGAACGAGG	AGTTCTTCAG	AACTGACTCT	ACCGCTGCTG	2050
AGCTGCACAA	ACTCTCTGTT	CTTAGGCTCA	GCGTCAGCTA	CCTGAGGGCC	600	GTGAGGTTGA	CTTCAAAGAC	ATCGACATAA	CGACGAAAT	CCTGACCTAC	2100
AAGAGCTTCT	TTGATGTTG	ATTAAAGTCC	ACCCCTGCTG	ACAGAAATGG	650	GTGCAGGATT	CCCTGAACAA	TTCAACTTTG	CTGAACTCGG	CTTGCCAGCA	2150
AGGCCAGGAC	CAGTGTAGAG	CACAAATCAG	AGACTGGCAG	GATTTGCAAG	700	GCAGCCTGTG	ACTCAGCACC	TAAGCTGTAT	GCTGCAGGAG	CGCCTGCAAC	2200
AAGGAGAGTT	CTTGTTACAG	GCGCTGAATG	GCTTTGTGCT	GGTTGTCACA	750	TAGAGCAACA	GCAACAGCTT	CAGCAGCCCC	CGCCGAGGC	TCTGGAGCCC	2250
GCAGATGCCT	TGGTCTTCTA	TGCTTCTCC	ACTATCCAAG	ATTACCTGGG	800	CAGCAGCAGC	TGTGTAGAT	GGTGTGCCCC	CAGCAAGATC	TGGGTCCGAA	2300
CTTTGAGCA	TCTGATGTCA	TCCATCAGAG	CGTATATGAG	CTCATCCATA	850	GCACAGCCAA	ATCAACGGCA	CGTTTGCAAG	TTGGAACCCC	ACCCCTCCCG	2350
CAGAAGACCG	GCGGGAATTC	CAGCGCCAGC	TTCACTGGG	TCTAAACCCA	900	TGCTTTTCAA	CTGTCCCGAG	CAGGAACATA	AGCACTATCA	GCTCTTTTCC	2400
GACTCTGCAC	AAGGAGTGA	CGAAGCCCAT	GGCCCTCCAC	AGGCAGCAGT	950	AGCTTACAGG	GGACTGCTCA	GGAATTTCCC	TACAAACCG	AGGTGGACAG	2450
CTATTATACC	CCAGACCCAG	TTCTCCAGAG	GAACGCTTCT	TTCATGGAGA	1000	TGTGCTTAC	ACACAGAACT	TTGCTCCCTG	TAATCAGCCT	CTGCTTCCAG	2500
GGTGCTTCAG	GTGCGGGTGG	AGGTGCCTGC	TGGATAATTC	ATCTGGTTTT	1050	AACATTCCAA	GAGTGTGCAG	TTGGAATTCC	CTGGAAGGGA	TTTTGAACCG	2550
CTGGCAATGA	ATTTCCAAGG	GAGGTTAAAG	TATCTTCATG	GACAGAACAA	1100	TCCCTGCATC	CCACTACTTC	TAATTTAGAT	TTTGTCAAGT	GTTTACAAGT	2600
GAAAGGGAAG	GACGGAGCGC	TGCTTCTCC	ACAAGTGGCT	TTGTTTGCAA	1150	TCCTGAAAAC	CAAAGTCATG	GGATAAACTC	ACAGTCCGCC	ATGGTCAGTC	2650
TAGCTACTCC	ACTTCAGCCA	CCCTCCATCC	TGGAAATTCC	AACCAAAAAC	1200	CTCAGGCATA	CTATGCTGGG	GCCATGTCCA	TGTATCAGTG	CCAGCCAGGG	2700
TTATCTTTCA	GGACCAAAACA	CAAGCTAGAC	TTACACCTTA	TTGGTTGTGA	1250	CCACAGCGCA	CCCTGTGGA	CCAGACGCAG	TACAGCTCTG	AAATTCCAGG	2750
TGCCAAGGG	CAGCTTATTC	TGGGCTATAC	AGAAGTAGAG	CTGTGCACAA	1300	TTCTCAGGCA	TTCTTAAGCA	AGGTGCAGAG	TGGAGTGT	TTCAATGAAA	2800
GAGGATCGGG	GTACCAATTC	ATCCATGCTG	CAGACATACT	TCACTGTGCA	1350	CCTATTGCTC	CGACTTGAGC	AGCATTGGCC	ACGCTGCTCA	GACCACTGGC	2850
GAATCCACACA	TCCGATGAT	TAAGACTGGA	GAAAGTGGA	TGACAGTTTT	1400	CATCTCCATC	ACCTGGCGGA	AGCCGGGCTT	CTTCCCGATA	TCACACCCGG	2900
CGGCTTCTT	GCAAAACACA	GTGCTGGAG	GTGGGTCCAG	TCCAATGCAC	1450	TGGATTCCGT	TAGCTCCCAT	GCCAGGATGA	AATTCACTTA	GGAACAGGAT	2950
GCTTGATTTA	CAGAAATGGA	AGACCAGATT	ACATCATCGC	CACTCAGAGA	1500	ACCAGAACTG	TGAGGGTTGG	ACATCAGTAC	ACTTTCTCCA	AAACAGATTT	3000

図 1-2. AhR 遺伝子の塩基配列. 下線部のプライマーで増幅したのちにダイレクトシーケンス法によって配列決定した。

表 1. cPLA₂α欠損マウスにおける水腎症の発症率と重症度

PND	TCDD (μg/kg)	cPLA ₂ α genotype	N pup / dam	重症度					発症率 (%)
				0	1	2	3	4	
14	0	+/+	5 / 6	3	2				0
	0	-/-	5 / 6	4	1				0
	20	+/+	8 / 7			1	2	5	100
	20	-/-	8 / 7	4		2	1		35.7

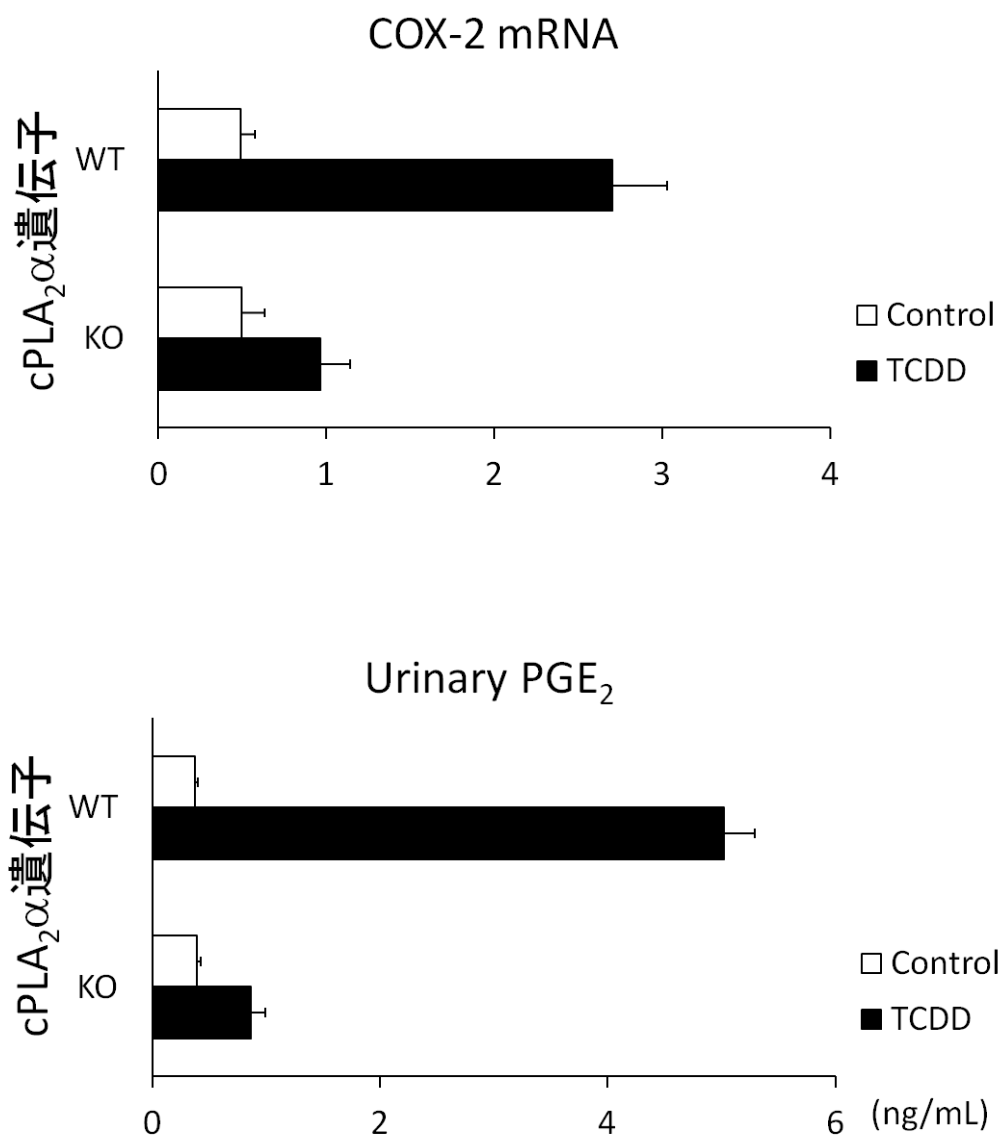


図 1-3. ダイオキシン曝露による cPLA₂α遺伝子依存的な COX-2 発現誘導.
cPLA₂α mRNA 量は $\Delta\Delta\text{CT}$ 法によって内在性コントロールである cyclophilin
B mRNA 量で補正して算出した。

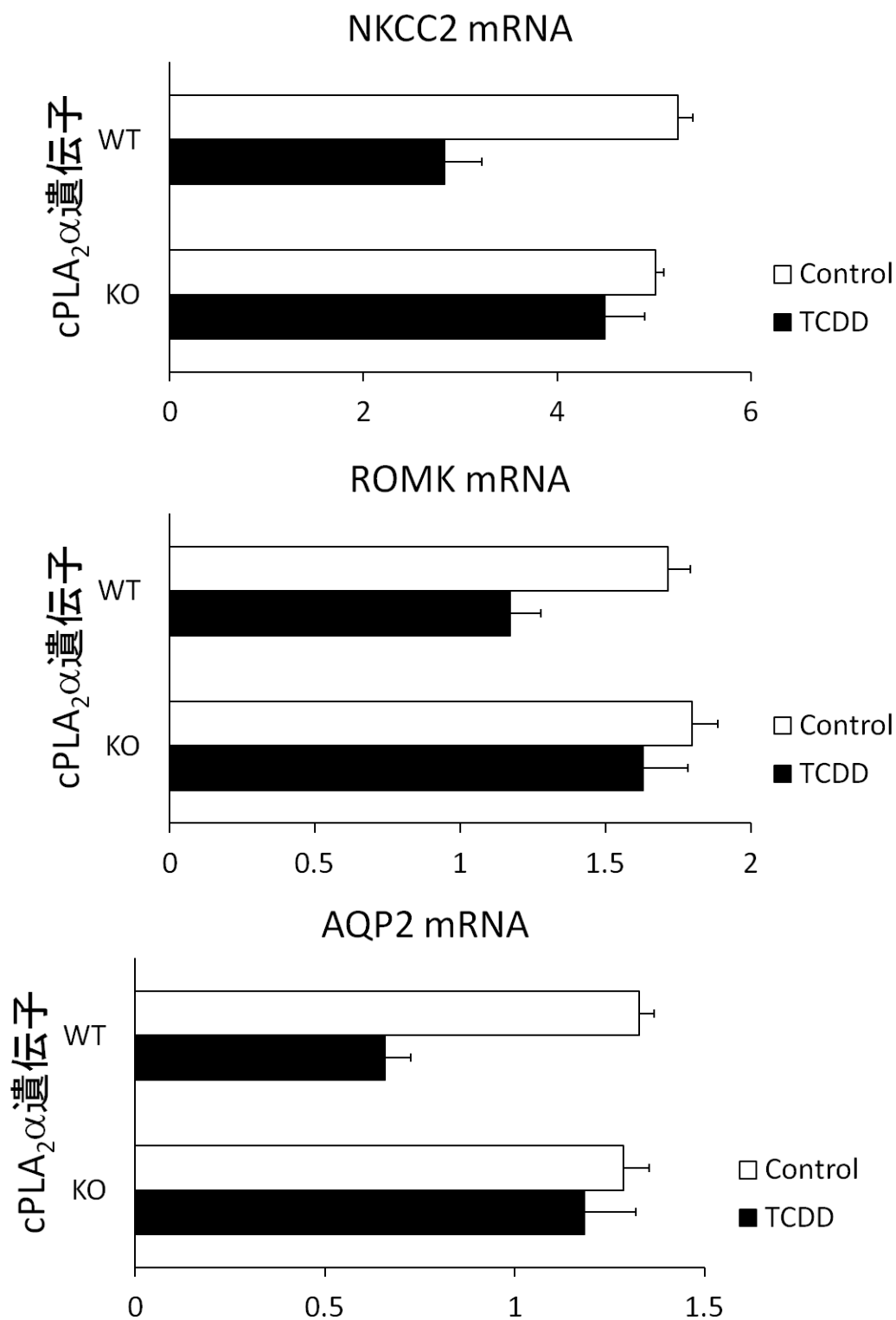


図 1-4. ダイオキシン曝露による cPLA₂α遺伝子依存的な遺伝子発現変化. 各 mRNA 量は $\Delta\Delta\text{CT}$ 法によって内在性コントロールである cyclophilin B mRNA 量で補正して算出した。

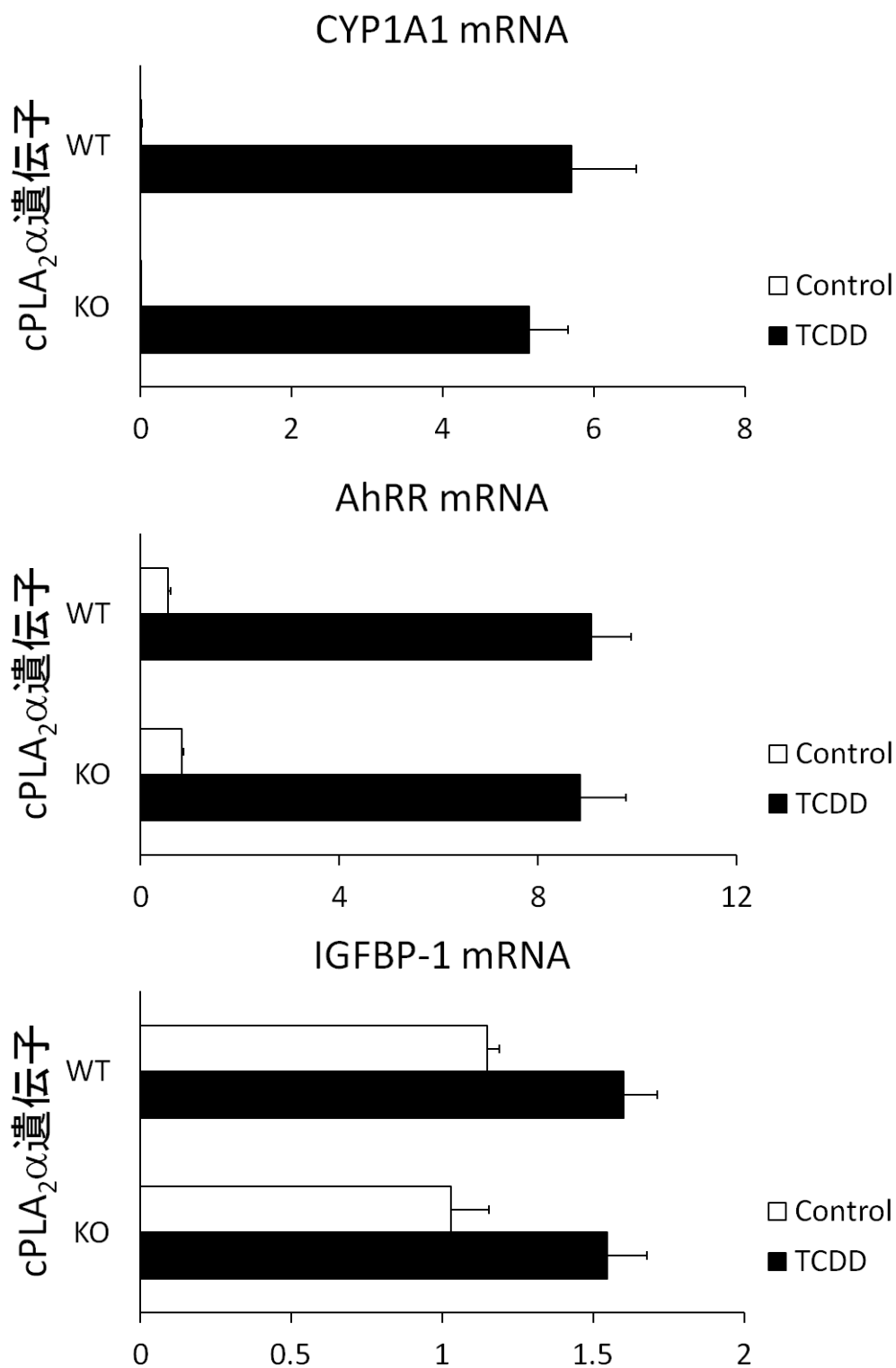


図 1-5. ダイオキシン曝露による cPLA₂α遺伝子非依存的な遺伝子発現変化. 各遺伝子の mRNA 量は $\Delta\Delta\text{CT}$ 法によって内在性コントロールである cyclophilin B mRNA 量で補正して算出した。

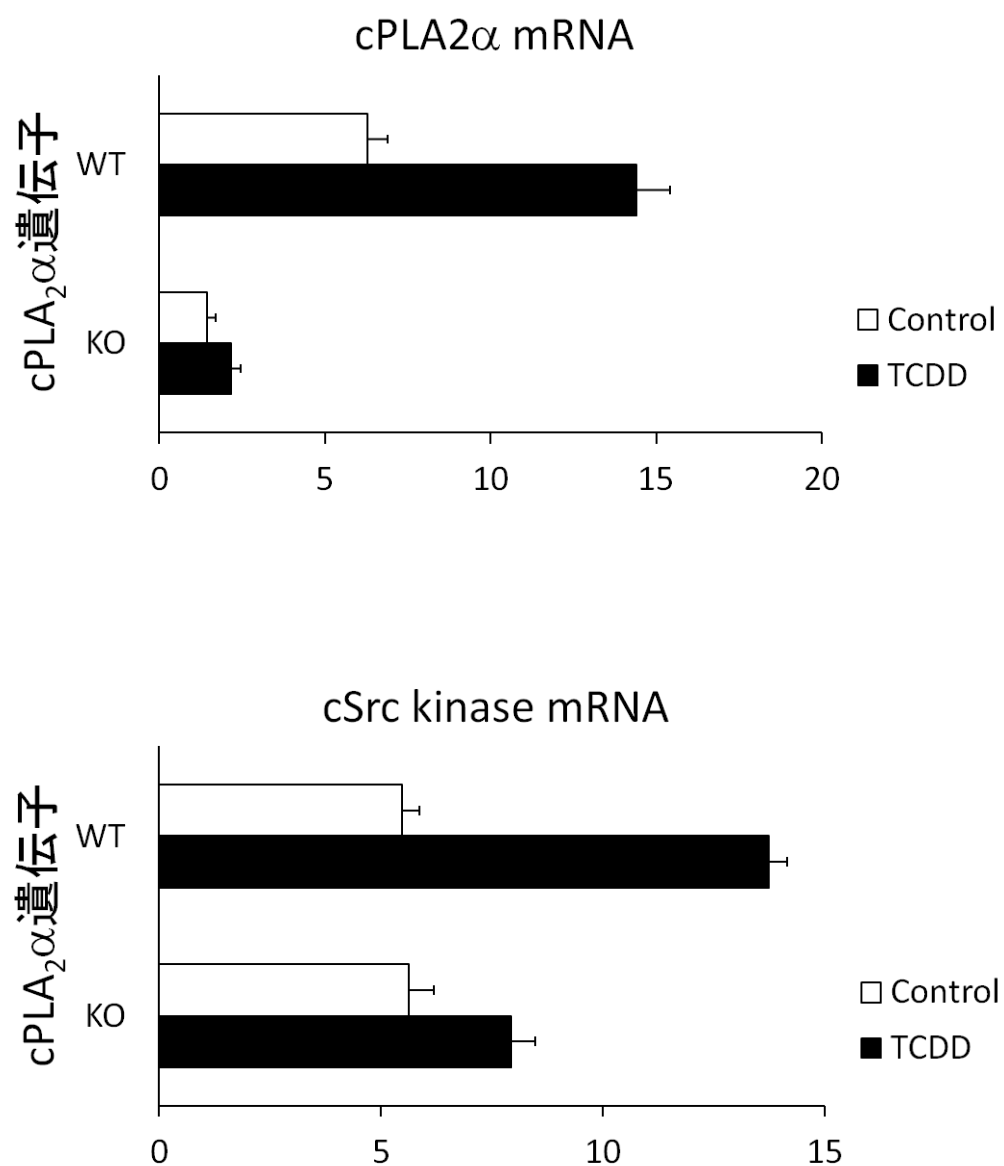


図 1-6. ダイオキシン曝露による cPLA₂αならびに cSrc kinase 遺伝子発現変化.

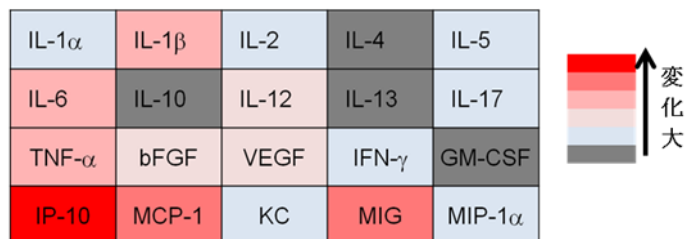


図 1-7. ダイオキシン曝露が引き起こすサイトカイン類の変化. Luminex system を用いて、腎サンプルから抽出したサイトカインを定量し、非曝露群と比した増加率の大きさを評価した。

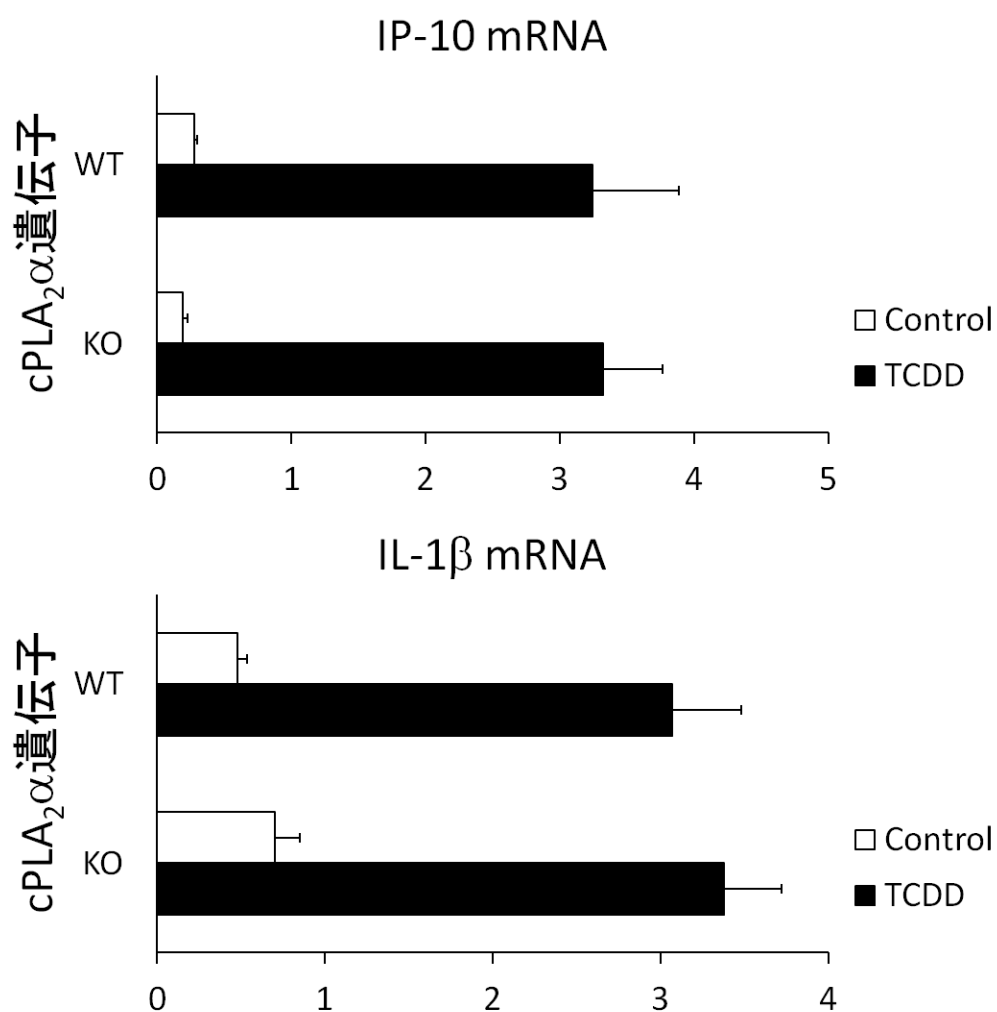


図 1-8. ダイオキシン曝露による cPLA₂α遺伝子依存的な IP-10 と IL-1βの変化. 各遺伝子の mRNA 量は $\Delta\Delta\text{CT}$ 法によって内在性コントロールである cyclophilin B mRNA 量で補正して算出した。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

これまでのダイオキシン毒性の分子基盤についての理解は、受容体 AhR によって転写活性化される遺伝子が毒性発現を引き起こすというものであった。これに対して、*in vitro* 実験系によって最近新しくみつかった AhR のノンジェノミック作用は、培養細胞を用いた実験によって明らかとなったものであり、個体レベルでのダイオキシン毒性における役割が不明であり、そもそも、ダイオキシン毒性における役割を検証する有用な実験系が存在しなかったのである。本研究により、ダイオキシン毒性における AhR のノンジェノミック作用の役割を検証するモデル実験系の開発が成功したことになる。このことによって、AhR のノンジェノミック作用に関する研究が今後大きく進展するものと考えられる。さらに、本研究は開発したマウス曝露実験系を利用して、AhR のノンジェノミック作用がダイオキシン曝露による水腎症を引き起こす原因であることを示すことに成功した。この発見は、これまでのパラダイムによらない分子基盤がダイオキシン毒性の原因となることを意味しており、ダイオキシン毒性研究の新しい局面を拓く重要なものである。また、本研究では、ケモカインや炎症性サイトカインがダイオキシン曝露によって誘導されることを発見した。特に顕著な誘導率を示した IP-10 については、これまで知られていなかった新発見である。

(2) 環境政策への貢献

ダイオキシンが発達時期に特異的に多様な毒性現象を引き起こすことから、その影響の全貌を解明し適切なリスクを評価することが困難であった。リスク評価のためには、比較的単純な用量反応関係の研究も有効ではあるが、これだけではリスク評価の基礎的知見として充分とは言えない。毒性が発現する分子メカニズムを解明することによって、初めて様々な動物種に共通で生じる毒性の分子基盤情報が明らかになる。本研究は、これまで知られていなかった分子基盤がダイオキシン毒性の原因であると示したものであり、この作用が細胞内カルシウムや炎症関連因子といった汎用性の高い生体内分子に変化を及ぼすものであることから、この AhR のノンジェノミック作用が水腎症以外の様々な毒性の解明の鍵となる発見に結びつくことが期待できる。すなわち、信頼に足るリスク評価を下すための基盤となる知見を提供したことになる。

種々の化合物がダイオキシン様毒性を持つかを検証するために、AhR の転写活性化能を指標とするレポーターアッセイシステムが利用されている。本研究は、AhR の転写活性化能に基づかないダイオキシン毒性が存在することを明らかにした。このことは、上記レポーターアッセイシステムのみでダイオキシン毒性を評価することが不適切である可能性を示唆している。ダイオキシン毒性を持つ化学物質のリスク評価に影響し得る新たな科学的知見をもたらしたものと考えられる。

6. 国際共同研究等の状況

本研究はカリフォルニア大学デービス校(University of California, Davis, Environmental Toxicology Faculty)の Matsumura Fumio(松村文夫)教授と連携して研究開発を推進した。松村教授はダイオキシン毒性学について 90 を超す原著論文を発表しているこの分野における代表的な研究者である。「ダイオキシン類が受容体 AhR の転写活性化を伴わない反応を引き起こす」ことを *in vitro* 実験系を用いて松村教授の研究グループが発見した^{43-46, 48, 51, 52)}ことがこの分野での最近の重要なトピックとなっており、非常に大きな注目を集めている。松村教授の研究グループによるこの発見が本研究開発の起点になっている。松村教授との共同研究により受容体 AhR の転写活性化を伴わないダイオキシンへの反応に関する MMDD1 細胞を用いた *in vitro* 研究の成果を 2010 年に共著で発表した⁴⁴⁾。*in vivo* 研究の成果については投稿準備中であり、ダイオキシン毒性の研究として大きな注目を集めると考えている。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) Dong B, Nishimura N, Vogel CF, Tohyama C, Matsumura F. TCDD-induced cyclooxygenase-2 expression is mediated by the nongenomic pathway in mouse MMDD1 macula densa cells and kidneys. *Biochem Pharmacol.* **79**(3):487-97, 2010
- 2) Yoshioka W, Peterson RE, Tohyama C. Molecular targets that link dioxin exposure to toxicity phenotypes. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **127**:96-101, 2011

<その他誌上発表(査読なし)>

- 1) Yoshioka W, Aida-Yasuoka K, Kawaguchi T, Fujisawa N, Ohsako S, Hara S, Tohyama C. Involvement of PGE₂ and urine volume increased in the onset of dioxin-induced hydronephrosis in mice. *The Toxicologist, Suppl. Toxicol. Sci.* **126**:408-408, 2012

(2) 口頭発表(学会等)

- 1) 遠山千春. 環境毒性学から疾患研究への展開…水腎症発症の分子毒性メカニズムの解明. 学会長招聘講演, 第 39 回日本毒性学会学術年会, 仙台. 5 月 10 日, 2010
- 2) Tohyama C. Cyclooxygenase-2 as a molecular target of dioxin-induced hydronephrosis in mice. Symposium of Korean Society of Toxicology, Seoul National University, 13-14 May, 2010
- 3) 遠山千春, Perspectives on Emerging Important Research Fields in Toxicology. 中国毒理学会/ 学术讨论会, 大连医科大学. 31 July, 2010
- 4) Yoshioka W, Aida-Yasuoka K, Kawaguchi T, Fujisawa N, Ohsako S, Hara S, Tohyama C.

Involvement of PGE₂ and urine volume increase in the onset of dioxin-induced hydronephrosis in mice. SOT2102, The Annual Meeting of the Society of Toxicology, San Francisco, USA. 2012

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

日本衛生学会賞受賞(「環境化学物質の健康影響とその毒性発現メカニズムの解明に関する研究」遠山千春, 2010 年): 本研究を含む環境化学物質の健康影響とその毒性発現メカニズムの解明に関する研究が評価されて日本衛生学会の学会賞を受賞した。

8. 引用文献

- 1) Jan MR, Shah J, Khawaja MA, and Gul K. DDT residue in soil and water in and around abandoned DDT manufacturing factory. *Environ Monit Assess.* **155**(1-4):31-8, 2009
- 2) Ayotte P, Dewailly E, Ryan JJ, Bruneau S, and Lebel G. PCBs and dioxin-like compounds in plasma of adult Inuit living in Nunavik (Arctic Quebec). *Chemosphere.* **34**(5-7):1459-68, 1997
- 3) Hansen JC. The human health programme under AMAP. AMAP Human Health Group. Arctic Monitoring and Assessment Program. *Int J Circumpolar Health.* **57**(4):280-91, 1998
- 4) Fangstrom B, Athanasiadou M, Grandjean P, Weihe P, and Bergman A. Hydroxylated PCB metabolites and PCBs in serum from pregnant Faroese women. *Environ Health Perspect.* **110**(9):895-9, 2002
- 5) Aguilar A, Borrell A, and Reijnders PJ. Geographical and temporal variation in levels of organochlorine contaminants in marine mammals. *Mar Environ Res.* **53**(5):425-52, 2002
- 6) Norstrom RJ and Muir DC. Chlorinated hydrocarbon contaminants in arctic marine mammals. *Sci Total Environ.* **154**(2-3):107-28, 1994
- 7) Mineau P. A review and analysis of study endpoints relevant to the assessment of "long term" pesticide toxicity in avian and mammalian wildlife. *Ecotoxicology.* **14**(8):775-99, 2005
- 8) Brouwer A, Ahlborg UG, van Leeuwen FX, and Feeley MM. Report of the WHO working group on the assessment of health risks for human infants from exposure to PCDDs, PCDFs and PCBs. *Chemosphere.* **37**(9-12):1627-43, 1998
- 9) Van den Berg M, et al. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ Health Perspect.* **106**(12):775-92, 1998
- 10) Van den Berg M, et al. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol Sci.* **93**(2):223-41, 2006
- 11) Eduljee GH and Gair AJ. Validation of a methodology for modelling PCDD and PCDF intake via the foodchain. *Sci Total Environ.* **187**(3):211-29, 1996
- 12) Tam I. [Diet as a source of human exposure to polychlorinated dibenzo-P-dioxins (PCDD)]. *Rocz Panstw Zakl Hig.* **50**(3):241-51, 1999
- 13) Geyer H, Scheunert I, and Korte F. Bioconcentration potential of organic environmental chemicals in humans. *Regul Toxicol Pharmacol.* **6**(4):313-47, 1986
- 14) Birnbaum LS. The role of structure in the disposition of halogenated aromatic xenobiotics. *Environ Health Perspect.* **61**:11-20, 1985
- 15) WHO consultation. Assessment of the health risk of dioxin: re-evaluation of the tolerable daily intake(TDI).25-29, 1998
- 16) Kuratsune M, et al. Yusho. 1996

- 17) Yoshimura T. Yusho in Japan. *Ind Health*. **41**(3):139-48, 2003
- 18) Homberger E, Reggiani G, Sambeth J, and Wipf HK. The Seveso accident: its nature, extent and consequences. *Ann Occup Hyg*. **22**(4):327-67, 1979
- 19) Mocarelli P, Brambilla P, Gerthoux PM, Patterson DG, Jr., and Needham LL. Change in sex ratio with exposure to dioxin. *Lancet*. **348**(9024):409, 1996
- 20) Henriksen GL, Ketchum NS, Michalek JE, and Swaby JA. Serum dioxin and diabetes mellitus in veterans of Operation Ranch Hand. *Epidemiology*. **8**(3):252-8, 1997
- 21) Seefeld MD, Corbett SW, Keesey RE, and Peterson RE. Characterization of the wasting syndrome in rats treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol Appl Pharmacol*. **73**(2):311-22, 1984
- 22) Pohjanvirta R and Tuomisto J. Short-term toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in laboratory animals: effects, mechanisms, and animal models. *Pharmacol Rev*. **46**(4):483-549, 1994
- 23) Greig JB, Jones G, Butler WH, and Barnes JM. Toxic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Food Cosmet Toxicol*. **11**(4):585-95, 1973
- 24) Jones G and Butler WH. A morphological study of the liver lesion induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rats. *J Pathol*. **112**(2):93-7, 1974
- 25) Vos JG, Moore JA, and Zinkl JG. Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the immune system of laboratory animals. *Environ Health Perspect*. **5**:149-62, 1973
- 26) Pitot HC, Goldsworthy T, Campbell HA, and Poland A. Quantitative evaluation of the promotion by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin of hepatocarcinogenesis from diethylnitrosamine. *Cancer Res*. **40**(10):3616-20, 1980
- 27) Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM, Rudikoff S, Ward JM, and Gonzalez FJ. Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. **140**(1):173-9, 1996
- 28) Peters JM, Narotsky MG, Elizondo G, Fernandez-Salguero PM, Gonzalez FJ, and Abbott BD. Amelioration of TCDD-induced teratogenesis in aryl hydrocarbon receptor (AhR)-null mice. *Toxicol Sci*. **47**(1):86-92, 1999
- 29) Nishimura N, Matsumura F, Vogel CF, Nishimura H, Yonemoto J, Yoshioka W, and Tohyama C. Critical role of cyclooxygenase-2 activation in pathogenesis of hydronephrosis caused by lactational exposure of mice to dioxin. *Toxicol Appl Pharmacol*. **231**(3):374-83, 2008
- 30) Allen JR, Barsotti DA, Van Miller JP, Abrahamson LJ, and Lalich JJ. Morphological changes in monkeys consuming a diet containing low levels of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Food Cosmet Toxicol*. **15**(5):401-10, 1977
- 31) McNulty WP. Toxicity and fetotoxicity of TCDD, TCDF and PCB isomers in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Environ Health Perspect*. **60**:77-88, 1985

- 32) Murray FJ, Smith FA, Nitschke KD, Humiston CG, Kociba RJ, and Schwetz BA. Three-generation reproduction study of rats given 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in the diet. *Toxicol Appl Pharmacol.* **50**(2):241-52, 1979
- 33) Couture LA, Abbott BD, and Birnbaum LS. A critical review of the developmental toxicity and teratogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: recent advances toward understanding the mechanism. *Teratology.* **42**(6):619-27, 1990
- 34) Mably TA, Moore RW, Goy RW, and Peterson RE. In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 2. Effects on sexual behavior and the regulation of luteinizing hormone secretion in adulthood. *Toxicol Appl Pharmacol.* **114**(1):108-17, 1992
- 35) Seo BW, Li MH, Hansen LG, Moore RW, Peterson RE, and Schantz SL. Effects of gestational and lactational exposure to coplanar polychlorinated biphenyl (PCB) congeners or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on thyroid hormone concentrations in weanling rats. *Toxicol Lett.* **78**(3):253-62, 1995
- 36) Boutros PC, Bielefeld KA, Pohjanvirta R, and Harper PA. Dioxin-dependent and dioxin-independent gene batteries: comparison of liver and kidney in AHR-null mice. *Toxicol Sci.* **112**(1):245-56, 2009
- 37) Tijet N, Boutros PC, Moffat ID, Okey AB, Tuomisto J, and Pohjanvirta R. Aryl hydrocarbon receptor regulates distinct dioxin-dependent and dioxin-independent gene batteries. *Mol Pharmacol.* **69**(1):140-53, 2006
- 38) Gonzalez FJ and Fernandez-Salguero P. The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice. *Drug Metab Dispos.* **26**(12):1194-8, 1998
- 39) Mimura J, et al. Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells.* **2**(10):645-54, 1997
- 40) Schmidt JV, Su GH, Reddy JK, Simon MC, and Bradfield CA. Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**(13):6731-6, 1996
- 41) Kopf PG, Scott JA, Agbor LN, Boberg JR, Elased KM, Huwe JK, and Walker MK. Cytochrome P4501A1 is required for vascular dysfunction and hypertension induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol Sci.* **117**(2):537-46, 2010
- 42) Yoshioka W, Peterson RE, and Tohyama C. Molecular targets that link dioxin exposure to toxicity phenotypes. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **127**(1-2):96-101, 2011
- 43) Matsumura F. The significance of the nongenomic pathway in mediating inflammatory signaling of the dioxin-activated Ah receptor to cause toxic effects. *Biochem Pharmacol.* **77**(4):608-26, 2009
- 44) Dong B, Nishimura N, Vogel CF, Tohyama C, and Matsumura F. TCDD-induced cyclooxygenase-2 expression is mediated by the nongenomic pathway in mouse MMDD1 macula

- densa cells and kidneys. *Biochem Pharmacol.* **79**(3):487-97, 2010
- 45) Dong B and Matsumura F. Roles of cytosolic phospholipase A2 and Src kinase in the early action of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin through a nongenomic pathway in MCF10A cells. *Mol Pharmacol.* **74**(1):255-63, 2008
 - 46) Li W, Vogel CF, Wu D, and Matsumura F. Non-genomic action of TCDD to induce inflammatory responses in HepG2 human hepatoma cells and in liver of C57BL/6J mice. *Biol Chem.* **391**(10):1205-19, 2010
 - 47) Kinehara M, Fukuda I, Yoshida K, and Ashida H. Aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the cytosolic phospholipase A(2)alpha gene by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in mouse hepatoma Hepa-1c1c7 cells. *J Biosci Bioeng.* **108**(4):277-81, 2009
 - 48) Sciallo EM, Vogel CF, Li W, and Matsumura F. Initial and extended inflammatory messages of the nongenomic signaling pathway of the TCDD-activated Ah receptor in U937 macrophages. *Arch Biochem Biophys.* **480**(2):143-55, 2008
 - 49) Bryant PL, Schmid JE, Fenton SE, Buckalew AR, and Abbott BD. Teratogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the expression of EGF and/or TGF-alpha. *Toxicol Sci.* **62**(1):103-14, 2001
 - 50) Uozumi N, et al. Role of cytosolic phospholipase A2 in allergic response and parturition. *Nature.* **390**(6660):618-22, 1997
 - 51) Sciallo EM, Dong B, Vogel CF, and Matsumura F. Characterization of the pattern of the nongenomic signaling pathway through which TCDD-induces early inflammatory responses in U937 human macrophages. *Chemosphere.* **74**(11):1531-7, 2009
 - 52) Li W and Matsumura F. Significance of the nongenomic, inflammatory pathway in mediating the toxic action of TCDD to induce rapid and long-term cellular responses in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemistry.* **47**(52):13997-4008, 2008

(2) ダイオキシン曝露マウス尿管の形態と機能の解析

東京大学・大学院医学系研究科
(独)国立環境研究所・環境リスク研究センター

遠山千春
西村典子（平成 21 年度のみ）

<研究協力者>

東京大学・大学院医学系研究科

吉岡 亘

平成 21～23 年度までの累計予算額： 6,058 千円

（うち平成 23 年度： 2,414 千円）

予算額は間接経費を含む

〔要旨〕ダイオキシンが発達の時期特異的に幅広い毒性現象を引き起こすことから、その影響の全貌を解明し適切なリスクを評価することが困難であった。ダイオキシン毒性発現の分子メカニズムのこれまでのパラダイムは、「まずダイオキシンが転写因子 AhR と結合し、そして、ダイオキシン・AhR 複合体が結合する標的遺伝子に異常な転写活性化が生じ、その結果として毒性が発現する」というものであった。細胞を用いた研究によって最近新しく発見された「ダイオキシン類が受容体 AhR の転写活性化を伴わない反応を引き起こす」というこれまでのパラダイムでは説明されない反応が、ダイオキシン類の多様な毒性発現を説明する反応である可能性があることから、この反応経路を構成する生体分子である COX-2 依存性の毒性現象である水腎症に着目した。C57BL/6 系統の新生仔にダイオキシンを経母乳曝露し、腎臓および尿管の形態の変化を定量的に解析する研究手法を開発した。解析の結果、曝露後 2 日というごく早期に引き起こされる腎臓と尿管の形態変化を発見した。この発見は、ダイオキシンが発達時期特異的に毒性現象を引き起こすメカニズムの解明につながるものであり、より適切なリスク評価を行うための基本情報が提供できるものと期待できる。

〔キーワード〕ダイオキシン、水腎症、毒性発現メカニズム、cPLA₂、リスク評価

1. はじめに

化学物質の中には、難分解性で環境中に残留するものが存在する。その多くは、過去に農薬や工業用材料として用いられたものである。これらの使用歴のある国では、現在でも汚染が問題となっている¹⁾。また、製造や使用歴のない地域の住民からも、難分解性有機化学物質であるポリ

塩化ビフェニル (PCB) が検出された^{2,4)}。さらに海洋生物からも、海域間での濃度差こそあれ、難分解性有機化学物質が検出されている⁵⁾。これらの報告から、難分解性有機化学物質の地球規模での広がりや汚染が危惧されている。

難分解性有機化学物質は、生態系での食物連鎖を経て生物体内に濃縮されることから、高等動物ほど高濃度で蓄積するという性質をもつ。実際に北極圏の高等動物から高濃度の PCB やジクロロジフェニルトリクロロエタン (DDT) が検出され⁶⁾、これが原因と考えられる生殖器異常や奇形の発生が報告されている⁷⁾。このような、残留性が高く生物に有害な影響を及ぼすおそれのある有機物は残留性有機汚染物質 (POPs) と定義され、2001 年には、削減や廃絶にむけた「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約」が採択された。

POPs の 1 つであるダイオキシン類は、塩素の置換された位置と数の違いにより区別される 210 種類の塩素化芳香族炭化水素の総称である。内訳は、ポリ塩素化ジベンゾパラダイオキシン (PCDDs ; polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins) 同族体・異性体の計 75 種と、ポリ塩素化ジベンゾフラン (PCDF ; polychlorinated dibenzo-*p*-furans) 同族体・異性体の計 135 種である。さらに、ポリ塩素化ビフェニル (PCBs ; polychlorinated biphenyl) の同族体・異性体の計 209 種のうち平面構造を有する (コプラナーPCBs) 12 種も、ダイオキシン類と同様の毒性を示す化合物として知られる。ダイオキシン類は毒性の強さがそれぞれ異なり、最も毒性の強い化合物は 2,3,7,8-四塩素化ジベンゾ-*p*-ダイオキシン (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin ; TCDD) である。TCDD は常温では無色の固体であり、水には難溶である。800℃以上で完全に分解されるが、通常的环境下では難分解性で環境残留性が高い。ダイオキシン類とコプラナーPCB の中で 29 種類の化合物は、実際に TCDD と同様の生体毒性を持つことが明らかにされており、リスク管理の対象物質として分類されている⁸⁻¹⁰⁾。様々な毒性強度を持つダイオキシン類の中で、個別の強度を評価する手段として毒性等量が用いられる。毒性等量は、最も毒性の強い TCDD を 1 として相対的な毒性を示した毒性等価係数に、実測濃度を掛けた数値の合計である。

ダイオキシン類は、主に廃棄物処理場の燃焼過程において非意図的産物として環境中に放出される環境汚染物質であり、脂溶性であることから、体内から排出されにくく生体内に濃縮されやすい。ヒトや野生生物は、主に食物連鎖を介してダイオキシン類を生体内に取り込み、その大部分は脂肪組織や肝臓に蓄積する^{11, 12)}。ヒトでは特に脂肪組織への分布が高い傾向にある¹³⁾。TCDD の体内からの消失半減期は生物種によって大きく異なり、本研究で使ったマウス C57BL/6 系統は 11 日と比較的短い¹⁴⁾、WHO によるとヒトは 7.5 年と設定されており、非常に長い¹⁵⁾。

ダイオキシン類によるヒトへの健康被害が報告されている。1968 年に、西日本を中心に発生したカネミ油症では、原因となった米ぬか油および患者の血液や脂肪組織から PCB や PCDF が検出された。油症では、クロルアクネ (塩素挫創) などの皮膚症状、視力低下、痺れなどの神経症状が観察された^{16, 17)}。同様の曝露事故は台湾でも発生した¹⁶⁾。1976 年イタリアのセブソで起きた化学工場の爆発事故では、ダイオキシン類に曝露された工場周辺の地域住民が、曝露濃度按比例して塩素挫創を発症した¹⁸⁾。またこの地域での出産調査では、出産児の性比が女子側に偏

っていた¹⁹⁾。さらに他の例として、ベトナム戦争でオレンジ剤の撒布に従事し、ダイオキシン類に曝露された米国退役軍人を対象とした調査では、糖尿病などの糖代謝障害と TCDD 曝露との関連性が示唆された²⁰⁾。国際ガン研究機関 (IARC) では、ダイオキシン類のうち TCDD をグループ 1 (ヒトに対して発ガン性がある) として分類されている。

実験動物を用いた研究では、TCDD の成熟個体への高用量・単回投与により、消耗性症候群と称される急激な体重減少^{21, 22)}、肝臓肥大^{23, 24)}、胸腺萎縮²⁵⁾が引き起こされることが明らかになっている。また発ガンプロモーション作用を有すること²⁶⁾が報告されている。このような TCDD の様々な毒性発現は、転写因子である aryl hydrocarbon receptor (AhR) を介して行われることが、AhR 欠損マウスを用いた研究により証明されている²⁷⁻²⁹⁾。しかし、AhR より下流の詳細なメカニズムについてはほとんど明らかにされていない。

上記の毒性現象に加えて、幼若動物においては、成熟個体で毒性のない用量でも次世代 (胎仔や新生仔) に悪影響が及ぶことが報告されている。TCDD の長期曝露による流産、妊娠率の低下が示唆され^{30, 31)}、3 世代目の出生仔においても低体重および性周期の異常が明らかになった³²⁾。また、胎仔や新生仔への母体経由の曝露では、奇形の発生、生殖機能の異常、甲状腺機能異常などが報告されている³³⁻³⁵⁾。このように、曝露が引き起こす毒性影響について感受性の高い時期が存在するということがダイオキシン毒性の特徴であり、毒性影響の全貌を解明することを難しいものにしている。この困難を乗り越えてダイオキシン類の毒性影響を評価するために、想定される毒性現象に関して発生・発達の様々な時期のうち、もっとも低用量で生じる毒性のエンドポイントに焦点を当てて検証されてきた。こうした方法は、これまで多くの研究者により採用されている毒性試験の主要な方法である。他方、これら毒性に共通する根本的なメカニズム解明を行うことによって、ダイオキシン毒性の多様性の解明を行うことも重要である。すなわち、ダイオキシン類の毒性発現メカニズムを解明することによって毒性発現の範囲と程度を推定することが可能となり、より適切なリスク評価を行うための基本情報が提供できる。

ダイオキシン類の毒性発現メカニズムとしてこれまで想定されてきたパラダイムは、「まずダイオキシンが転写因子 AhR と結合し、そして、ダイオキシン・AhR 複合体が結合する標的遺伝子に異常な転写活性化が生じ、その結果として毒性が発現する」というものであった。ダイオキシン曝露が AhR 依存的に多くの遺伝子の発現量を増やすこと^{36, 37)}、ダイオキシン類が引き起こすほぼすべての毒性現象の発現に AhR が必須であること³⁸⁻⁴⁰⁾がこのパラダイムの根拠とされている。このパラダイムに則って網羅的な遺伝子発現解析が数多くなされてきた。しかしながら、AhR による転写活性化の標的遺伝子が毒性発現の原因となることが明らかになっている例は、ダイオキシン曝露による血圧上昇⁴¹⁾を例外として、他の主要な毒性現象については長年の研究にも関わらずみつかっていない⁴²⁾。このように、これまでのパラダイムだけでは、ダイオキシン類が多様な毒性現象を引き起こすメカニズムを説明できない状況であった。

本研究では、以下に述べる AhR のノンジェノミックな作用についての新たなアイデアを取り入れることによってこれまで解明されて来なかったダイオキシン毒性の発現メカニズムが明らかになるのではないかと考えた。この AhR のノンジェノミックな作用は、細胞を用いた最近

の研究で明らかになった。すなわち、「ダイオキシン類によって受容体 AhR が核内で引き起こす転写活性化とは別に、AhR は細胞質内のシグナル伝達経路を活性化する」という細胞質内で起こる現象⁴³⁾である。AhR のノンジェノミック作用と呼ぶことが提唱されたこの新しく発見された AhR の作用は、カルシウムシグナルを介して生理活性物質群プロスタノイドの合成酵素や細胞内シグナル伝達を担う分子を活性化する^{44, 45)}ものであり、その下流で幅広い影響を引き起こすと考えられた。したがって、ダイオキシン類が引き起こす多様な毒性現象の原因となる可能性があると考えられた。多様なダイオキシン毒性の中で本研究においてはダイオキシン曝露が引き起こす奇形である水腎症に焦点を当てた。その理由は、(1) ダイオキシン曝露が授乳期マウスに引き起こす水腎症はシクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) の誘導が原因であること²⁹⁾、(2) AhR のノンジェノミック作用が下流で COX-2 を誘導することで^{44, 45)}ある(図 2-1)。このような背景から、新たに発見されたダイオキシン毒性の分子基盤と考えられる AhR のノンジェノミック作用について、その下流で如何にして毒性現象が発現するか明らかにすることを本サブテーマの課題とした。

水腎症はダイオキシン曝露によるだけでなく、ヒトにおいて先天性のものと後天性に発症することが知られている。後天的に発症する水腎症の原因は腎尿管結石や腎盂癌などによるものが多い。先天性水腎症の主な原因は腎盂尿管の移行部の通過障害(ureteropelvic junction obstruction : UPJO)で、59.4%にも上る⁴⁶⁾。腎盂尿管の移行部の通過障害は、ねじれや異常血管の圧迫による閉塞や筋層の形態異常により引き起こされる。筋層の形態異常は、尿が腎臓から膀胱へ輸送される際に不可欠な蠕動運動を阻害すると考えられている。哺乳類の胎仔は、体内の老廃物除去の多くを母体依存しているが、出生を契機に自身で処理するようになり、出生後には出生前のおよそ 50 倍もの尿生成を成し遂げる⁴⁷⁾。このことは、多量の尿の生成に伴い腎臓の内圧上昇を防ぐため、腎臓から効率よく尿を排出しなければならないことを意味する。そのためには、尿の輸送に必要な蠕動運動の起点となる腎盂の発達が重要である⁴⁸⁾。また、尿の濃縮能は出生時点では未成熟であり、濃縮をつかさどる腎髄質の発達にはラットでは 2 ないし 3 週間を要する⁴⁹⁾。出生後の腎盂と尿管の発達には、renin-angiotensin 系が重要な役割を果たすことが知られている⁵⁰⁾。なかでも、angiotensin type 1 receptor (Agt1) の KO マウスは、腎盂の萎縮と尿管の平滑筋層の形成不全、蠕動運動の障害によって水腎症を発症すると報告されている⁴⁸⁾。また、胎仔期の尿管の発達には sonic hedgehog (shh) とその受容体である patched 1 のシグナルが必要不可欠であり、出生後の腎臓と尿管における役割に対する知見はないものの出生後 1 日でも共に発現が認められる⁵¹⁾ことから、出生後における発達においても重要な役割を果たしている可能性がある。

我々のこれまでの研究から、ダイオキシン曝露が引き起こす授乳期水腎症は尿管閉塞を伴わないことが明らかになっていた²⁹⁾。加えて、尿管横断面切片の組織学的解析から、尿管層構造の曝露による変化の可能性が示唆されていた。これらのことから、ダイオキシン曝露による水腎症は尿管の物理的閉塞によるものでなく、泌尿器系の機能をダイオキシンが攪乱することで起こると考えられた。ダイオキシンが攪乱する泌尿器系の機能として、上述の背景に基づいて尿管の層構造の変化による蠕動運動の阻害を想定して研究を開始した。

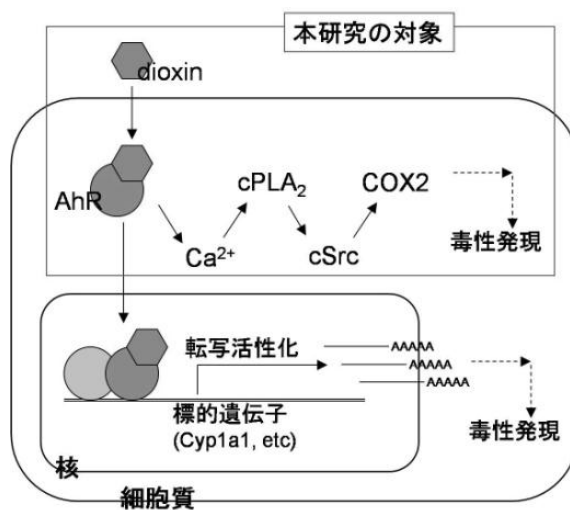


図 2-1. 受容体 AhR の転写活性化を伴わないノン
ジェノミック作用とダイオキシン毒性

2. 研究開発目的

本サブテーマでは、ダイオキシン曝露が引き起こす毒性現象に関して、これまで想定されてきたパラダイムに基づかない新しい分子基盤である AhR のノンジェノミック作用が如何にしてダイオキシン毒性を引き起こすかを明らかにしようとした。これまで想定されてきたパラダイムとは「ダイオキシンが転写因子 AhR と結合し、ダイオキシン・AhR 複合体が結合する標的遺伝子に異常な転写活性化が生じ、その結果として毒性が発現する」というものである。このパラダイムの中で AhR が発揮する作用は、核内のゲノム(genome)中に存在する標的遺伝子の転写を引き起こす作用であることから、AhR のジェノミック(genomic)作用と呼ぶべきものである。一方、新しい分子基盤とは「ダイオキシンによって活性化した AhR が細胞質内でカルシウムシグナルを介して cPLA₂ とその下流で cSrc や COX-2 を活性化する」というものである。この新しいパラダイムの分子基盤である AhR のノンジェノミック作用は様々な培養細胞を用いてダイオキシンによって活性化することが最近明らかにされてきたが、動物個体におけるダイオキシンによる毒性現象に関与するかということについては不明であった。そこで、本研究は、AhR のノンジェノミック経路で誘導される COX-2 が毒性発現の原因となる水腎症について、どのようなメカニズムで発症するか解明することを目的とした。

3. 研究開発方法

本研究では、AhR のノンジェノミック作用が如何にしてダイオキシン毒性を引き起こすか解明することを目標に、マウスを用いた曝露実験を行うこととした。マウス系統は、ダイオキシンに対して高感受性である C57BL/6J を、ダイオキシンとしては毒性が最も強い 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)を用いた。ダイオキシン曝露がマウス新生仔に水腎症を引き起こす直接の原因としては、水腎症発症原因と指定一般的な尿管の物理的閉塞ではなく、泌尿器系の何らかの機能以上であることが明らかになっていた。水腎症を引き起こし得る泌尿器系の異常としては、尿管の層構造の消失による蠕動運動障害が有力だと考えられた。そこで、尿管横断面切片の組織学的解析と尿管蠕動運動の解析によって、それぞれ構造と機能の側面からダイオキシンによる影響を評価することとした。また、尿排出能を担う重要な構造体である腎ペルビスの発達度合いを検証した。加えて、ダイオキシンが腎臓の生理機能を攪乱する可能性についても検証した。腎機能としては、本研究の過程で尿産生量が増加しているという観察を解剖学的に得たことから、尿産生量の指標として膀胱中尿重量を、尿濃縮能の指標として尿浸透圧を測定した。曝露実験手順は次のとおりである。出産後 1 日目の母マウスに 0, 10, 20, 80 µg/kg の何れかの用量の TCDD を経口投与することで産仔に対して経母乳曝露した。出生後日齢(PND) 3, 5, 7, 9, 11, 14 において各種解析を行った。

4. 結果及び考察

(1) ダイオキシン曝露が泌尿器の形態と尿管蠕動運動に与える影響の研究

TCDD 曝露個体の腎臓で、腎髄質の先端部に位置する腎乳頭の発達不全が観察された。個体間の発達程度を補正し、腎乳頭の長さを評価する為に、腎臓の短軸長と腎乳頭の長さを図 2-2 のように測定し、短軸長に占める腎乳頭の長さを指標とした。PND 3 で、腎乳頭の長さには両群間で差は認められなかったが、PND 5, 7 では対照群と比較して TCDD 曝露群の方が短い傾向にあった (PND3: 対照群 $824 \pm 151 \mu\text{m}$ 、TCDD 曝露群 $710 \pm 65 \mu\text{m}$ 、PND5: 対照群 $1110 \pm 201 \mu\text{m}$ 、TCDD 曝露群 $842 \pm 117 \mu\text{m}$ 、PND7: 対照群 $1474 \pm 110 \mu\text{m}$ 、TCDD 曝露群 $1168 \pm 91 \mu\text{m}$ 、Mean $\pm$ S.E.)。腎臓の短軸長に対する腎乳頭の長さの比率は、PND 5 では TCDD 曝露群の方が小さい傾向にあり、PND 7 では TCDD 曝露群の方が有意に小さかった(図 2-3)。

尿管の層構造に関しては、TCDD 曝露個体で三層構造が保たれており(図 2-4)、大きな形態変化は認められなかった。各層に焦点をあてると、TCDD 曝露群では PND 3 で間質層の尿管に占める割合が有意に小さかった(図 2-5、A:PND3、B:PND5、C:PND7)。上皮層の占める割合は、PND5 と PND 7 で、TCDD 曝露群の方が対照群と比較して有意に高かった。

蠕動運動の頻度を測定するため、腎臓-尿管-膀胱を採取し、速やかに培地に入れた後、腎盂が 5 回収縮する時間を指標として蠕動運動の頻度を測定した。表 2-1 に示すように PND 3, 5, 7 の各時点において両群間に差は認められなかった。

以上の結果から、ダイオキシン曝露は、尿排出に重要な腎と尿管の構造に変化を引き起こすことは明らかになったが、当初想定した尿管層構造の消失のような蠕動運動阻害に直ちに結びつくような変化は見出すことができなかった。このことに対応して、蠕動運動にも水腎症発症に至るような変化が観察されなかった。

(2) ダイオキシン曝露が尿生成メカニズムに与える影響の研究

当初想定したような尿排出メカニズムの TCDD 曝露による阻害が見出せなかったこと、ならびに、研究の過程で尿量が増加しているという観察をしたことから、TCDD 曝露による尿量増加が水腎症の原因となる可能性について検証した。TCDD 曝露による尿産生量変化の有無を調べるためには、産仔の尿量を測定する必要がある。尿量変化の有無を検証する方法としては、24 時間尿の容積測定が標準的な方法となっている。この方法では、代謝ケージにマウスを単独で飼育することで 24 時間で排尿した量を測定する。しかしこの方法は、授乳期のマウスには適用できない。マウス新生仔における尿量を解析した報告がないのはおそらくこのことに起因していると考えられる。本研究では当初、マウス新生仔の尿量を測るために、(1) 仔マウスのみを代謝ケージに入れる、(2) 仔マウス母マウス両方を代謝ケージに入れる、という二つの方法を試みたが、いずれも早い段階で仔マウスが死亡し、尿量測定を行うことが実現できなかった。そこで、代謝

ケージを用いた 24 時間尿ではない、別の尿量の指標を用いることとした。そのような指標として本研究では、膀胱中の尿重量値を採用した。

PND1 にて C57BL/6 系統の母マウスに 0、20、80 $\mu\text{g/kg b.w.}$ の TCDD を投与することで仔マウスに経母乳曝露した。PND14 の午後 3 時に仔マウスを解剖し、膀胱内の尿重量を測定したところ、TCDD 曝露群の尿重量は対照群に比べて有意に増加した (図 2-6a)。TCDD 曝露用量の違いによる有意な差は見られなかった。尿排出量が、暗期の活動時間帯と明期の非活動時間帯で異なる可能性が考えられたことから、12 時間ずらして暗期である午前 3 時にも同様の測定を行ったところ、同じく TCDD 曝露により尿重量が有意に増加した (図 2-6b)。以上の結果から、TCDD 曝露に授乳期のマウス新生仔の尿量を増やす作用があることが明らかになった。膀胱中の尿の採取に際しては、排尿直後で尿が非常に少ない個体から排尿直前の個体まで存在することが事前に考えられたが、実際に、尿重量は同じ群内の個体間で大きな差があった。なお、解剖の過程でマウスの失禁により尿を採取できなかったサンプルはデータから除外した。また、PND7 の個体に関しても同様の方法で尿の採取を試みたものの、解剖中に失禁するケースが非常に多く断念した。

次に、PND 7, 14 での産仔の水腎症の発症率と重症度を調べたところ、TCDD の用量依存的に上昇した (表 2-2)。また、発症率、重症度ともに PND7 に比べて PND14 の方が数値が高くなっており、7 日目から 14 日目にかけて症状が進行することがわかった。PND 14 における尿重量と水腎症重症度には正の相関 ($R^2 = 0.60$) が見られた (図 2-7)。各群に排尿直後で尿量が少ないものが含まれることが相関性を低下させることを考慮に入れると、尿量の増加は水腎症の重症度に関係すると考えられた。

TCDD 曝露による尿量の増加と、水腎症発症との関連が示唆されたことから、「TCDD 曝露による尿量増加が水腎症発症の原因である」という仮説を立てた。この仮説を検証するために、腎における尿産生の最終プロセスである水再吸収を抑制することで尿量を抑制する薬剤である抗利尿ホルモン類似体 dDAVP を用いて、TCDD 曝露による尿量増加を抑制する実験を行った。具体的には、TCDD 経母乳曝露を PND1 から受けた新生仔に、dDAVP を PND 1 から 24 時間毎に仔に腹腔内投与 ($1 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{day}$) した。dDAVP 14 回目の投与 6 時間後に仔マウスの膀胱中尿重量をそれぞれ測定したところ、TCDD 単独曝露群に比べて dDAVP 共曝露群では顕著に減少し、対照群レベルまで減少した (図 2-8a)。dDAVP の消失半減期が数時間である⁵²⁾ことから、13 回目の投与 23 時間後についても尿重量を測定したところ、投与 23 時間後では dDAVP の抗利尿効果が低下し、対照群に比して有意な増加が見られた (図 2-8b)。これら 2 つの時点での尿重量測定の結果から、dDAVP は、TCDD 曝露による尿量増加を 1 日の中で少なくとも数時間の間抑制し、PND 1 から PND14 までの累積の尿量も部分的に抑制したと考えられる。PND 14 での腎臓について組織学的解析を行ったところ、dDAVP 共曝露群の水腎症の発症率、重症度ともに、TCDD 単独曝露群に比べて顕著に低下した (表 2-3)。以上の結果から、TCDD 曝露による水腎症は、TCDD による尿産生量増加に起因すると考えられた。dDAVP が水腎症の発症を完全には抑制できなかったことについては、dDAVP の抗利尿効果の持続時間が十分に長くないことが原因として考えられる。

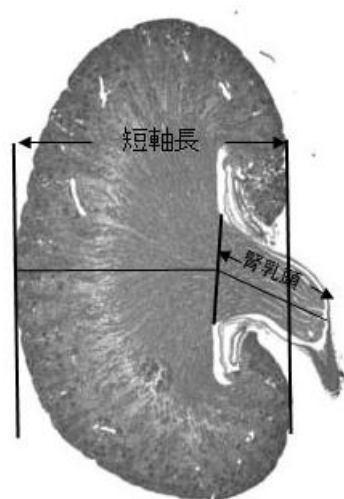


図 2-2. 腎臓の組織学的形態解析を行う上での腎内部構造の名称と定義. 腎乳頭側の皮質外側に並行な二本の線で短軸長を決定し、腎杯を結ぶ起点から先端までを腎乳頭長とした.

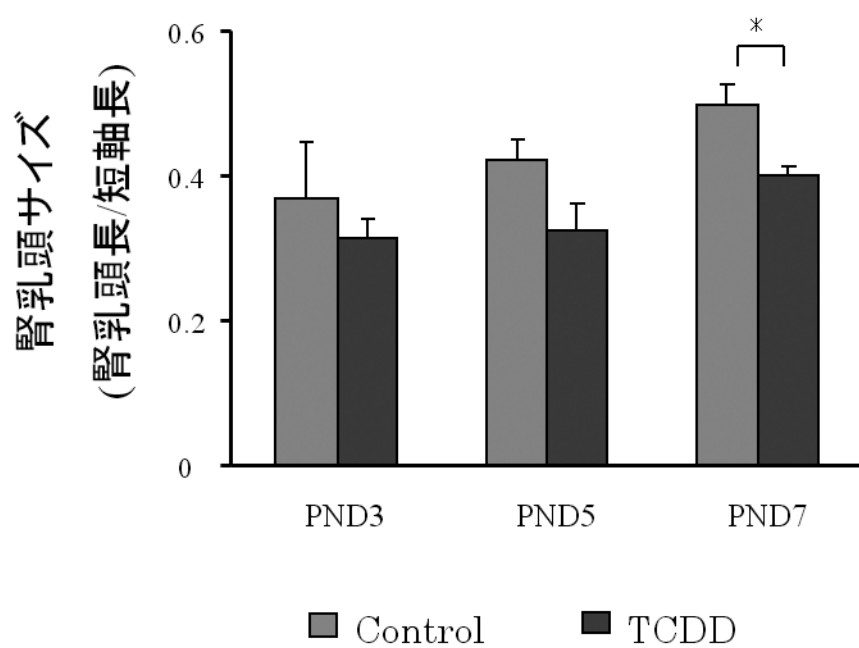


図 2-3. ダイオキシン曝露が腎乳頭のサイズに与える影響. 横軸に示した各日齢(PND)の新生仔の腎サンプルを HE 染色し、図 2-2 で定義した腎乳頭長を測定した.

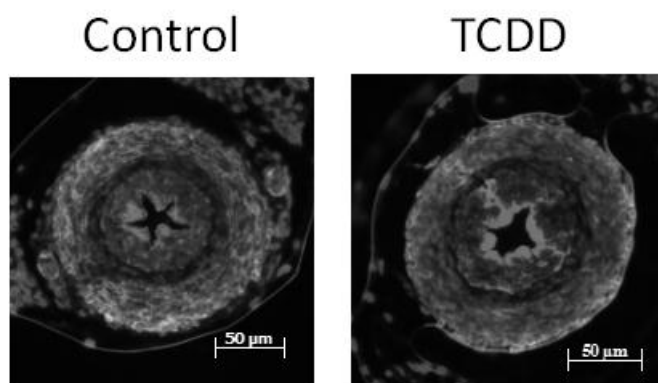


図 2-4. 尿管横断面の層構造. PND3 の尿管の組織写真像. 尿管の層構造に関しては、TCDD 曝露個体で三層構造が保たれており、大きな形態変化は認められなかったが、各層に焦点をあてると、TCDD 曝露群では PND 3 で間質層の尿管に占める割合が有意に小さかった(図 2-5、A:PND3、B:PND5、C:PND7).

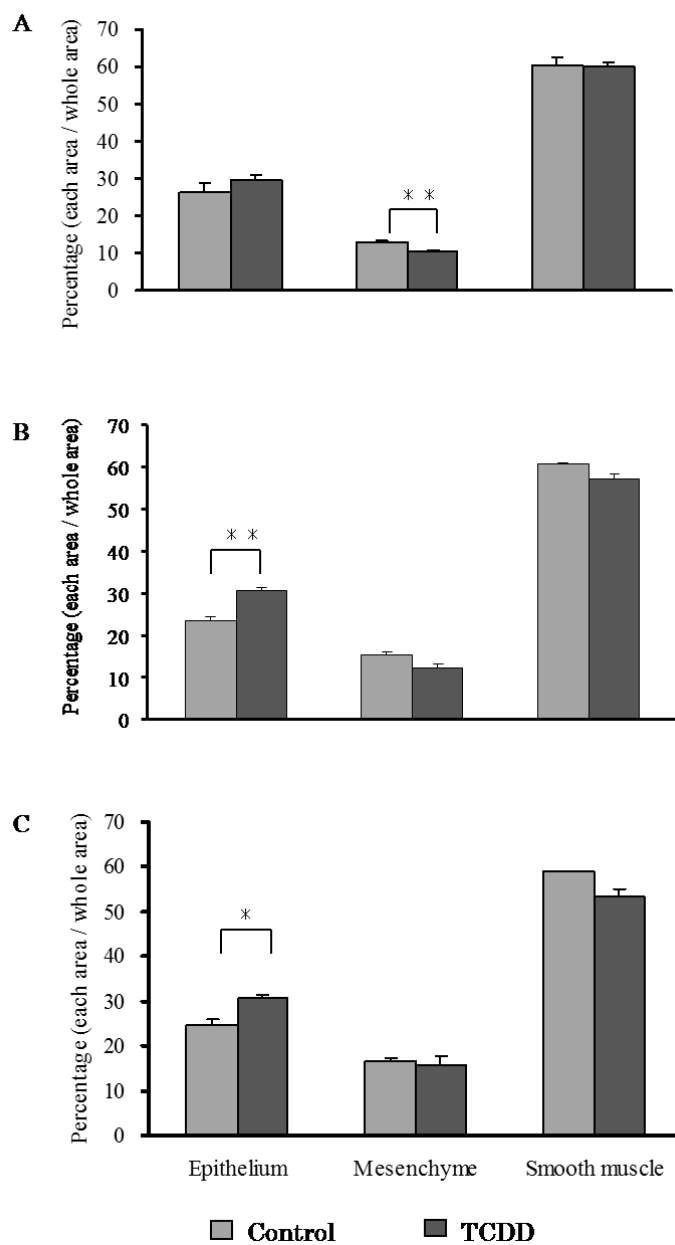


図 2-5. ダイオキシン曝露が尿管層構造に与える影響. 筋肉層(Smooth muscle layer), 上皮層(Epithelium layer)を染色し、尿管横断面の各層の面積を計測した.

表 2-1. ダイオキシン曝露マウス尿管における蠕動運動

処置	日 齢	数	5 回収縮に要する時間 (sec)	
			平均	標準偏差
対照群	3	4	29.5	4.3
	5	4	23.6	3.3
	7	3	30.5	6.7
TCDD	3	4	35.2	6.9
	5	5	23.2	2.9
	7	5	29.7	4.4

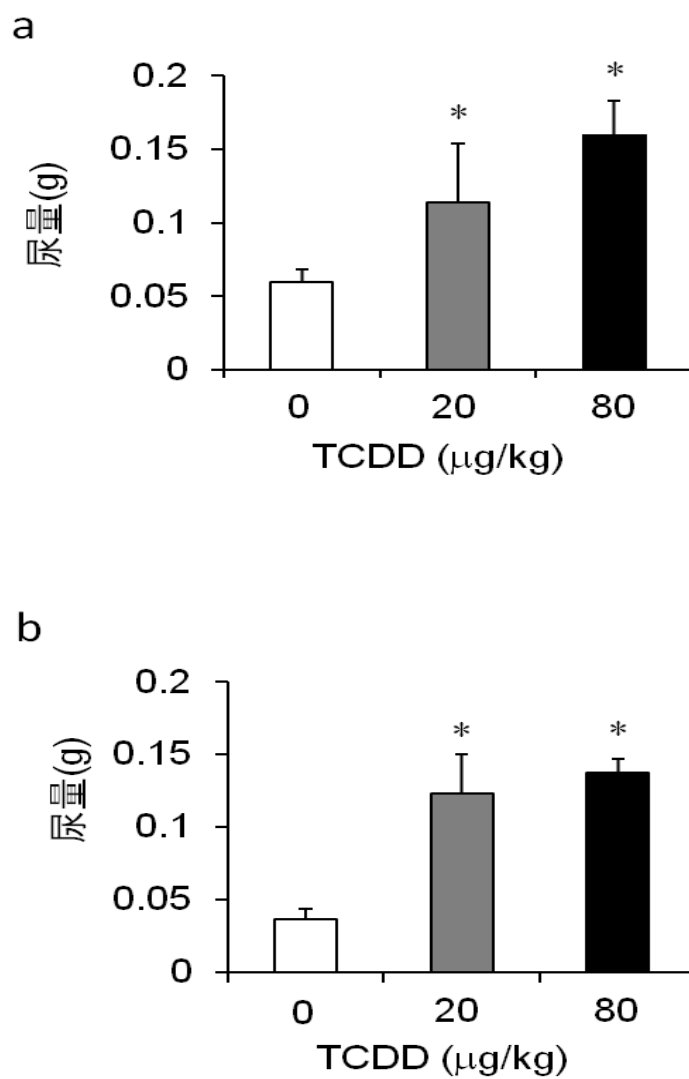


図 2-6. ダイオキシン曝露が尿量に与える影響. PND1 にて C57BL/6 系統の母マウスに TCDD を投与することで仔マウスに経母乳曝露した. PND14 の午後 3 時 (図 2-6a) と午前 3 時 ((図 2-6b) に仔マウスを解剖し、膀胱内の尿重量を測定した.

表 2-2 ダイオキシン曝露による水腎症の発症率と重症度

日 齢	用量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	個体数 pup / dam	重症度					発症率 (%)
			0	1	2	3	4	
7	0	12 / 3	10	2				0
	20	11 / 3	1	3	7			61
	80	13 / 3		4	9			70
14	0	20 / 5	17	3				0
	20	21 / 5	1	3	10	5	2	78
	80	14 / 5				2	12	100

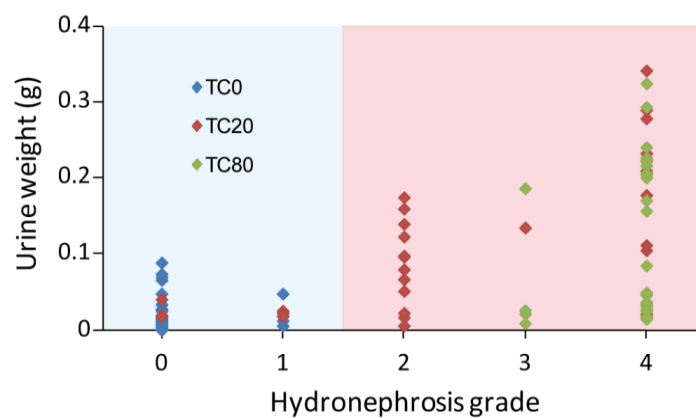


図 2-7. 水腎症の重症度と尿量の相関. 解析に用いた各個体について、横軸を重症度・縦軸を膀胱中尿重量の散布図にまとめて表した. TC0, TC20, TC80 はそれぞれ: 0, 20, 80 $\mu\text{g/kg}$ 曝露群.

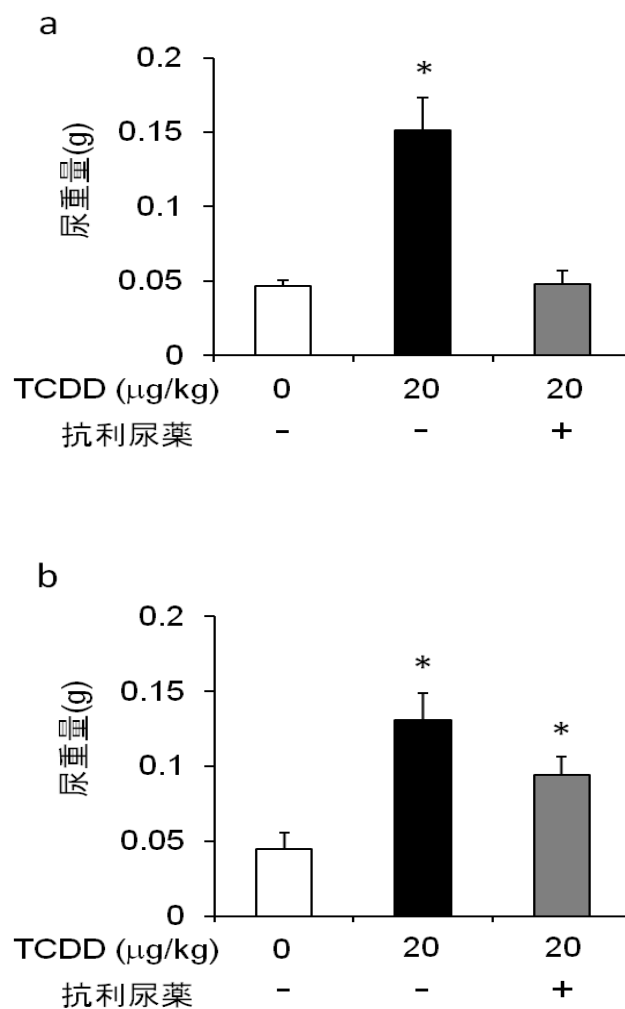


図 2-8. 抗利尿薬による尿量の抑制. TCDD 経母乳曝露を PND1 から受けた新生仔に、抗利尿ホルモン類似体である dDAVP を PND 1 から 24 時間毎に仔に腹腔内投与した.dDAVP 14 回目の投与 6 時間後 (a) 及び、13 回目の投与 23 時間後 (b) に、仔マウスの膀胱中尿重量をそれぞれ測定した.

表 2-3

ダイオキシン曝露による尿量増加と水腎症発症率ならびに重症度との関係

PND	用量 ($\mu\text{g/kg}$)	抗利尿薬 (1 $\mu\text{g/kg}$)	N pup / dam	重症度					発症率 (%)
				0	1	2	3	4	
14	0	×	13 / 4	6	7				0
	20	×	13 / 4			3	5	5	100
	20	○	15 / 4	4	10	1			8.25

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

ダイオキシン毒性は、種差や系統による差が大きいこと、感受性の高い時期が存在することから、その多種多様な毒性の全貌を把握することが困難である。この困難を克服するために、ダイオキシン類の毒性発現メカニズムを解明することによって毒性発現の条件・範囲・程度を推定することが可能ではないかと考えられてきた。一般に環境化学物質の毒性発現の分子標的はほとんど解明されていない。しかしながら、ダイオキシン毒性の研究分野では、最近になってエンドポイントについて原因となる遺伝子が特定されたものもある⁴²⁾。このような状況にあって、本研究では、曝露から発症に至るまでの経路を分子・生理学レベルで明らかにすることができた(図 2-9)。ダイオキシンの毒性発現メカニズム研究の最先端を切り開く研究ができたと言える。

授乳期の動物の腎臓生理学的な研究は、母動物と仔動物を別々に飼育できないこと、飲水負荷や飲水制限ができないことから、解析が困難であった。そのような状況にあって、本研究は、化学物質が尿精製メカニズムを如何に攪乱するかを明瞭に解明した希少な成果を得た。ダイオキシン研究にとどまらず、生理学的にも大きな意義がある。

本研究によって、ダイオキシン曝露がマウス新生仔に腎奇形である水腎症を引き起こすメカニズムが詳細に解明された。その毒性発現メカニズムは次のようなものである。ダイオキシン曝露が生理活性物質 PGE₂ 合成系酵素群を攪乱して PGE₂ の過剰産生を引き起こす。このことが、水・電解質の調節の阻害を引き起こし、尿濃縮メカニズムが正常に機能しなくなる。結果として尿排出限度を超えた多尿になり、腎実質が破壊される(図 2-9)。こうしたメカニズムから、尿濃縮能が未発達な幼若期に感受性が高いこと、PGE₂ 合成経路を構成する酵素の多型によって感受性の差が生じること、COX-2 を誘導するダイオキシンとは別の化学物質でも同様のメカニズムで水腎症が発症すること、この経路をブロックする薬剤によって少なくともマウスにおいてはダイオキシン曝露による水腎症が抑制できることなど、多くのことが理解可能になった。

(2) 環境政策への貢献

幼若期の哺乳動物に対する化学物質のリスクを評価する上では、ダイオキシンやリチウムをはじめとする PGE₂ 合成系を亢進させる化合物に注意が必要であると考えられる。また、幼若期の哺乳動物に対する腎毒性を評価する際に、サブテーマ 1 の結果を総合すると、AhR の転写活性化のみを指標にして化学物質の評価を行うより、本研究で特定した原因分子を指標にする方がより適切に評価できるものと考えられる。

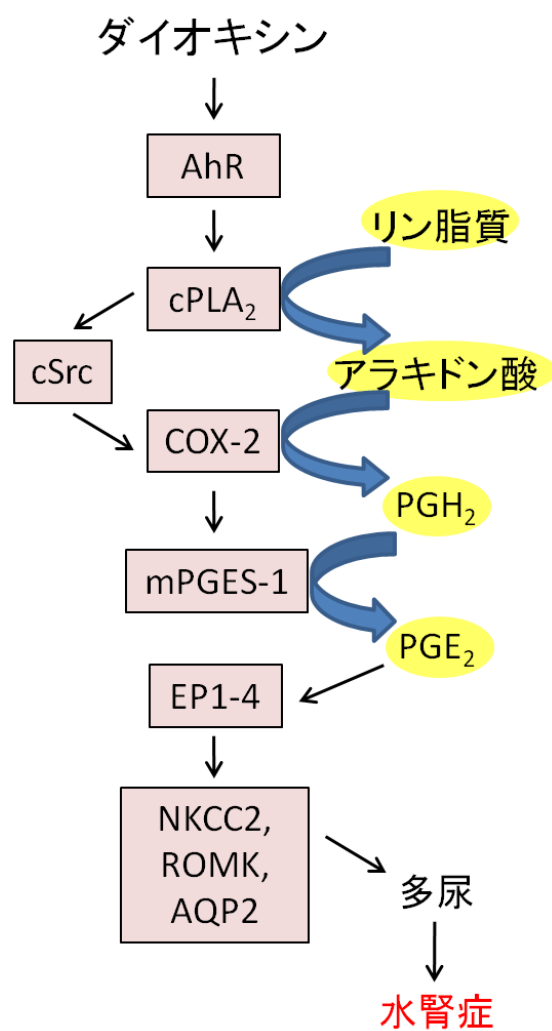


図 2-9. ダイオキシン曝露による授乳期マウスの水腎症の毒性発現パスウェイ

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) Dong B, Nishimura N, Vogel CF, Tohyama C, Matsumura F. TCDD-induced cyclooxygenase-2 expression is mediated by the nongenomic pathway in mouse MMDD1 macula densa cells and kidneys. *Biochem Pharmacol.* **79**(3):487-97, 2010
- 2) Yoshioka W, Peterson RE, Tohyama C. Molecular targets that link dioxin exposure to toxicity phenotypes. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **127**:96-101, 2011

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) Yoshioka W, Aida-Yasuoka K, Kawaguchi T, Fujisawa N, Ohsako S, Hara S, Tohyama C. Involvement of PGE₂ and urine volume increased in the onset of dioxin-induced hydronephrosis in mice. *The Toxicologist, Suppl. Toxicol. Sci.* **126**:408-408, 2012

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) 遠山千春. 環境毒性学から疾患研究への展開…水腎症発症の分子毒性メカニズムの解明. 学会長招聘講演, 第39回日本毒性学会学術年会, 仙台. 5月10日, 2010
- 2) Tohyama C. Cyclooxygenase-2 as a molecular target of dioxin-induced hydronephrosis in mice. Symposium of Korean Society of Toxicology, Seoul National University, 13-14 May, 2010
- 3) 遠山千春, Perspectives on Emerging Important Research Fields in Toxicology. 中国毒理学会/学術討論会, 大连医科大学. 31 July, 2010
- 4) Yoshioka W, Aida-Yasuoka K, Kawaguchi T, Fujisawa N, Ohsako S, Hara S, Tohyama C. Involvement of PGE₂ and urine volume increase in the onset of dioxin-induced hydronephrosis in mice. SOT2102, The Annual Meeting of the Society of Toxicology, San Francisco, USA. 2012

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

日本衛生学会賞受賞(「環境化学物質の健康影響とその毒性発現メカニズムの解明に関する研究」遠山千春, 2010 年): 本研究を含む環境化学物質の健康影響とその毒性発現メカニズムの解明に関する研究が評価されて日本衛生学会の学会賞を受賞した。

8. 引用文献

- 1) Jan MR, Shah J, Khawaja MA, and Gul K. DDT residue in soil and water in and around abandoned DDT manufacturing factory. *Environ Monit Assess.* **155**(1-4):31-8, 2009
- 2) Ayotte P, Dewailly E, Ryan JJ, Bruneau S, and Lebel G. PCBs and dioxin-like compounds in plasma of adult Inuit living in Nunavik (Arctic Quebec). *Chemosphere.* **34**(5-7):1459-68, 1997
- 3) Hansen JC. The human health programme under AMAP. AMAP Human Health Group. Arctic Monitoring and Assessment Program. *Int J Circumpolar Health.* **57**(4):280-91, 1998
- 4) Fangstrom B, Athanasiadou M, Grandjean P, Weihe P, and Bergman A. Hydroxylated PCB metabolites and PCBs in serum from pregnant Faroese women. *Environ Health Perspect.* **110**(9):895-9, 2002
- 5) Aguilar A, Borrell A, and Reijnders PJ. Geographical and temporal variation in levels of organochlorine contaminants in marine mammals. *Mar Environ Res.* **53**(5):425-52, 2002
- 6) Norstrom RJ and Muir DC. Chlorinated hydrocarbon contaminants in arctic marine mammals. *Sci Total Environ.* **154**(2-3):107-28, 1994
- 7) Mineau P. A review and analysis of study endpoints relevant to the assessment of "long term" pesticide toxicity in avian and mammalian wildlife. *Ecotoxicology.* **14**(8):775-99, 2005
- 8) Brouwer A, Ahlborg UG, van Leeuwen FX, and Feeley MM. Report of the WHO working group on the assessment of health risks for human infants from exposure to PCDDs, PCDFs and PCBs. *Chemosphere.* **37**(9-12):1627-43, 1998
- 9) Van den Berg M, et al. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ Health Perspect.* **106**(12):775-92, 1998
- 10) Van den Berg M, et al. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol Sci.* **93**(2):223-41, 2006
- 11) Eduljee GH and Gair AJ. Validation of a methodology for modelling PCDD and PCDF intake via the foodchain. *Sci Total Environ.* **187**(3):211-29, 1996
- 12) Tam I. [Diet as a source of human exposure to polychlorinated dibenzo-P-dioxins (PCDD)]. *Rocz Panstw Zakl Hig.* **50**(3):241-51, 1999
- 13) Geyer H, Scheunert I, and Korte F. Bioconcentration potential of organic environmental chemicals in humans. *Regul Toxicol Pharmacol.* **6**(4):313-47, 1986
- 14) Birnbaum LS. The role of structure in the disposition of halogenated aromatic xenobiotics. *Environ Health Perspect.* **61**:11-20, 1985
- 15) WHO consultation. Assessment of the health risk of dioxin: re-evaluation of the tolerable daily intake(TDI).25-29, 1998
- 16) Kuratsune M, et al. Yusho. 1996

- 17) Yoshimura T. Yusho in Japan. *Ind Health*. **41**(3):139-48, 2003
- 18) Homberger E, Reggiani G, Sambeth J, and Wipf HK. The Seveso accident: its nature, extent and consequences. *Ann Occup Hyg*. **22**(4):327-67, 1979
- 19) Mocarelli P, Brambilla P, Gerthoux PM, Patterson DG, Jr., and Needham LL. Change in sex ratio with exposure to dioxin. *Lancet*. **348**(9024):409, 1996
- 20) Henriksen GL, Ketchum NS, Michalek JE, and Swaby JA. Serum dioxin and diabetes mellitus in veterans of Operation Ranch Hand. *Epidemiology*. **8**(3):252-8, 1997
- 21) Seefeld MD, Corbett SW, Keesey RE, and Peterson RE. Characterization of the wasting syndrome in rats treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol Appl Pharmacol*. **73**(2):311-22, 1984
- 22) Pohjanvirta R and Tuomisto J. Short-term toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in laboratory animals: effects, mechanisms, and animal models. *Pharmacol Rev*. **46**(4):483-549, 1994
- 23) Greig JB, Jones G, Butler WH, and Barnes JM. Toxic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Food Cosmet Toxicol*. **11**(4):585-95, 1973
- 24) Jones G and Butler WH. A morphological study of the liver lesion induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rats. *J Pathol*. **112**(2):93-7, 1974
- 25) Vos JG, Moore JA, and Zinkl JG. Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the immune system of laboratory animals. *Environ Health Perspect*. **5**:149-62, 1973
- 26) Pitot HC, Goldsworthy T, Campbell HA, and Poland A. Quantitative evaluation of the promotion by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin of hepatocarcinogenesis from diethylnitrosamine. *Cancer Res*. **40**(10):3616-20, 1980
- 27) Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM, Rudikoff S, Ward JM, and Gonzalez FJ. Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. **140**(1):173-9, 1996
- 28) Peters JM, Narotsky MG, Elizondo G, Fernandez-Salguero PM, Gonzalez FJ, and Abbott BD. Amelioration of TCDD-induced teratogenesis in aryl hydrocarbon receptor (AhR)-null mice. *Toxicol Sci*. **47**(1):86-92, 1999
- 29) Nishimura N, Matsumura F, Vogel CF, Nishimura H, Yonemoto J, Yoshioka W, and Tohyama C. Critical role of cyclooxygenase-2 activation in pathogenesis of hydronephrosis caused by lactational exposure of mice to dioxin. *Toxicol Appl Pharmacol*. **231**(3):374-83, 2008
- 30) Allen JR, Barsotti DA, Van Miller JP, Abrahamson LJ, and Lalich JJ. Morphological changes in monkeys consuming a diet containing low levels of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Food Cosmet Toxicol*. **15**(5):401-10, 1977
- 31) McNulty WP. Toxicity and fetotoxicity of TCDD, TCDF and PCB isomers in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Environ Health Perspect*. **60**:77-88, 1985

- 32) Murray FJ, Smith FA, Nitschke KD, Humiston CG, Kociba RJ, and Schwetz BA. Three-generation reproduction study of rats given 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in the diet. *Toxicol Appl Pharmacol.* **50**(2):241-52, 1979
- 33) Couture LA, Abbott BD, and Birnbaum LS. A critical review of the developmental toxicity and teratogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: recent advances toward understanding the mechanism. *Teratology.* **42**(6):619-27, 1990
- 34) Mably TA, Moore RW, Goy RW, and Peterson RE. In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 2. Effects on sexual behavior and the regulation of luteinizing hormone secretion in adulthood. *Toxicol Appl Pharmacol.* **114**(1):108-17, 1992
- 35) Seo BW, Li MH, Hansen LG, Moore RW, Peterson RE, and Schantz SL. Effects of gestational and lactational exposure to coplanar polychlorinated biphenyl (PCB) congeners or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on thyroid hormone concentrations in weanling rats. *Toxicol Lett.* **78**(3):253-62, 1995
- 36) Boutros PC, Bielefeld KA, Pohjanvirta R, and Harper PA. Dioxin-dependent and dioxin-independent gene batteries: comparison of liver and kidney in AHR-null mice. *Toxicol Sci.* **112**(1):245-56, 2009
- 37) Tijet N, Boutros PC, Moffat ID, Okey AB, Tuomisto J, and Pohjanvirta R. Aryl hydrocarbon receptor regulates distinct dioxin-dependent and dioxin-independent gene batteries. *Mol Pharmacol.* **69**(1):140-53, 2006
- 38) Gonzalez FJ and Fernandez-Salguero P. The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice. *Drug Metab Dispos.* **26**(12):1194-8, 1998
- 39) Mimura J, et al. Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells.* **2**(10):645-54, 1997
- 40) Schmidt JV, Su GH, Reddy JK, Simon MC, and Bradfield CA. Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**(13):6731-6, 1996
- 41) Kopf PG, Scott JA, Agbor LN, Boberg JR, Elased KM, Huwe JK, and Walker MK. Cytochrome P4501A1 is required for vascular dysfunction and hypertension induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol Sci.* **117**(2):537-46, 2010
- 42) Yoshioka W, Peterson RE, and Tohyama C. Molecular targets that link dioxin exposure to toxicity phenotypes. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **127**(1-2):96-101, 2011
- 43) Matsumura F. The significance of the nongenomic pathway in mediating inflammatory signaling of the dioxin-activated Ah receptor to cause toxic effects. *Biochem Pharmacol.* **77**(4):608-26, 2009
- 44) Dong B, Nishimura N, Vogel CF, Tohyama C, and Matsumura F. TCDD-induced cyclooxygenase-2 expression is mediated by the nongenomic pathway in mouse MMDD1 macula

- densa cells and kidneys. *Biochem Pharmacol.* **79**(3):487-97, 2010
- 45) Dong B and Matsumura F. Roles of cytosolic phospholipase A2 and Src kinase in the early action of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin through a nongenomic pathway in MCF10A cells. *Mol Pharmacol.* **74**(1):255-63, 2008
 - 46) Blachar A, Blachar Y, Livne PM, Zurkowski L, Pelet D, and Mogilner B. Clinical outcome and follow-up of prenatal hydronephrosis. *Pediatr Nephrol.* **8**(1):30-5, 1994
 - 47) Boylan JW, Colbourn EP, and Mc CR. Renal function in the foetal and new-born guinea-pig. *J Physiol.* **141**(2):323-31, 1958
 - 48) Miyazaki Y, et al. Angiotensin induces the urinary peristaltic machinery during the perinatal period. *J Clin Invest.* **102**(8):1489-97, 1998
 - 49) Liu W, Morimoto T, Kondo Y, Iinuma K, Uchida S, and Imai M. "Avian-type" renal medullary tubule organization causes immaturity of urine-concentrating ability in neonates. *Kidney Int.* **60**(2):680-93, 2001
 - 50) Miyazaki Y and Ichikawa I. Role of the angiotensin receptor in the development of the mammalian kidney and urinary tract. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* **128**(1):89-97, 2001
 - 51) Yu J, Carroll TJ, and McMahon AP. Sonic hedgehog regulates proliferation and differentiation of mesenchymal cells in the mouse metanephric kidney. *Development.* **129**(22):5301-12, 2002
 - 52) Agerso H, Seiding Larsen L, Riis A, Lovgren U, Karlsson MO, and Senderovitz T. Pharmacokinetics and renal excretion of desmopressin after intravenous administration to healthy subjects and renally impaired patients. *Br J Clin Pharmacol.* **58**(4):352-8, 2004

Elucidation of a new mechanism of dioxin toxicity unaccompanied with the transcriptional activation of arylhydrocarbon receptor

Principal Investigator: Chiharu TOHYAMA
Institution: Laboratory of Environmental Health Sciences, CDBIM,
Graduate School of Medicine, The University of Tokyo
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, JAPAN
Tel. +81-3-5841-1917; Fax. +81-3-5841-1434
E-mail: mtohyama@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

Cooperated by: National Institute for Environmental Studies

[Abstract]

Key Words: Dioxin, Hydronephrosis, cPLA₂, Risk assessment

Dioxin exposure has been reported to induce a variety of toxic effects in humans and laboratory animals. Arylhydrocarbon receptor (AhR) has been established to play an essential role in the manifestation of dioxin toxicity through its activation with a partner transcription factor. This mode of action, or the genomic action of AhR, has been the dogma of the molecular basis of dioxin toxicity. However, how the action lead to such a variety of toxic effects is largely unknown. On the other hand, recently studies *in vitro* clearly showed that inflammatory responses induced immediately after dioxin exposure are not evoked via the genomic action of AhR, and that this toxicity mechanism is proposed to be "nongenomic" action of AhR. This new mechanism may explain the molecular basis of a variety of dioxin toxicity. The objective of the present research is to construct an animal model to clarify the role of nongenomic pathway on dioxin toxicity. To this end, we used cytosolic phospholipase A₂ α (cPLA₂ α) knockout (KO) mice, because cPLA₂ was shown to play the key step of the nongenomic pathway by *in vitro* experiments. Pups of homozygous cPLA₂ α KO and WT were administered 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) via lactation from postnatal day (PND) 1. Loss of cPLA₂ α substantially reduced the incidence and grade of hydronephrosis by TCDD. Both cyclooxygenase-2 (COX-2), a causative enzyme for TCDD-induced

hydronephrosis, and cSrc kinase, a possible downstream molecule in the nongenomic pathway of AhR, were upregulated depending on cPLA₂α. These results showed that we could successfully construct animal model in which nongenomic pathway of AhR is suppressed, and that the onset of TCDD-induced hydronephrosis is triggered via this pathway. We next studied possible alterations in the structure and function of the ureter and kidney of TCDD-exposed pups. Structural changes in the kidney pelvis and ureteral layer structure observed in TCDD-exposed pups were considered not to be responsible for peristalsis of the ureter. TCDD-exposed pups were found to overproduce the urine. Co-administration of antidiuretic drug revealed that overproduction of urine is the cause of hydronephrosis. These results indicate that TCDD upregulates COX-2 via a nongenomic action of AhR and disrupts the urine production mechanism of kidney, resulting in the onset of hydronephrosis. In the assessment of dioxin-like compounds, it would be appropriate to consider the nongenomic action of AhR as well as the conventional action, or genomic action, of AhR.

研究概要図

ダイオキシン毒性発現メカニズムの定説‘ジェノミック経路’と
新たな仮説‘ノンジェノミック経路’

