

本稿は1998年11月24-26日、メルパルク大阪で開催された日本環境変異原学会第27回大会のシンポジウム「ダイオキシンの生体影響」(企画:野村大成)で発表された(座長:野村大成, 藤川和男)。

## ダイオキシンの遺伝的影響の問題点 —継世代的影響について—

野村 大成, 中島 裕夫, 李 利亜, 福留 優子, Rajamanickam Baskar,  
梁 治子, 具 在妍, 森 景子

大阪大学大学院医学系研究科遺伝医学講座・放射線基礎医学 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2

---

### Concern for the hereditary effects of dioxins

Taisei Nomura, Hiroo Nakajima, LiYa Li, Yuuko Fukudome,  
Rajamanickam Baskar, Haruko Ryo, JaeYeon Koo and Keiko Mori

Department of Radiation Biology and Medical Genetics,  
Graduate School of Medicine, Osaka University  
2-2 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

#### Summary

Although a higher risk of congenital malformations has been reported in the children of fathers who had been exposed to dioxin-contaminated herbicides, genotoxicities of the dioxins are unclear in *in vitro* experimental systems using bacteria and culture cells, and also in the mouse and human germ cells. In the series of experiments co-ordinated by the "Man and Earth" project, however, indirect death of the mouse sperm by the damage to Sertoli cells and significant reduction of fertility and live births were observed. Furthermore, significant increase of functional defects like respiratory distress syndrome was observed in the F<sub>1</sub> fetuses of TCDD-treated male mice of two different strains. Morphological anomalies were 5 to 8 folds higher than control, although differences were not significant because of small sample size. Increased incidence of molecular changes, *i.e.*, length polymorphism of repetitive DNA sequences (*pc-3*) was also detected but it was not statistically significant at present. Large scale experiments are in progress.

(This paper, in a session chaired by Taisei Nomura and Kazuo Hujikawa, was presented to the symposium "Biological effects of dioxins", organized by Taisei Nomura, at the 27<sup>th</sup> annual meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at the Mielparque Osaka in Osaka, Japan, November, 24-26, 1998.)

**Keywords :** transgenerational effects, dioxins, malformations, respiratory distress syndrome, mice

---

#### 緒 言

ダイオキシン類の遺伝毒性に関しては、最も強力な2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)において

も、Rice博士の講演にあったように、IARC(1997)の分類では、バクテリア、培養細胞等でも遺伝毒性(突然変異等)は起こさないものとされている。しかし、TCDD投与によりマウス精巣は著しく萎縮し、精子数の減少がみられる。放射線照射や、変異原投与によりよくみられる現象であるが、前述のごとく井上らによると、マウス精子へのDNA損傷はほとんど認められない。ヒト精子についても、上口、石井らによるハムスター卵への挿入実験

---

受付:1999年5月6日

受理:1999年5月8日

©日本環境変異原学会

Table 1 Congenital malformations in the children of fathers who had been exposed to herbicides before conception in Vietnam

| Authors                            | Ton (1981) |          | Cân (1984) |          | Dao (1988) |           |
|------------------------------------|------------|----------|------------|----------|------------|-----------|
|                                    | (-)        | (+)      | (-)        | (+)      | (-)        | (+)       |
| Father's exposure                  |            |          |            |          |            |           |
| No. of newborns                    | 1438       | 1496     | 16570      | 1801     | 1207       | 3329      |
| No. of congenital malformation (%) | 3 (0.2)    | 47 (3.1) | 118 (0.7)  | 28 (1.6) | 13 (1.1)   | 112 (3.4) |
| p                                  | <<0.001    |          | <0.001     |          | <0.001     |           |

(+) : children of the North Vietnam soldiers who fought in the sprayed area of the South Vietnam and married with the North Vietnam women after returning to their homes

(-) : children of the North Vietnam soldiers who had never been fought in the sprayed area and married with the North Vietnam women after returning to their homes

でも染色体損傷は誘発されなかった。しかし、井上らは、ダイオキシン投与により精細胞の栄養細胞である Sertoli 細胞に障害を与えることにより、精子形成が障害され、二次的に(間接的に)精子数が減少する。すなわち、ダイオキシンによる間接的精子損傷作用を発見した。このような現象は、プラスチックの可塑剤である、フタル酸エステルでもみられることを福岡らが報告している (Fukuoka et al., 1993)。最近話題になっているヒトでの精子数の減少に、このような環境有害物質(内分泌攪乱物質)の影響が考えられるが、動物実験とは量的に大きな差がある。胎児期への作用をも考慮する必要がある。なぜなら、合成エストロゲン DES やウレタンがマウス胎児に作用すると生後、精巣、卵巣の萎縮がみられ、精子、卵子の著しい減少をきたすことが 20 年以上前からわかっているからである (Nomura, 1976; Nomura and Kanzaki, 1977)。マウス卵細胞には肝臓の約 50 % が検出されるが、精子同様 DNA 損傷を誘発しなかった (井上ら, 本誌)。

このように、ダイオキシン処理されたヒト精子には、DNA 損傷および、染色体異常等の遺伝的障害は誘発されていないが、石井らによると、TCDD (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 1 時間処理でヒト精子ハムスター卵への挿入がわずかであるが(約 1/2 まで)減少する (石井, 1996)。合成洗剤の主剤である LAS や AS では、0.02 % 液で 1 時間処理すると完全に (0 %) 授精能力はなくなることに比べると、はるかに授精障害は弱い (Nomura et al., 1980, 1987; Ishii et al., 1990)。しかしながら、ベトナム戦争において、枯葉剤(ダイオキシン混入)散布地域で戦った北ベトナム兵士の子供に、流死産、奇形発生が有意に高いとの報告がある (Table 1)。雄マウスに放射線照射や変異原を投与した時の F<sub>1</sub> での障害 (Nomura, 1975, 1978, 1982, 1986, 1988, 1994; Kirk and Lyon, 1984; Nagao and Fujikawa, 1990; Nomura et al., 1990) と同じようなことが

起こっており、継世代的に何らかの影響を及ぼす可能性が残されている。しかし、矛盾点も多いので、TCDD の継世代的影響を調べている。

## 1. ヒトにおける次世代影響調査

Table 1 にその概要を示した。北ベトナム兵士が枯葉剤散布地域(山地、森林)で戦い、帰国後、南ベトナムに行ったことのない正常婦人と結婚した場合、枯葉剤非散布地域(平野、海浜)で戦った兵士の場合に比べ、高度に有意に、子供に先天異常が発生しているとの報告がある (Ton, 1981; Cân, 1984; Dao, 1988)。いずれの場合も、対照群(非被曝群)の奇形発生率があまりにも低い(日本人では約 5 %) ことに大きな矛盾を感じるが、被曝群と同じカテゴリーで分析されたものとして一応評価し、記載しておく必要がある。

## 2. 継世代的発生異常検出

バイオケミカルハザード安全飼育装置内で雄 C 3 H/HeJ マウス腹腔内に TCDD 100 もしくは 50 ng/g 体重を単回投与し、同装置内で飼育した。精原細胞期に無処置の雌 C 57 BL/6 J マウスと交配した。対照群では溶媒であるコーンオイルのみを投与した雄 C 3 H/HeJ マウスを雌 C 57 BL/6 J と交配した。ダイオキシン投与群および対照群ともに妊娠 18 日目に帝王切開を行い、F<sub>1</sub> での流死産(早期胎芽死亡、胎仔死亡)、形態異常を検出した。また、胎仔を人工蘇生し、蘇生が可能かどうかを調べた後、内部臓器の形態学的異常を調べた。胎仔臓器は分子レベルでの異常を調べるために凍結保存した。

Table 2 は、ダイオキシン 100, 50 ng/g 体重単回投与群と対照群の現在までの結果をまとめたものである (野村, 1995; 中島, 1997)。

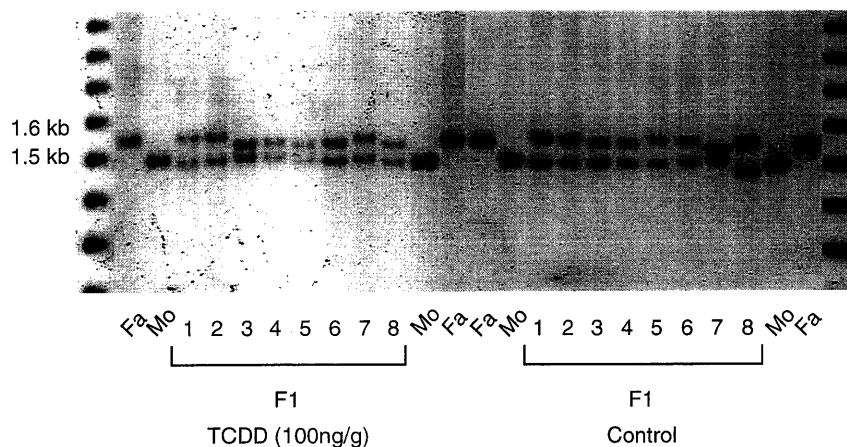
1) ダイオキシン投与群では、対照群に比べて有意かつ用量依存的な着床率および帝切時の生存胎仔率の低下

**Table 2** Incidence of preimplantation loss, embryonic deaths, respiratory distress syndrome, and malformations in the F<sub>1</sub> fetus of C57BL/6J and C3H/HeJ mice treated with TCDD (50 and 100 ng/g)

| TCDD dose (ng/g) | No. of preg. mice | Corpora lutea (CL) | Implant <sup>a</sup> | Early death <sup>b</sup> | Late death <sup>b</sup> | Living fetus <sup>b</sup> | RDS <sup>c</sup> | Malformed fetus <sup>c</sup> | Details                                                                                                                                                     |
|------------------|-------------------|--------------------|----------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------|------------------|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 100              | 10                | 94<br>(9.4)        | 73**<br>(77.7)       | 20<br>(27.4)             | 6<br>(8.2) <sup>d</sup> | 47*<br>(64.4)             | 9<br>(19.2)      | 5<br>(10.6)                  | 2 ; Dwarf & Omphal-<br>cele,<br>1 ; Agenesis of the<br>testis<br>1 ; Agnathy, Cleft<br>palate, Kinky tail<br>& PDA<br>1 ; l-eyeball def. &<br>General edema |
| 50               | 11                | 98<br>(8.9)        | 87<br>(88.8)         | 15<br>(17.2)             | 10<br>(11.5)            | 62<br>(71.3)              | 18**<br>(29.3)   | 5<br>(8.1)                   | 5 ; Dwarf                                                                                                                                                   |
| 0                | 11                | 92<br>(8.4)        | 85<br>(92.4)         | 13<br>(15.3)             | 3<br>(3.5)              | 69<br>(81.2)              | 5<br>(7.2)       | 1<br>(1.4)                   | 1 ; Dwarf                                                                                                                                                   |

<sup>a</sup> ; % of CL, <sup>b</sup> ; % of implant, <sup>c</sup> ; % of living fetus, <sup>d</sup> ; 1 gigantism

Fisher's exact test ; \*p&lt;0.05, \*\*p&lt;0.01

**Fig. 1** Length alteration of paternal and maternal bands of *pc-3* PCR products in F<sub>1</sub> fetuses of C57BL/6J female and TCDD treated and untreated C3H/HeJ male mice. Experimental procedures are given in the text. Fa : C3H/HeJ male, Mo : C57BL/6J female

が認められた。着床率の減少は、TCDD による精子数減少によるものと考えている。

2) ダイオキシン投与群では、対照群に比べて統計学的には有意性が認められないものの、用量依存的な妊娠早期胎芽死亡率および奇形胎仔率の増加が認められた。

3) 帝王切開時において小人症が対照群で1例、ダイオキシン 50 ng/g 投与群では、5例に観察された。100 ng/g 投与群では、5例の生存胎仔に小人症、無頸症、口蓋裂、臍ヘルニア、曲尾、浮腫、精巣發育不全など対照群や 50 ng/g 投与群では認められないような重度の奇形が検出された。また、100 ng/g 投与群では、胎仔死亡例の中にも1例の巨大胎仔が認められた。50 ng/g 投与群では仮死(Respiratory Distress Syndrome, RDS)の有意な増加があった。

以上の結果から、まだ個体数が少ないが、ダイオキシ

ン投与群において、早期胎芽死亡、いわゆる優性致死の増加の傾向が用量依存的に認められる点、着床率や生存胎仔数が有意に用量依存的に減少している点、また自然誘発されにくい重度形態異常などが増加している点、および仮死が有意に増加している点から、TCDD のマウスへの遺伝的影響が示唆される。

以上の予備実験結果を確認するために、異なる系統のマウスを用いた研究も行っている。3ヵ月齢の雄 C.B 17 マウス腹腔内に 100 ng/g 体重の TCDD を同様に投与し、精原細胞期に正常無処置の雌 C.B 17 マウスと交配した。TCDD 投与群 13、対照群(コーンオイル) 7 匹の妊娠マウスを 18 日目に帝王切開を行い、F<sub>1</sub> 胎仔を調べたところ、排卵数に対する着床数は 76.4 %と対照群(93.7 %)に対し、有意な減少を示し(p<0.01)、生存 F<sub>1</sub> 胎仔での仮死の頻度も 37.3 %と対照群(3.9 %)に対し、有意な

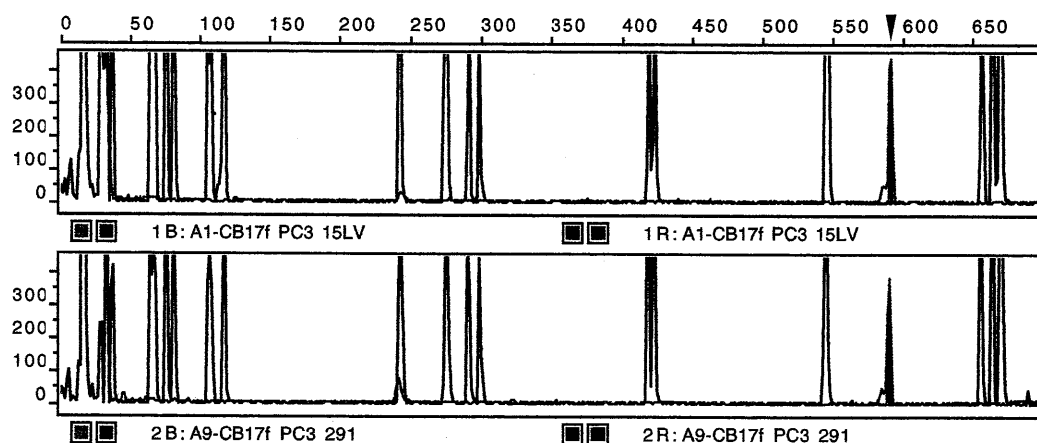


Fig. 2 GeneScan profile of *pc-3* PCR products in F<sub>1</sub> fetuses of TCDD treated and untreated C.B17 male mice. Experimental procedures are given in the text. An arrow indicates *pc-3* PCR products of standard (upper) and untreated (lower) C.B17 fetuses. Other spectra are for length markers

Table 3 Length alteration of maternal and paternal bands of *pc-3* PCR products in F<sub>1</sub> fetuses of C57BL/6J female and TCDD-treated C3H/HeJ male mice

| TCDD<br>(ng/g) | Incidence (%) |              |
|----------------|---------------|--------------|
|                | Maternal      | Paternal     |
| 0              | 3/72 (4.2)    | 16/72 (22.2) |
| 50             | 5/62 (8.1)    | 11/62 (17.7) |
| 100            | 4/53 (7.5)    | 8/53 (15.1)  |

Table 4 Length polymorphism of *pc-3* PCR products in F<sub>1</sub> fetuses of C.B17 male mice treated with TCDD

| TCDD<br>(ng/g) | No of F <sub>1</sub> | Mean   | SD   | No of F <sub>1</sub> with<br>abnormal length (%) |
|----------------|----------------------|--------|------|--------------------------------------------------|
| 100            | 75                   | 585.01 | 0.66 | 4 (5.3) <sup>a</sup>                             |
| 0              | 60                   | 584.87 | 0.61 | 1 (1.7)                                          |
| Standard       | 47                   | 584.76 | 0.69 | 0 (0.0)                                          |

<sup>a</sup> 2-tail t-test;  $p=0.194$

Two of 4 fetuses have congenital malformations

増加 ( $p<0.01$ )が認められている。

### 3. 次世代での遺伝子変異検出の試み

前述のごとく、個体レベルでは、次世代に何らかの異常を起こす可能性が示された。より細かな変化を検出するため、反復配列遺伝子 *Pc-3* を指標にして、F<sub>1</sub> 胎仔での Length Polymorphism を調べた。前述の実験で、TCDD 投与雄マウスと非投与マウスを交配して得られた F<sub>1</sub> 胎仔の肝臓より DNA を QIAamp Tissue Kit (Qiagen 社) により抽出した。抽出された DNA をテンプレートにして、*Pc-3* 特異的プライマー (高橋ら、未発表) を用い PCR 法にて増幅した。アガロースゲルにて電気泳動を行い、サイバグリーン (FMC Bio Products 社) にて染色し、Fluor Image 595 (Molecular Dynamics 社) により解析を行った (Fig. 1)。Table 3 に B 6-C 3 F<sub>1</sub> 胎仔での結果を示した。TCDD 投与により母マウス (C 57 BL/6 J) 由来のバンドのシフトの増加と父マウス (C 3 H/HeJ) 由来バンドのシフトの減少がみられるが有意ではない。

C.B 17 マウスの *Pc-3* 遺伝子は反復数が少ない (短い) ので、ABI PRISM 310 GeneScan (Perkin Elmer Applied Biosystems) を用いて F<sub>1</sub> 胎仔 DNA の PCR 産物の解析を行った。Fig. 2 に示すごとく、*Pc-3* PCR 産

物は約 585 base である。その平均値は、正常 C.B 17 マウス胎仔と TCDD 無処置群 F<sub>1</sub> 胎仔では全く同じであるのに対し、TCDD 投与群ではやや長く、正常 C.B 17 マウス胎仔での 99 % CI を越える異常な長さの PCR 産物は、有意性はないが TCDD 投与により増加傾向がみられた (Table 4)。この方法は、前述の電気泳動法によるバンドの易動度の差を肉眼的に検出する方法に比べ、非常に安定かつ客観的な実験結果が得られる。今後引き続き研究を行う。

### 結 語

ダイオキシン類は水に溶けにくく、マウス個体への投与方法の面で、生殖細胞に確実に作用させるのが困難であること、強力な毒性が示唆されているため、Chemical hazard safety cabinet 内での実験に限定されること等、これまで遺伝毒性、発癌性研究に用いた多くの化学物質中でも最もやりにくい物質である。

本シンポジウムで取り上げたごとく、いまだ TCDD の継世代的影響に関しては、明確な証拠は得られていない。しかし、30 年前、バクテリア、培養細胞等で変異原性の全くなかったウレタンが有意な継世代的障害 (形態異常、癌) を誘発することが証明された例もあるので (Nomura, 1975, 1978, 1982)、従来の遺伝毒性研究法に

とられず、柔軟かつ慎重に実験を続ける必要がある。特に、TCDD に関しては、雌マウスの汚染による実験結果の不明瞭性を避けるため、意図的に雄マウスへの TCDD 投与直後の交配を避けてきたが、一部の例外を除くと、より高い感受性を示す精子、精子細胞期への作用をも検討せざるを得なくなった。

# 参考文献

- Cân, N.(1984) Effect on offspring of parental exposure to herbicides, In : A. H. Westing (Ed.), *Herbicides in War-the Long Term Ecological and Human Consequences*, Pailor and Francis, Philadelphia, pp. 137-14.
- Fukuoka, M., T. Kobayashi, Y. Zhou and T. Hayakawa (1993) Mechanism of testicular atrophy induced by di-butyl phthalate in rats. Part 4. Changes in the activity of succinate dehydrogenase and the levels of transferrin and ferritin in the Sertoli and germ cells, *J. Appl. Toxicol.*, 13, 241-246.
- IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (1997) Vol. 69 Polychlorinated dibenzo-*para*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans, IARC, Lyon, France.
- Ishii, Y., Y. Samejima, F. Saji and T. Nomura (1990) Effect of alcohol sulfate, linear alkylbenzene sulfonate and natural soap on the development of fertilized eggs of the mouse *in vitro*, *Mutat. Res.*, 242, 151-155.
- 石井 裕 (1996) 新人為起源有害物質のヒト精子およびマウス受精卵への影響, *環境科学会誌*, 9 : 81-85.
- Kirk, K. M. and M. F. Lyon (1984) Induction of congenital malformations in the offspring of male mice treated with X-rays at pre-meiotic and post-meiotic stages, *Mutat. Res.*, 125, 75-85.
- Nagao, T. and K. Fujikawa (1990) Genotoxic potency in mouse spermatogonial stem cells of triethylenemelamine, mitomycin C, ethylnitrosourea, procarbazine, and propyl methanesulfonate as measured by F<sub>1</sub> congenital defects, *Mutat. Res.*, 229, 123-128.
- 中島裕夫 (1998) 新人為起源有害物質による生態系への遺伝障害の検出, 1997 年度文部省科学研究費重点領域研究「人間地球系」研究広報, pp. 145-146.
- Nomura, T.(1975) Transmission of tumors and malformations to the next generation of mice subsequent to urethan treatment, *Cancer Res.*, 35, 264-266.
- Nomura, T.(1976) Comparison of tumour susceptibility

- among various organs of foetal, young, and adult ICR/Jcl mice, *Brit. J. Cancer*, 33, 521-534.
- Nomura, T. and T. Kanzaki (1977) Induction of urogenital anomalies and some tumors in the progeny of mice receiving diethylstilbestrol during pregnancy, *Cancer Res.*, 37, 1099-1104.
- Nomura, T.(1978) Changed urethan and radiation response of the mouse germ cell to tumor induction, In : L. Severi (Ed.), *Tumours of Early Life in Man and Animals*, Perugia Univ. Press, Perugia, pp. 873-891.
- Nomura, T., H. Gotoh, and T. Namba (1990) An examination of respiratory distress and chromosomal abnormalities in the offspring of male mice treated with ethylnitrosourea, *Mutat. Res.*, 229, 115-122.
- Nomura, T., S. Kimura, S. Hata, T. Kanzaki and H. Tanaka (1990) The synthetic surfactants AS and LAS interrupt pregnancy in mice, *Life Sciences*, 26, 49-54.
- Nomura, T.(1982) Parental exposure to X-rays and chemicals induces heritable tumours and anomalies in mice, *Nature*, 296, 575-577.
- Nomura, T.(1986) Further studies on X-ray and chemically induced germ-line alterations causing tumors and malformations in mice, In : C. Ramel (Ed.), *Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B : Genetic Effects and Applied Mutagenesis*, Alan R. Liss, New York, pp. 13-20.
- Nomura, T., S. Hata, K. Shibata, and T. Kusafuka (1987) Killing of preimplantation mouse embryos by main ingredients of cleansers AS and LAS, *Mutation Res.*, 190, 25-29.
- Nomura, T.(1988) X-ray and chemically induced germ-line mutation causing phenotypical anomalies in mice, *Mutation Res.*, 198, 309-320.
- Nomura, T.(1994) Male-mediated teratogenesis-ionizing radiation/ethylnitrosourea studies, In : A. F. Olshan, D. R. Mattison (Eds.), *Male-mediated Developmental Toxicity*, Plenum Press, New York, pp. 117-127.
- 野村大成 (1996) 新人為起源有害物質の継世代障害検出と総括, 1995 年度文部省科学研究費重点領域研究「人間地球系」研究広報, pp. 277-279.
- Ton, T. T.(1981) US chemical warfare and its consequences, *Vietnam Courier*, Hanoi, reviewed by Watanuki, R., In : Kagaku, 51, 577-580 (in Japanese).
- Ton, D. L. ベトナム枯葉剤被害と保健医療問題国際シンポジウム—オレンジ剤被曝後の次世代への影響 (1989) 於大阪大学医学部, 大阪 (in Vietnamese).