

「内分泌かく乱物質」
平成10年度採択研究代表者

遠山 千春

(国立環境研究所 部長)

「リスク評価のためのダイオキシンによる内分泌かく乱作用の解明」

1. 研究実施の概要

ゴミ焼却などに伴う環境へのダイオキシンの放出とこれによる健康への影響に関する国民的関心の高まりのなかで、日本政府は99年6月にダイオキシンの安全基準である耐容一日摂取量を、当面、体重1kgあたり4ngと設定した。しかし、ダイオキシンのリスク評価のために使用された科学的知見のほとんどは国外から発信されたものであった。今後のダイオキシンの健康リスク評価のために、我が国から学術的価値も高い研究成果の発信を集中的に行う必然的かつ緊急性があろう。我々は、今回の研究を単に学術的関心のみの基礎研究ではなく、現実にも求められているリスク評価へつなげる研究として位置づけた。

研究体制として内分泌かく乱作用に関わる研究課題のうち、生殖機能、脳機能・行動、免疫機能の面から3つの研究グループを編成した。これらの3分野の研究を縦系とすると、横系の関係にあるリスク評価を第4グループとして設けた。具体的には、マウスやラットなどの実験動物の受精卵から出生までのもっとも感受性が高い期間にダイオキシンを曝露して量・反応関係を検討するとともに、内分泌かく乱作用のメカニズムの解明を行うことを目指している。

これまでの研究により、低用量で雄の生殖器官への影響、雌の成熟の促進、T細胞の分化への影響の知見などが得られた。このほか、精子形成、胎盤機能、性行動、甲状腺機能、ならびにこれらの影響指標のリスク評価への適用について検討を行っている。

2. 研究実施内容

本研究課題は、生殖機能、脳機能・行動、免疫機能という3つの独立したサブテーマ、ならびにこれらに共通するサブテーマとしてリスク評価の計4つのサブテーマから構成され、それぞれが独立した研究グループを構成している。すなわち、対象とする生体反応は様々であるが、可能な限り、ダイオキシンを曝露した動物を共用すること、また、共通の実験技術などはグループを越えて研究者の相互協力体制の元に遂行すること、また、研究結果については、リスク評価グループを中心に、総合的に研究成果のとりまとめができるように構想されている。

研究プロジェクト全体に共通する事項は、次の通り。

対象物質：2,3,7,8-TCDDを含むダイオキシン類。

実験動物：ラットとマウス。必要に応じて、Ah受容体あるいはトランスチレチン（TTR）のノックアウトマウス、アトピー性皮膚炎自然発症マウスなどを使用。

曝露時期：受精卵から出生期まで。各実験に共通する投与プロトコールと個別のプロトコールを適宜用いる。

影響指標：影響判定指標に関しては、遺伝子の発現から行動影響まで、内分泌攪乱の揺らぎを特定できる、あるいは反映すると予想される指標を設定。

以下に本年度に得られた成果の一部を紹介する。

(1) 生殖機能に及ぼす影響

2,3,7,8-TCDDを妊娠ラットに投与し、胎仔・胎盤、出生後の影響を観察した。分娩直前にその胎盤のRNAを解析したところ、胎盤特異的遺伝子の発現の減少が観察された。また、胎盤由来のRcho-1細胞を培養し、1ないし10 nM TCDDを24時間曝露すると、二次元電気泳動において明らかに発現量が増加するスポットが確認できた。現在、同定など解析を行っている。

生後の肛門生殖突起間距離、及び腹側前立腺重量は、TCDD用量が50 ng/kg 体重の単回投与という極めて微量のTCDDで減少することが観察された。前立腺やペニスなどの外生殖器官が精巣や精巣上体などの内生殖器官よりも、TCDDにより影響をこうむりやすいことが判明した。

(2) 脳機能・行動に及ぼす影響

体重減少を引き起こす高用量のTCDDをラットに投与した場合、膣の開口などが遅延することが報告されている。我々は妊娠ラットに200ないし800 ng/kg の低用量のTCDDを投与し、出生した雌ラットの生殖器系の成熟に及ぼす影響を検討した。対照群の膣開口及び初期排卵の指標となる最初の発情間期像は、それぞれ 35.4 ± 1.5 日(平均 \pm 標準偏差)及び 37.1 ± 2.1 日であった。これに比べて、TCDD投与群では用量依存的に性成熟が早まる傾向が観察された。

性成熟には、膣の開口に代表される生殖器の成熟と共に、視床下部を中心とした脳の排卵制御ネットワークの完成が必須であると考えられている。我々の研究から、TCDD曝露により膣の開口、並びに最初の発情間期像が早くなったことから、TCDDは、生殖器の発達並びに脳の排卵制御機構の発達に影響を及ぼすことが示唆された。

(3) 免疫機能への影響

ラットにTCDDを1.0ないし2.0 μ g/kg体重の用量で単回、経口投与し、7日目に胸腺及び腸管膜リンパ節からリンパ球を調製し、その構成をフローサイトメト

リーを用いて検討した。今回の低用量曝露により、既に報告されている高用量曝露と同様に、胸腺重量が減少することが確認された。しかし、高用量TCDD曝露によって報告されている double positive 細胞の特異的な減少はみられなかった。一方、胸腺の細胞構成のうち、CD4SP細胞とCD8SP細胞との比率が減少すること、すなわち、SP細胞の分化がCD8側に偏ることが明らかとなり、この過程がTCDDに対して感受性が高いことが示された。また、この投与量で、AhR依存性に発現するCYP1A1が誘導されていることが確認された。しかし、胸腺の萎縮に関係があると最近報告されたp27^{kip1}遺伝子の誘導は、我々の実験系においては観察されなかった。

腸管膜のリンパ節においては胸腺で観察されたCD8側へのT細胞の分化の偏りは検出されず、1.0 µg TCDD/kg 体重ではCD8 T細胞が有意に減少していた。このことから、TCDDによりCD8側に分化したT細胞は、増殖能が低下している可能性が示唆された。

さらに、胸腺から腸管膜リンパ節など末梢へ供給されたrecent thymic emigrant (RTE) の比率が、TCDD投与により有意に減少していることが判明した。RTEは、末梢のT細胞と置き換わりT細胞受容体の多様性の維持に働いていることから、TCDDがRTEを減少させることにより、免疫機能の抑制に働く可能性が示唆された。

(4) 内分泌攪乱作用に基づいたダイオキシンのリスク評価手法の提示

GC-MSによるダイオキシン測定の条件検討を行い、各サブテーマの実験から得られたラット、マウスの標的臓器、脂肪組織、血液中のダイオキシン濃度の測定を行った。この結果は、各サブテーマにおいて得られた毒性影響とつきあわせ、投与量、生体負荷量と影響判定指標 (endpoint) との関係を検討した。

一例をあげると、母体へ800 ng/kg投与した時の胎仔の生体負荷量は胎齢20日で47.6 ng/kgであり、この程度の曝露により胎仔に明らかな影響がでることが判明した。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

K.Nohara, H.Ushio, S.Tsukumo, T.Kobayashi, M.Kijima, C.Tohyama and H.Fujimaki. Alterations of thymocyte development, thymic emigrants and peripheral T cell population in rats exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Toxicology 145: 227-235, 2000.

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

遠山千春, 曾根秀子, 米元純三, ダイオキシンの健康リスク評価. 臨床環境医学

8(2): 51-61, 1999.

石村隆太,大迫誠一郎,遠山千春, 内分泌攪乱物質の健康リスク評価. BIO Clinica15 (2): 43-48,1999.

H.Sone, Does Environmental Hormone Induce Endocrine and Reproductive Disorders in Human Female? Asian Medical Journal 42(11): 487-492,1999.

曾根秀子, 7.化学物質の環境へのリスク4)ダイオキシンと健康リスク.臨床検査 43(11):1383-1389, 1999.

N.R.Jana, S.Sarkar, M.Ishizuka, J.Yonemoto, C.Tohyama, and H.Sone Role of Estradiol Receptor- in Differential Expression of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-Inducible Genes in the RL95-2 and KLE Human Endometrial Cancer Cell Lines. Archives of Biochemistry and Biophysics 368(1): 33-39, 1999.