

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 - 37 - 2001

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  
(特別研究)

Reproductive and Developmental Effects of Hormone-like  
Chemicals in the Environment

平成9～11年度  
FY 1997～1999

NIES



NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

環境省 国立環境研究所

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 - 37 - 2001

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  
(特別研究)

Reproductive and Developmental Effects of Hormone-like  
Chemicals in the Environment

平成9～11年度

FY 1997～1999

NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

環境省 国立環境研究所

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」  
(期間 平成9～11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9年度から11年度にかけて実施した特別研究「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」をとりまとめたものである。

『ホルモン様化学物質』という言葉は耳慣れない言葉かもしれない。この研究計画の提案は平成8年2月であり、その当時は環境ホルモン（内分泌攪乱化学物質）という言葉は用いられていなかった。平成8年3月にアメリカでテオ・コルボーン博士の「Our Stolen Future（邦訳題 奪われし未来）」が出版され欧米でセンセーションを巻き起こした。その後、日本で環境ホルモンが大きな社会問題となったのはご承知の通りである。

我が国では環境ホルモンとダイオキシンとは別の範疇として取り上げられることが多いが、ダイオキシンは性ホルモンだけでなく、他のホルモンや成長因子、サイトカインなどの働きを乱すことが知られており、まさに典型的な内分泌攪乱物質である。この特別研究では『ホルモン様化学物質』としてダイオキシンを取り上げた。それはダイオキシンが典型的な内分泌攪乱化学物質であることに加えて、我が国ではゴミの処分のほとんどを焼却に依存し、大気中へのダイオキシンの放出量が多いこと、日本人は魚食が多いため食事からの摂取量が多く、日本人の曝露が大きいと考えられたからである。また、ダイオキシンの生殖・発生影響に対するほ乳類の感受性が高いため、ダイオキシンのリスク評価において、生殖・発生影響についての基礎的なデータの必要性が高かったからである。

本研究では主にラットを用いて、妊娠期に投与したダイオキシンの仔への影響を、胎盤機能、雄性生殖機能、甲状腺機能、免疫機能を中心に検討し、いくつかの指標については、きわめて低濃度から影響が見られることを示した。同時に組織中のダイオキシン濃度の測定を、高分解能GC/MSを用いて行い、影響と体内負荷量とを関連させた。折しも、この特別研究の期間中に、WHOのダイオキシンの一日耐容摂取量の改訂が行われた。その改訂の根拠とされたのは、動物実験の生殖・発生影響であり、リスク評価には体内負荷量が用いられた。本特別研究において、影響と体内負荷量とを関連させた点はデータとしての価値が高いと考える。

細胞を用いた研究では、ダイオキシンの作用メカニズムの解明、スクリーニング手法の開発に関する研究を行った。また、ダイオキシンのヒトの生殖への影響の観点から、ヒトの試料についてもダイオキシン濃度の測定を行い、病態との関連について検討を加えた。

本特別研究の成果はダイオキシンのリスク評価に資するものと思われる。

終わりに、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13年1月

国立環境研究所

所長 大井 玄

## 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	3
2.1	定量的リスク評価のための環境中のホルモン様化学物質の生殖・発生影響に関する実験的研究	3
2.1.1	胎盤機能への影響	3
2.1.2	オスの仔の生殖機能への影響	5
2.1.3	甲状腺ホルモンへの影響	9
2.1.4	免疫系に及ぼす影響	11
2.1.5	ダイオキシン類の母ラットから仔への移行と蓄積量	14
2.2	TCDDの作用の機作に関する研究	16
2.2.1	TCDDの毒性発現機序におけるプロテインキナーゼの関与	16
2.2.2	CYP誘導のラット系統差	18
2.2.3	妊娠期TCDD投与ラットの仔の脳における ホルモン、ホルモンレセプター、ホルモン代謝酵素への影響	20
2.2.4	卵巣摘出ラットにおけるTCDDとエストロゲンの相互作用	22
2.2.5	ダイオキシンの毒性と分子構造、電子状態の相関	24
2.3	環境中のホルモン様化学物質のスクリーニング手法及び暴露量の推定に関する研究	25
2.3.1	ヒト生殖器官由来の細胞を用いたダイオキシン類のスクリーニング手法の検討	25
2.3.2	ダイオキシンの暴露とそれによる健康影響との関連	29
<b>【資 料】</b>		
I	研究の組織と研究課題の構成	33
1	研究の組織	33
2	研究課題と担当者	33
II	研究成果発表一覧	34
1	誌上発表	34
2	口頭発表	36

# 1 研究の目的と経緯

## 1.1 研究の目的

ここ50年間の急速な化学工業の発展によって、多数の化学物質が環境中に放出され、環境汚染を引き起こしている。とりわけ、脂溶性が高く難分解性の化学物質は食物連鎖を通して生体内に蓄積されている。これらの化学物質の中には、ホルモン様作用を示すものがあり、一括して環境ホルモン様物質\*と呼ばれている。これら物質は、性ホルモンと類似の作用、または性ホルモンの作用を抑制するなどして、正常な性ホルモンの機能を乱すことによりさまざまな生殖影響を引き起こすと考えられている。実際、鳥類の卵のふ化異常、ひなの奇形、は虫類の性器異常、海棲ほ乳類における雌性生殖器障害などの野生生物における生殖影響と、これらの物質との関連が指摘されている。近年、ヒトにおいても、女性の乳がん、不妊の原因の一つとされる子宮内膜症の増加や、男性の精子数の減少、睾丸腫瘍の増加が報告され、これらの現象と環境中のホルモン様化学物質との関連が疑われている。これらの化学物質への曝露は、主に汚染された食物の経口的摂取による。ダイオキシン類を例にとると、日本人の1日摂取量は175 pg TEQ (毒性等価量)/dayで、体重を60 kgとして約3 pg/kg/dayとなり、これはTDI (1日耐容摂取量)とされた4 pg/kg/dayの約75%となる。一方、母乳を飲んでいる乳児の場合、1日摂取量は50~100 pg/kg/dayとなり、実にTDIの12.5~25倍量を摂取していることになる。成人の場合はTDIにかなり近い曝露を、乳児の場合はTDIをはるかに超えた曝露を受けているが、これらの曝露の生殖機能への影響のリスクに関する研究はわずかしか行われておらず、この分野での基礎的実験データは決定的に不足している。環境基本計画に示されたように、環境を汚染し、ヒトの健康や生態系への有害な影響を及ぼすおそれのある化学物質の環境リスクの評価は、環境リスク対策の重要な柱である。

最近、海棲ほ乳類を多食する高緯度地方の人々の男の子どもの性器の発育不全、出生時身長と、母乳中の有機塩素化合物の濃度との間の負の相関が認められた。また、同時に免疫系にも変化がみられた。このように野生生物にみられた生殖・発生影響が、環境汚染により高濃度曝露を受けているヒトの集団でも現実のものとなりつ

つある。特に周産期における曝露は、器官や機能の形成される時期だけに影響は不可逆になる可能性が高く、また、感受性も高い。環境中のホルモン様化学物質の子への影響、とりわけ生殖能力への影響は人類の存続にかかわる問題であり、これらの影響のリスク評価は、重要かつ緊急に対処すべき課題であると考えられる。

国連の欧州経済委員会では1996年に行われた加盟国会議で、難分解性の有機化合物(主にPCB, ダイオキシンなどの有機塩素化合物)の地球規模の使用規制の検討に入ったが、その背景にはこれらの物質のヒトへの生殖影響の疑い(精子数の減少, 発ガンの増加)が大きな要因となっている。

本研究では、環境中のホルモン様化学物質の生殖・発生影響のリスク評価のための基礎的データを得ることを目的とした。

\* この特別研究の提案した時点(1996年2月)では、内分泌攪乱化学物質という言葉は使われておらず、ホルモンと類似の作用をする化学物質という意味でホルモン様化学物質、環境中に存在するホルモン様化学物質という意味で、環境ホルモン様物質という言葉を用いた。

## 1.2 研究の構成

本研究は以下の2課題に沿って実施された。ホルモン様化学物質として、最近、ゴミ焼却場周辺の汚染、母乳汚染などで問題となっているダイオキシンをとりあげ、そのプロトタイプである2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)を実験に用いた。

課題1 定量的リスク評価のための環境中のホルモン様化学物質の生殖・発生影響に関する実験的研究

① TCDDの生殖・発生に及ぼす影響

② TCDDの作用の機作に関する研究

課題2 環境中のホルモン様化学物質のスクリーニング手法及び曝露量の推定に関する研究

①スクリーニング手法の検討

②ダイオキシンの曝露とそれによる健康影響

課題1では、① TCDDの生殖・発生に及ぼす影響として、ラットを用いて、TCDDの妊娠期曝露による、(a)

胎盤機能への影響 (b) 仔の雄性生殖機能への影響 (c) 甲状腺ホルモンへの影響 (d) 免疫系への影響を検討した。さらに (e) 用量-反応関係、母親から仔への移行動態を明らかにするために TCDD 投与動物、出生仔のダイオキシン濃度を測定した。また、② TCDD の作用の機作に関する研究として、(a) TCDD の毒性発現機序におけるプロテインキナーゼの関与 (b) 妊娠期 TCDD 投与ラットの仔の脳におけるホルモン、ホルモンレセプター、ホルモン代謝酵素への影響 (c) 卵巣摘出ラットにおける

TCDD とエストロゲンの相互作用 (d) ダイオキシンの毒性と分子構造・電子状態の相関に関する研究を行った。

課題 2 では、①スクリーニング手法検討の一環として、生殖器官由来の細胞株における TCDD と性ホルモンとの相互作用を検討した。また、②ダイオキシンの暴露とそれによる健康影響との関連を検討するために、大学の産婦人科と協力し、子宮内膜症患者の脂肪組織、乏精子症患者の血中のダイオキシン濃度を測定し、症状の程度との関連を検討した。

## 2 研究の成果

### 2.1 定量的リスク評価のための環境中のホルモン様化学物質の生殖・発生影響に関する実験的研究

妊娠15日のホルツマンラットに、12.5, 50, 200, 800, 1600 (胎盤への影響のみ) ng/kg 体重の TCDD を経口一回投与した。胎盤への影響については妊娠16日, 20日に、その他の影響については生後, 21, 49, 63, 120日に解剖して、妊娠期 TCDD 投与の胎盤, 仔への影響を検討した。

#### 2.1.1 胎盤機能への影響—胎仔の子宮内死と胎盤のグリコーゲン量の変化について—

TCDD は、成熟個体において体重の減少等の影響を引き起こすなど、代謝調節を異常にする毒性効果が知られている。子宮内で发育する胎仔は、ダイオキシン類を含めた環境中の有害物質にとりわけ感受性が高く、母体には影響を及ぼさない用量において、子宮内死や流産などに至ることが知られている。これまで、TCDD の胎仔への影響は、マウスにおいて口蓋裂や水腎症をおこすことが知られており、これらの器官の培養系に投与を行う実験等を通して、胎仔への直接影響が集中的に行われてきた。しかし、これら催奇形性等の局所的な作用では胎仔の死亡や流産の機構は説明できず、その意味において TCDD による胎仔死亡の発現機序は未解明である。

胎盤は、主に胎仔由来の栄養膜細胞から構成されており、広義の意味において「胎仔の臓器」である。胎盤は、胎仔の发育に不可欠なさまざまな機能を有している。その一つとして、代謝機能がある。母子双方の血液は栄養膜細胞によって隔たれており、選択的な栄養物質の供給や老廃物の廃棄等が行われている。胎盤の栄養供給や代謝調節が異常になると、胎仔の发育不全や死亡を引き起こすことが知られている。

TCDD を含めた環境中に存在する極微量の有害物質は、胎盤というバリアでまず防御されるため、多くの場合、胎盤機能の変調は胎仔影響に先行すると考えられる。しかし、TCDD による胎盤への影響についてはほとんど知られていない。本研究では、妊娠ホルツマンラットに TCDD を投与し、胎盤の組織レベルで観察を行い、胎仔の发育異常との関連性について考察した。

妊娠15日目に体重当たり 800 ng/kg, 1600 ng/kg の

TCDD および溶媒のみ (対照群) を一回経口投与したホルツマンラットを妊娠16日目および妊娠20日目に解剖した。

ラットは、妊娠10日付近で母体当たり数匹の胎仔の死亡が起き吸収され、妊娠後期には確認が困難になるほど小さくなる。本研究では、TCDD を15日目に投与しているため、妊娠初期の死亡胎仔の数は計測から除外した。

#### (1) 妊娠後期の胎仔の死亡について

TCDD 投与ラットでは、妊娠20日 (妊娠後期) の胎仔の死亡が投与量依存的に観察された (対照群, 800 ng/kg, 1600 ng/kg 投与群においてそれぞれ0%, 2%および12%)。これらの胎仔の死亡は、妊娠16日目では確認されなかった。

1600 ng/kg 投与群では子宮内死を示す母体と示さない母体が存在し、各胎仔間での感受性の違いがある可能性が考えられた。そこで RT-PCR 法により妊娠20日目の胎盤でのチトクロム P 450 1 A 1 (CYP 1 A 1) の発現を調べた。CYP 1 A 1 は、TCDD によって発現が誘導される遺伝子として良く知られている。各投与群から3匹の母体を選び、各母体から2個の胎盤を無作為に選んだ。特に1600 ng/kg 投与群では、1匹, 4匹, 0匹の胎仔死亡を示す母体を選んだ。図1に示すようにどの投与群においても CYP 1 A 1 の発現量には差がなく、各母体間および各胎仔間における胎盤への TCDD の影響はほぼ同様の効果を示していることが明らかとなった。

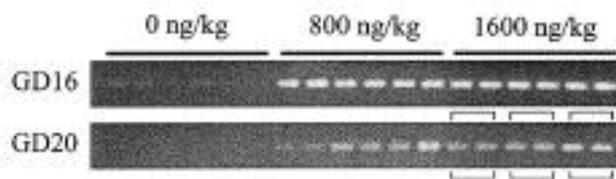


図1 胎盤における CYP1A1 mRNA の発現

妊娠16日目および20日目の胎盤から、mRNAを抽出し、RT-PCR法によりCYP1A1の発現量を解析した。3匹の母体を選び、各母体からは2個の胎盤を無作為に選択した。妊娠20日目の1600ng/kgの投与群は、左からそれぞれ0匹, 4匹, 1匹の胎仔の死亡がみられた動物であるが、CYP1A1の発現量に差は認められなかった。

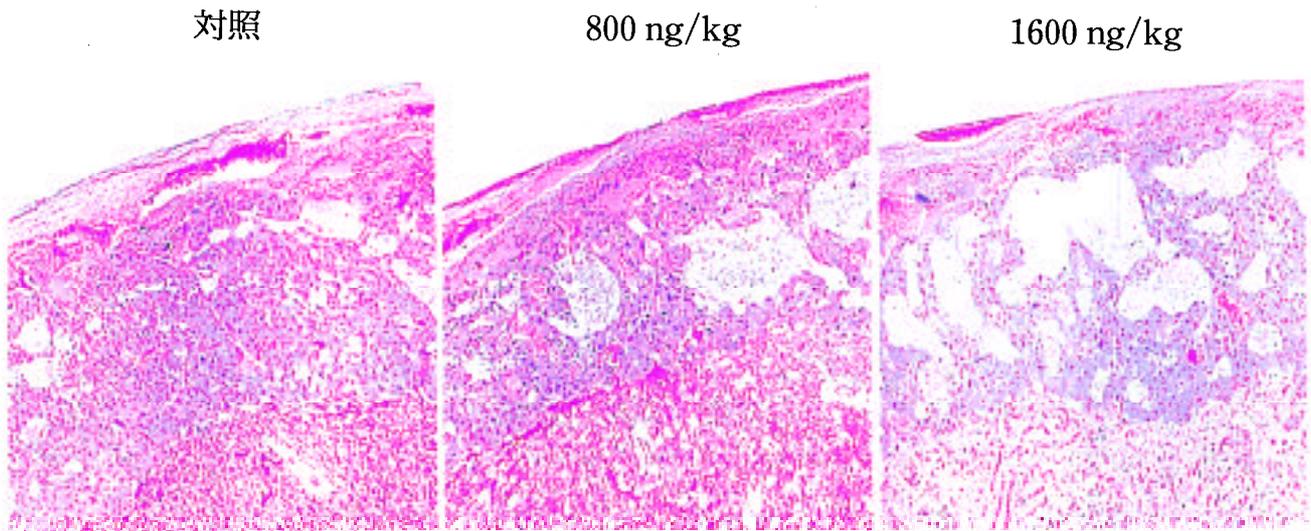


図2 妊娠20日目の胎盤組織へのTCDDの影響  
妊娠20日目のTCDD投与群の胎盤において組織変化が観察された。グリコーゲン細胞と間質液で満たされた空胞部位が投与群で増加していた。太線は500 $\mu$ mを示す。

#### (2) 胎仔と胎盤の重量変化について

胎仔および胎盤の重量は、対照群と投与群では有意な差は認められなかった。TCDDはオスの胎仔のみの胎盤重量を増加させるという報告があるが、雌雄にわけて計測しても有意差は見られなかった。

#### (3) 組織レベルでの変化について

重量において変化は認められなかったが、組織レベルにおいて明らかな変化が認められた。ラット胎盤は、構成する細胞の種類から迷路部と結合部に分けることができ、結合部は、栄養膜巨細胞、海綿状栄養膜細胞、グリコーゲン細胞からなる。対照群の胎盤では、グリコーゲン細胞は、妊娠16日には大部分を占めており、妊娠20日目には退行してわずかなグリコーゲン細胞しか認められない。しかし、800 ng/kg および 1600 ng/kg TCDD 投与群の妊娠20日目の胎盤結合部では、対照群に比べグリコーゲン細胞及び間質液に満たされた空胞部の増大が観察された(図2)。これらグリコーゲン細胞および間質液に満たされた空胞部を画像解析を用いて定量を行ったところ、対照群に比べ投与群では有意に上昇していることが示された。

#### (4) 胎盤のグリコーゲン量について

対照群および投与群の妊娠20日目における胎盤グリコーゲン量の定量を行った(図3)。対照群では、胎盤当たり202.4 $\pm$ 25.8  $\mu$ g/gのグリコーゲン量であった。し

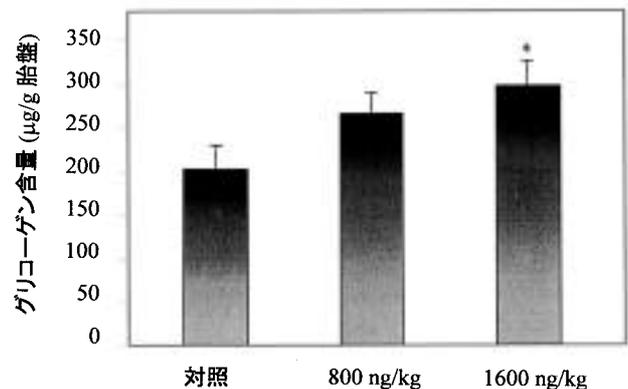


図3 妊娠20日目の胎盤におけるグリコーゲンの単位重量当たりの含量  
値は平均値 $\pm$ 標準誤差 (\*P<0.05)。

かし、800 ng/kgの投与群では264.0 $\pm$ 25.7  $\mu$ g/g、1600 ng/kgの投与群では296.8 $\pm$ 28.5  $\mu$ g/gのグリコーゲン量であり、対照群に比べTCDD投与群ではグリコーゲン量の増加傾向が見られ、組織レベルの変化と一致した見解が得られた。

ホルツマンラットの妊娠10日目にTCDDを投与したところ妊娠後期に胎仔死亡数が増加することが報告されており、また、交尾前に慢性的にTCDDを暴露したSDラットにおいて妊娠後期に胎仔の死亡がおきたことが報告されている。妊娠16日目に死亡が観察されなかったことを合わせて考えると、本実験での胎仔の死亡は、GD15に投与したTCDDの一過性の急性毒性によるものではないと考えられる。このことは、胎盤の組織変化

についてもいえる。我々は、妊娠前に TCDD を投与した SD ラットにおいて、同様に胎盤のグリコーゲン細胞の増加を認めている。

本研究では、TCDD が子宮内の胎仔の死亡を引き起こす用量において、胎盤のグリコーゲン細胞の組織変化をおこすという新しい知見を得ることができた。胎盤のグリコーゲン量が対照群に比べ TCDD 投与群において上昇していることから、TCDD 投与群での組織レベルでの変化はグリコーゲンの貯蓄量の変化を反映していると考えられる。これらの組織レベルでの変化は、生存している胎仔の胎盤において観察されたこと、また、800 ng/kg 投与群でも観察されたことから、グリコーゲンの代謝異常が直接胎仔の子宮内死に直結することにはならない。しかし、グリコーゲンの蓄積および組織レベルでの変化は、ダイオキシンによる胎仔の子宮内死に先行する指標となりうると考えられた。

胎盤におけるグリコーゲン細胞の役割は不明である。しかし、妊娠ラット母体にストレプトゾトシンを投与して作成された糖尿病ラットでは、胎盤グリコーゲンレベルの上昇およびグリコーゲン細胞の増加が起きることが知られている。また、胎仔の発育不全を起こす母体へのアルコールの投与は、胎盤のグルコース輸送能を低下させることが知られている。また、組織レベルでもグリコーゲン細胞の退行変化が起きることが知られている。これらのことは、グリコーゲン細胞が胎仔への栄養物質輸送と密接に関連しており、異常を来した場合には容易に組織レベルでの変化を引き起こすことを示唆している。TCDD が成熟個体の肝臓においてグルコース代謝の異常を起こすことや、グルコーストランスポーターの活性を低下させることが知られており、胎盤においてこれらの活性に変化が起きている可能性が考えられる。

### 2.1.2 オスの仔の生殖機能への影響

妊娠 15 日目に TCDD を投与されたラットから生まれたオスの仔の生殖影響を、生後 49 日目（性成熟期）、生後 63 日目（性成熟完了期）、生後 120 日目（成熟期）で観察した。下記のオスの生殖器官の影響指標はいままで報告されている TCDD の影響の他の指標の中でも、最も低用量で変化の現れるものとして、健康リスクアセスメントという観点から極めて重要である。用いた用量は 12.5, 50, 200, 800 ng/kg 体重である。

### (1) 精巣重量および一日精子産生数への影響

妊娠 15 日のラットへの経口一回投与で、仔の精巣重量が減少するという報告があるが、我々の実験では生後 49 日、63 日、120 日ともに精巣重量に TCDD 投与による変化は見られなかった（図 4 A）。一日精子産生数にも影響は見られなかった（図 4 B）。なお一日精子産生数は精巣をホモジナイズし、観察される伸長型精子細胞（ほぼ精子に近い）の数を血球計測盤でカウントし、精巣一個分の数とした後、その観測される精子細胞が精巣外にすべて出るまでに要するとされる 6.2 日で割った値であり、極めて信頼度の高い精子発生に関する指標である。また、組織学的に精巣内の変化を観察したが、TCDD による変化は確認できなかった。この結果から、低濃度の TCDD は精巣発達および精子発生に対してあまり影響を与えないことがわかった。これは従来の報告と異なるものである。

### (2) 精巣上体重量および精巣上体精子数への影響

精巣から出た精子は射精前に精巣上体という貯蔵部位にいったん蓄えられるが、ここで受精に必要な変化が起きて成熟すると言われている。この精巣上体も TCDD の妊娠 15 日の経口一回投与により重量が減少するとされているが、生後 49 日、63 日、120 日ともに精巣上体重量に TCDD 投与による変化は見られなかった。また、精巣上体内にある精子数にも影響は見られなかった。精巣上体に関しては精巣より TCDD による影響が見られる器官であるとされるが、これも従来の報告と異なるものであった。

### (3) 副生殖器官重量への影響

オスの副生殖器官として尿道の基部すなわち膀胱周辺に散在する前立腺と精嚢腺がある。これらの器官は射精時に多量の分泌物を精液に付加する外分泌腺で、受精の効率を調整するとされているが、明らかな役割は解明されていない。我々は、まず膀胱内の尿を除去し、尿道基部を切断して下腹部から取り出すことで、尿生殖器複合体としてその重量を測定した。その結果、生後 120 日で用量依存的減少傾向が確認され、200 と 800 ng/kg 用量で統計学的に有意差が生じていた。また、この尿生殖器複合体から腹側前立腺を切り取り重量を測定した。図 5 に示すように、これも生後 49 日および生後 120 日ともに用量依存的に減少していることがわかった。有意差の確

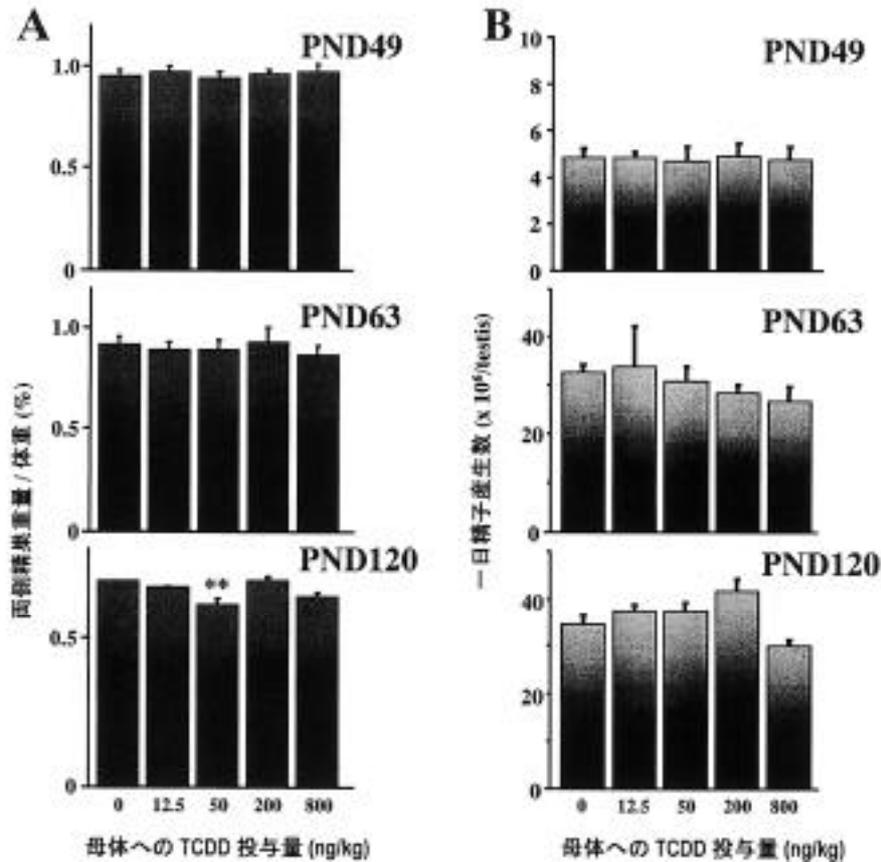


図4 妊娠期 TCDD 暴露によるオスの仔の精巣重量 (A) および一日精子産生数の変化 (B) 値は平均値±標準誤差 (\*\*p<0.01)

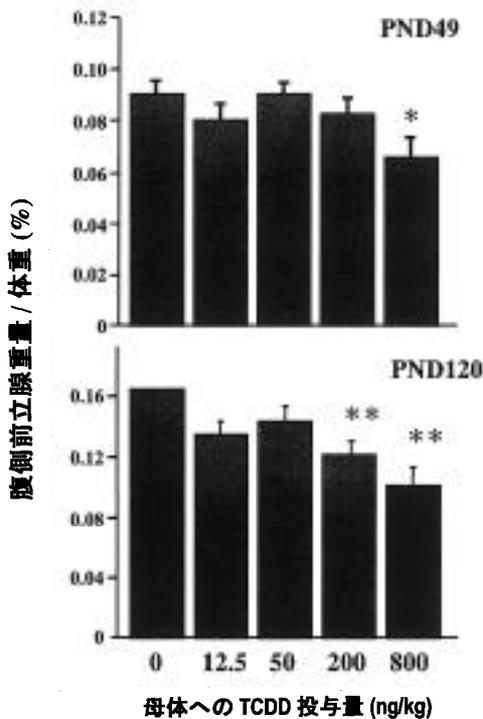


図5 妊娠期 TCDD 暴露によるオスの仔の腹側前立腺重量の変化 値は平均値±標準誤差 (\*p<0.05, \*\*p<0.01)

認できたのは生後 49 日で 800 ng/kg 投与群, 生後 120 日では 200 ng/kg と 800 ng/kg 投与群であった。この結果に関しては, 従来の報告を支持するものである。

#### (4) 肛門生殖突起間距離への影響

肛門生殖突起間距離 (Anogenital distance) とは, 肛門の頭側部から生殖隆起 (ペニスとして腹壁から飛び出た部分) の付け根までの距離のことで, 簡単に言うとペニスの長さと言っていい。この距離が短くなればなるほどよりオスとしての特徴がなくなり, メス化していることを示している。この指標も生後 49 日, 生後 63 日, 生後 120 日ともに用量依存的減少傾向を示した (図 6)。また, 生後間もない生後 2 日においても測定したが, これも明らかな用量依存的減少傾向を示していた。これも従来の報告を支持する結果である。

#### (5) 腹側前立腺内の遺伝子発現に対する影響

次に, このような TCDD の雄性生殖機能への影響が, どのようなメカニズムで生じたのか, 遺伝子レベルで解

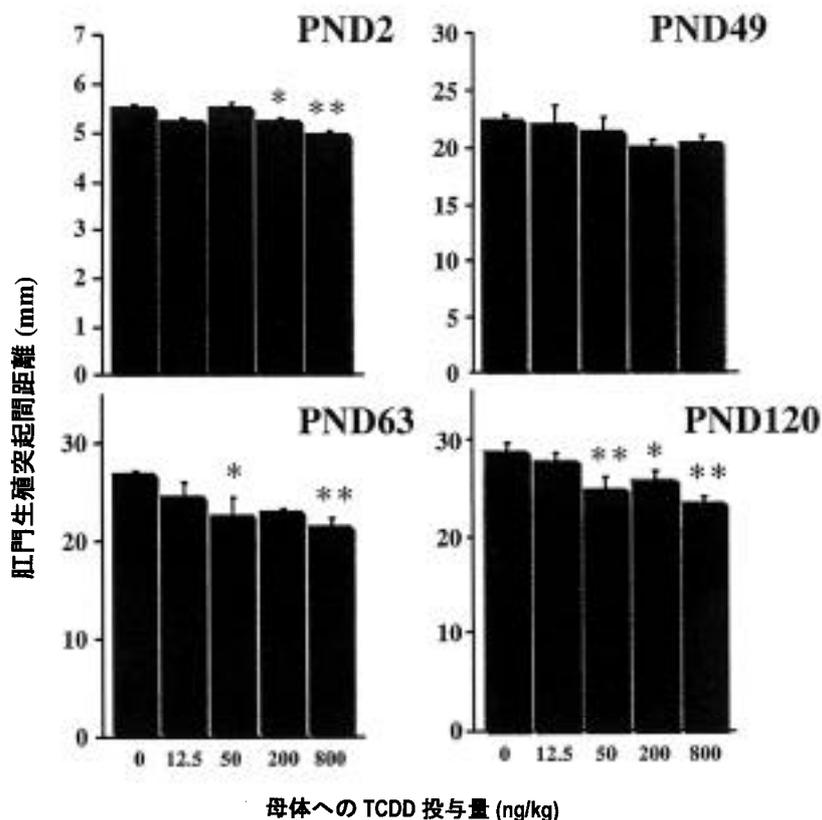


図6 妊娠期 TCDD 暴露によるオスの仔の肛門生殖突起間距離の変化  
値は平均値±標準誤差 (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

析するために、ここまで述べてきたいろいろな指標の中でも最も影響の著しかった、腹側前立腺を用いて以下の2種類の遺伝子の発現を、RT-PCR法を用いて解析した。この方法は目的の遺伝子から発現した mRNA を PCR によって増幅して解析するため、元々の絶対量は計測できないが、投与群と非投与群の間でその遺伝子の発現にどのくらいの差があるのか測定できる。

#### 1) 5 $\alpha$ -還元酵素遺伝子の発現の増加

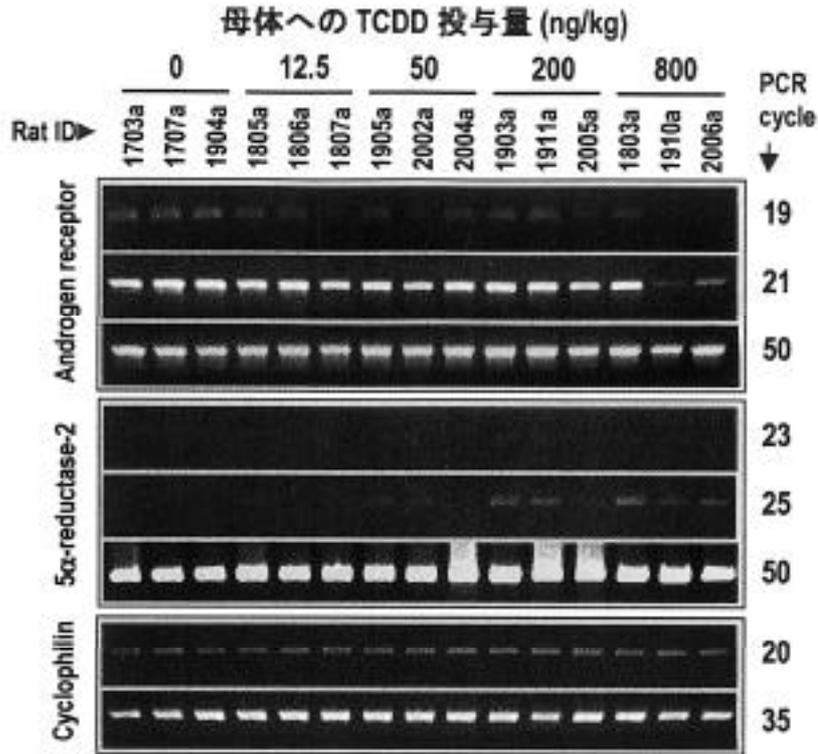
5 $\alpha$ -還元酵素は精巣で産生されるテストステロンをさらに活性の高い雄性ホルモン(アンドロゲン)である5 $\alpha$ -ジヒドロテストステロンに変換し、アンドロゲンの作用をさらに強いものとすることが知られている。前立腺以外にも影響が見られた肛門生殖突起間距離など外部生殖器官の発達には欠かすことのできない酵素で、この酵素を阻害すると前立腺やペニスの発達は抑えられる。この酵素には現在まで、2つの遺伝子(タイプ1とタイプ2)があることがヒト、マウス、ラットその他の動物で知られている。また、前立腺では主に5 $\alpha$ -還元酵素タイプ2が発現しており、前立腺の発達に重要であることが知られている。そこで、5 $\alpha$ -還元酵素タイプ2の

半定量的 RT-PCR を、生後49日と生後120日の腹側前立腺サンプルから抽出したトータル RNA を用いて行ったところ、TCDDの暴露量が多くなるほど増加することがわかった(図7A)。予想としては、前立腺の発達が抑えられたわけであるから、用量依存的に減少するかと思われたが、これは予想に反した結果であった。実際に前立腺内の5 $\alpha$ -ジヒドロテストステロン量は測定していないが、ウイスコンシン大学のピーターソンらの報告では、5 $\alpha$ -ジヒドロテストステロン量に変化は検出されていない。また、生後120日では5 $\alpha$ -還元酵素タイプ2遺伝子の発現に対照群との差はなかった。

#### 2) アンドロゲン受容体遺伝子の発現の減少

上記のように、前立腺の発達を促進する遺伝子には逆に増加傾向が見られたことから、他のアンドロゲン感受性に関する遺伝子の検索を試みることにした。それがアンドロゲン受容体(AR)である。しかしながら、アメリカ環境保護局の研究グループがすでに同一の実験方法で、ARに関してはその受容体数を結合試験により報告している。それによれば、TCDDの投与によりオスの仔の前立腺内のAR数に変動はないとしている。しかし、

**A**



**B**

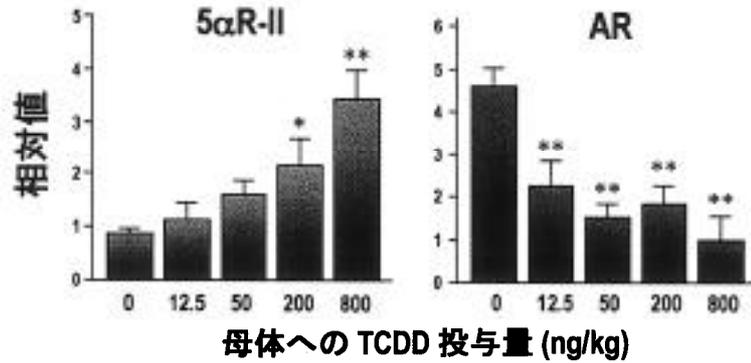


図7 妊娠期 TCDD 暴露によるオスの仔の腹側前立腺内の 5 $\alpha$ -還元酵素遺伝子とアンドロゲン受容体遺伝子の発現変化  
 値は平均値 $\pm$ 標準誤差 (\*p<0.05, \*\*p<0.01)

今回の我々の解析では、生後 49 日で TCDD の用量依存的に ARmRNA の相対量が減少することが明らかとなった(図 7B)。一方、生後 120 日では有意な差はなかった。AR は正常個体では前立腺重量の小さい性成熟期には成熟期より発現が高い。これは精巣から産生されるテストステロンの上昇による抑制効果とされるが、胎仔期 TCDD 暴露によるアンドロゲン値の変動はない。したがって、今回観察された AR の用量依存的減少はホルモンレベルの変動によるものではなく、胎仔期 TCDD 暴露による直接影響であると考えられる。

今まで海外の多くの研究機関で同一の実験方法で、上

記 (1) ~ (4) までの観察が行われ報告されているが、精巣への影響に関してどのレベルで影響が見られるか、一定の見解が得られていない。今回の我々の観察で改めて精巣に対する低用量影響は小さいことが証明された。しかし、男性ホルモン感受性の器官である前立腺やペニスといった外生殖器官は、今までの報告通り低用量域でも影響を受けることが示された。我々の観察では肛門生殖突起間距離で 50 ng/kg という低用量でも統計学的に有意な影響が見られており、これは初めての報告である。また、新たに行った前立腺の 5 $\alpha$ -還元酵素遺伝子と AR 遺伝子の解析でも低用量から影響が観察された。特

に AR の思春期における発現の減少が、前立腺の発達の阻害をもたらしたと推測された。

### 2.1.3 甲状腺ホルモンへの影響

ダイオキシン類は発ガン性、生殖毒性、免疫毒性を有することが知られているが、ヒトにおける低濃度暴露の影響としては、母乳で育児されている乳児における甲状腺ホルモンの低下が、我が国およびオランダなどで報告されている。ダイオキシン類の甲状腺ホルモンへの影響はヒトにおける鋭敏な影響の一つと考えられる。また、周産期における甲状腺ホルモンは脳の発生・分化に重要な役割を果たしており、このホルモンの欠如や過剰が発生段階で起きると不可逆的な中枢神経系への影響が生じることから、ダイオキシン類の甲状腺ホルモンへの影響はヒトへの健康影響の中でも重要と考えられる。

PCBs やダイオキシン類は甲状腺ホルモンと構造が類似しているため、その代謝に比較的低用量で影響を及ぼす。しかしながら、甲状腺に関しては PCB とダイオキシンでは作用にいくらかの違いがある。PCB は中枢神経系に甲状腺ホルモンを運搬するタンパクであるトランスサイレチン (TTR) に結合してサイロキシン (T4) 濃度の低下を起こす。TCDD によっても血中 T4 が低下するが、これは肝の薬物代謝酵素の誘導により、T4 のグルクロン酸抱合が増加し、その結果、胆汁への排泄が亢進する結果である。

このような背景を踏まえて、本研究はラットを用いて、妊娠中および授乳中の低用量 TCDD 暴露が仔の甲状腺機能へ及ぼす影響とその作用機序について検討を行った。

#### (1) TCDD による肝ミクロゾーム酵素の誘導

ダイオキシンはアрилハイドロカーボンレセプター (AhR) と結合したのち、チトクロム P 4501 A 1 (CYP 1 A 1) や UDP-glucuronosyltransferase-1 (UGT-1) を誘導し、毒性を発現する。肝臓のミクロゾーム酵素の UGT-1 は甲状腺ホルモンの分解に重要な役割をする。T4 はグルクロン酸抱合により、T3 は硫酸抱合により胆汁中に排泄される。そこで今回、妊娠 15 日目のラットに TCDD の一回経口投与を行い、生後 21 日齢および 49 日齢の仔ラットの肝における CYP 1 A 1 および UGT-1 遺伝子の発現量の変化を RT-PCR 法により半定量的に調べた。21 日齢の雌雄ラットの肝で CYP 1 A 1 および

UGT-1 遺伝子の有意な発現誘導が 200 ng/kg 投与群から認められ、その量は TCDD 投与量に依存していた。49 日齢ラットでは CYP 1 A 1 遺伝子の有意な誘導が認められたが、UGT-1 遺伝子は対照群のレベルであった (図 8)。結果は妊娠ラットへの TCDD 一回経口投与が、T4 のグルクロン酸抱合による胆汁中への排泄を亢進することを示唆した。本実験の TCDD 分析結果によると肝 1g 当たりの TCDD 量は 21 日齢仔ラットで最も高い値を示し、離乳後の 49 日齢ラットではその量の 1/50 に低下していた。49 日齢ラットで UGT-1 遺伝子誘導への影響が見られなかったことは、肝の TCDD 量が激減したことによるものと考えられた。

#### (2) TCDD による甲状腺ホルモンへの影響

妊娠 15 日目のラットに TCDD の一回経口投与を行い、生後 21 日齢および 49 日齢の仔ラット血清中の甲状腺ホルモン (Thyroxine, T4 と Triiodothyronine, T3) をラジオイムノアッセイ (RIA) 法で測定した。その結果 21 日齢の雌雄ラットとともに T4 の有意な低下が、TCDD 投与量 200 ng/kg から認められ、800 ng/kg では対照群の 1/2 値に低下していた。T4 値の低下は TCDD 投与量に依存して認められた。49 日齢ラットでは TCDD 投与群の T4 値は対照群との差は見られなかった。血清 T3 値は 21 日齢で 800 ng/kg 投与群のメスラットで有意に高い値が認められたが、49 日齢では有意差は認められなかった (図 9)。

ラットは胎生学的に受胎後 15 日目頃が、胎児の器官の形成が終了する頃に当たり、視床下部・下垂体および精巣ホルモン等の内分泌器官が機能的に完成される時期である。この時期に妊娠ラットに TCDD を暴露すると仔ラットは胎盤および出生後は母乳を介して TCDD に暴露される。その結果、離乳時の 21 日齢ラットで T4 の低下が見られ、49 日齢では T4 の低下を伴わない組織学的に甲状腺過形成が認められた。このことから、妊娠時の TCDD 一回暴露 (800 ng/kg) が仔の甲状腺機能に不可逆的な影響を与えることが明らかとなった。21 日齢では、図 8 に示したように肝 UGT-1 mRNA の有意な誘導が認められた。T4 の低下は、UGT-1 による T4 のグルクロン酸抱合が促進し、胆汁への排泄が亢進することによるものと考えられる。T3 の低下が起らなかったことは、T3 は硫酸抱合により排泄されることによるものと思われる。49 日齢ラットで T4 の低下が認められないの

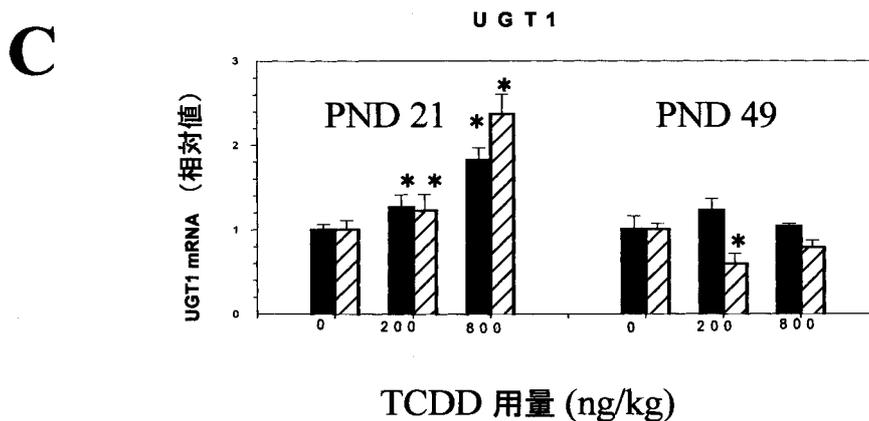
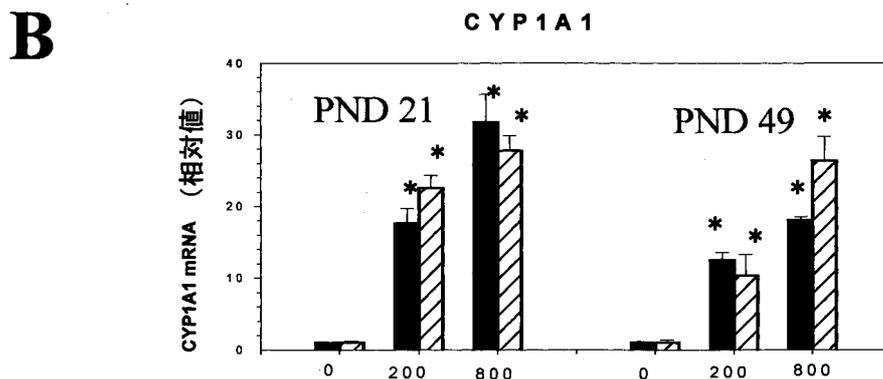
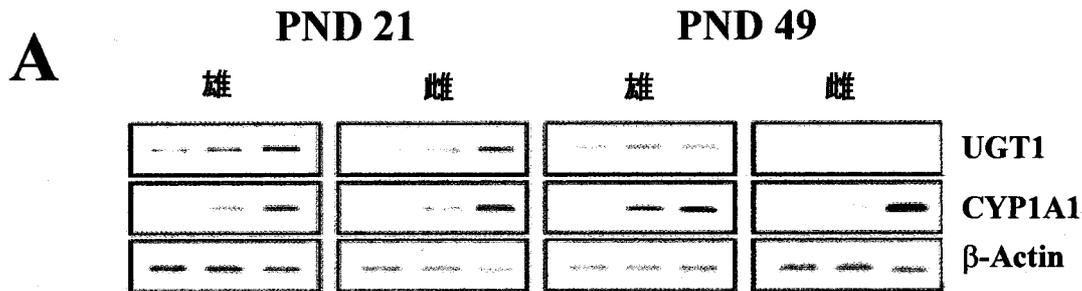


図8 妊娠中および授乳中の低用量 TCDD 暴露が仔ラット肝ミクロゾーム酵素遺伝子発現に与える影響  
 (A) UGT1 および CYP1A1 の RT-PCR 産物。  
 (B) 21日齢および49日齢における CYP1A1 mRNA の発現量。  
 (C) 21日齢および49日齢における UGT1 mRNA の発現量。  
 値は平均値±標準誤差 (\* $p < 0.05$ )

は、2つの要因が考えられる。一つは先に生じた血清 T4 レベルの低下により、ネガティブフィードバック機構により下垂体前葉の TSH の分泌が促進し、T4 分泌が盛んになるため、第二の要因は、肝の TCDD 蓄積量が激減することにより (1/50)、UGT-1 の誘導がなくなり、T4 の排泄が低下するためと考えられる。

T4 は胎盤を通過するので、母体の甲状腺機能低下症は仔の成長と発育に影響を及ぼす。甲状腺ホルモンの作用を最も強く受ける中枢神経部位は大腦皮質と大腦基底

核であるが、蝸牛も影響を受ける。したがって発育過程における甲状腺ホルモンの欠乏は、仔の知能の発育遅延、運動の硬直やろうあ（聾啞）を引き起こす。胎児期の脳の甲状腺ホルモンはトリヨードサイロキシン (T3) ではなくサイロキシン (T4) に由来するので、脳の発生過程における T4 の減少は脳の障害を引き起こすと考えられる。このように、ダイオキシン類は甲状腺ホルモンの代謝への影響を介して中枢神経系の発達へ影響を及ぼす可能性がある。

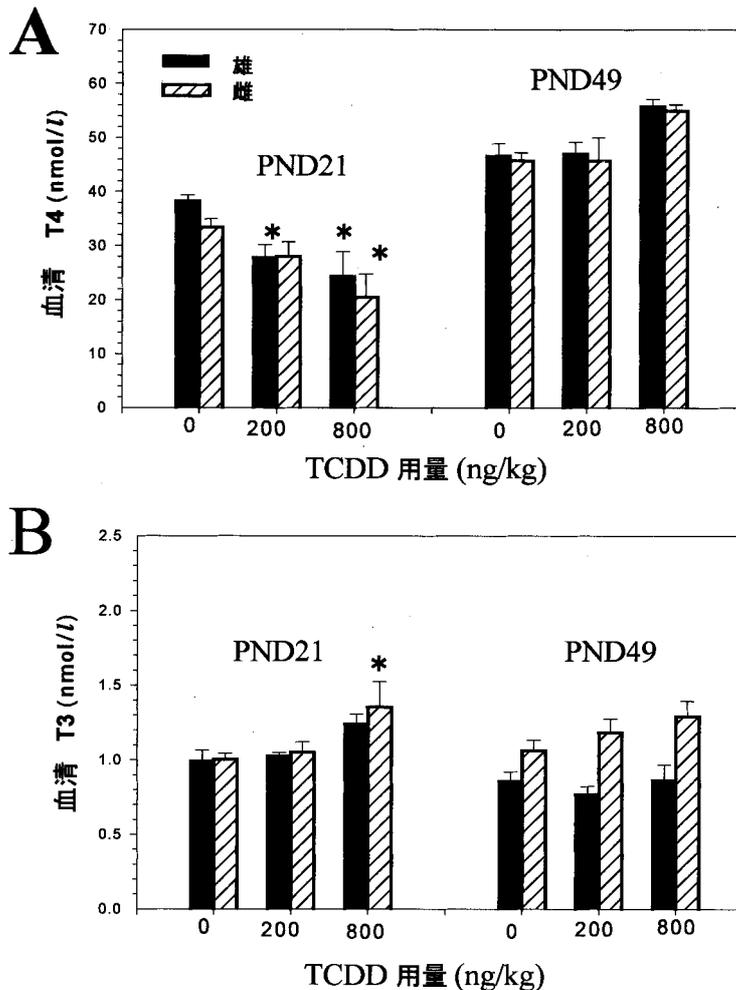


図9 妊娠中および授乳中の低用量 TCDD 暴露が仔ラット甲状腺ホルモンに及ぼす影響  
 (A) 21日齢および49日齢における血清 T4 濃度。  
 (B) 21日齢および49日齢における血清 T3 濃度。  
 値は平均値±標準誤差 (\* $p < 0.05$ )

### (3) TCDD により発生した甲状腺肥大

妊娠 15 日目のラットに TCDD を一回経口投与を行った場合、800 ng/kg 投与群の生後 49 日齢ラットで甲状腺肥大が認められた(図 10)。甲状腺全体がコロイドに乏しい小型のろ胞となり、上皮は立方ないし円柱状を呈し、核もやや大きい。ろ胞上皮の局所的な乳頭状増殖が散見され、ろ胞の形がやや不規則になる。さらに小葉間結合組織の繊維化が認められる。

血清 T 4 値の低下は下垂体からの TSH の分泌を促進し、TSH の刺激によりろ胞上皮細胞は高さを増しコロイドの吸収能が増す。さらに TSH の刺激が長期間持続すると、甲状腺ろ胞上皮はさらに高円柱状となり、ろ胞内腔はコロイドの吸収が増加してろ胞内腔が狭くなりついにはコロイドが消失する。すなわち胎児期および授乳期においては成熟ラットと比較して著しく低い TCDD

暴露量で、T 4 値の低下に続き、仔の甲状腺ろ胞細胞の肥大と過形成を引き起こし、不可逆的な影響を及ぼすことが判明した。

胎児期及び授乳期に比較的低用量 (200~800 ng/kg) のダイオキシンを一回投与した場合の仔の甲状腺機能への影響を評価するため、肝ミクロゾーム酵素の誘導、ホルモン代謝の動態、病理組織学的検査を行った。生まれた仔に T 4 レベルの低下に続く甲状腺細胞の肥大、過形成が認められた。経胎盤 TCDD 暴露で仔に影響が現れる最低用量-LOAEL (Lowest-Observed-Adverse-Effect-Level) は 200 ng/kg であることが示唆された。

#### 2.1.4 免疫系に及ぼす影響

免疫系は内分泌系と相互に密接な関連をもち、発生過程や生殖機能にも関与することが報告されている。そこ

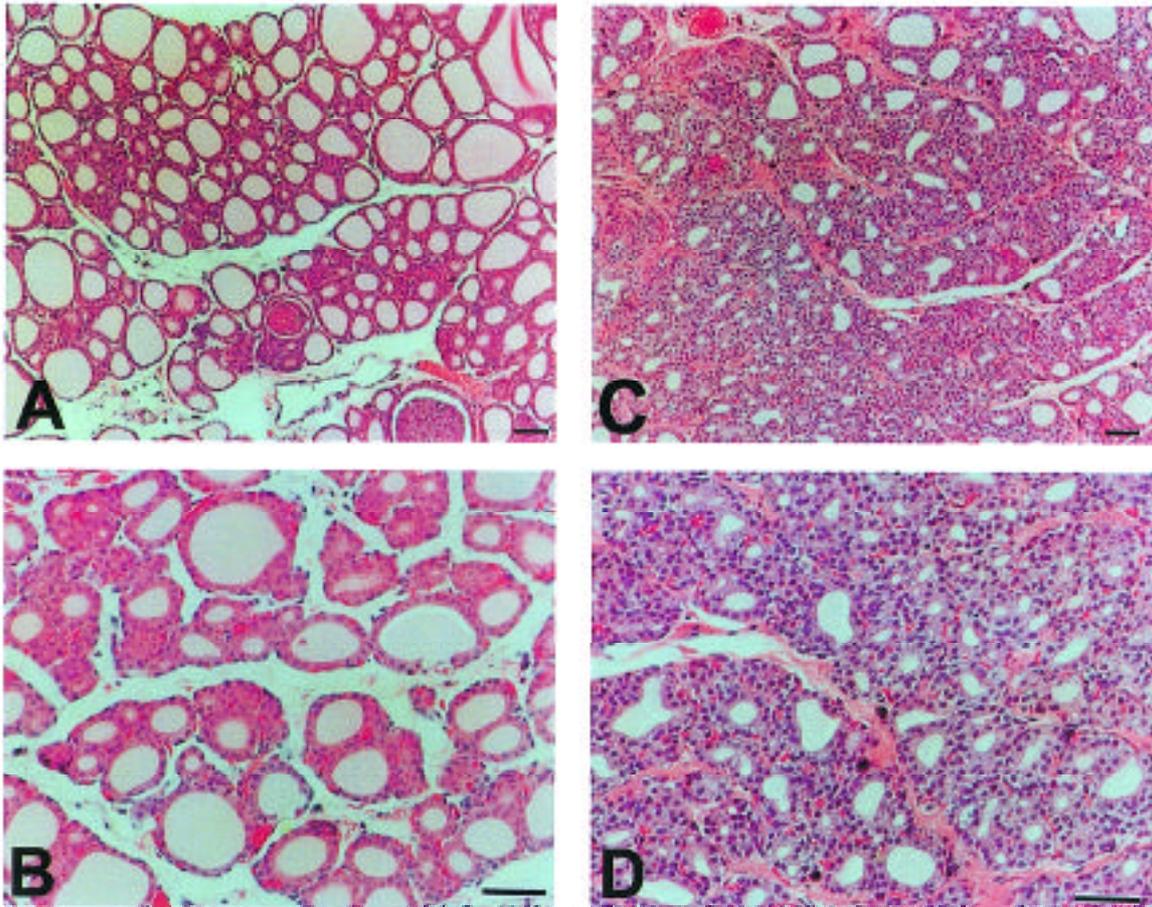


図10 妊娠中および授乳中の低用量 TCDD 暴露により仔ラットに発症した甲状腺過形成  
 対照ラット (49日齢) の甲状腺 (A および B) : 甲状腺は被膜から結合組織の進入により小葉に分かれている。小葉は大小様々なろ胞によって構成され、その内腔にコロイドを満ちし、T4 および T3 を貯留する (B は A の拡大図)。  
 TCDD 投与ラット (49日齢, 800ngTCDD/kg) の甲状腺過形成 (C および D) : 甲状腺全体がコロイドに乏しい小型のろ胞上皮の局所的な乳頭状増殖が散見され、ろ胞の形がやや不規則になっている。小葉間結合組織の繊維化が認められる (D は C の拡大図)。

で低用量 TCDD の経胎盤・授乳暴露が仔の免疫系に及ぼす影響に関する基礎的知見を得るために、T 細胞 (T リンパ球) の分化の場である胸腺、および主たる免疫反応の場の一つである脾臓への影響について検討した。

まず経胎盤・授乳暴露によって、これらの免疫器官に移行する TCDD の量を高分解能 GC-MS で測定した。その結果、800 ng/kg を投与したラットから生まれた仔の生後 21 日における胸腺および脾臓の TCDD 含量はそれぞれ 102 および 62.7 pg/g で、200 ng/kg 投与群の胸腺と脾臓ではそれぞれ 61.4 および 28.0 pg/g であった。すなわち胸腺では脾臓より TCDD 含量が高いことが明らかとなった。その後、その含量は胸腺、脾臓とも離乳期の生後 21 日と比べて 49 日で減少し、120 日ではさらに減少したが、脾臓では 800 ng/kg 投与群の生後 120 日の TCDD 含量が 1.7 pg/g まで下がるのに対して、胸腺では 11.5 pg/g と TCDD がかなり残留していることが

明らかとなった。胸腺はダイオキシンの細胞内レセプターである AhR を豊富に含むことから TCDD の標的臓器となるといわれているが、今回の結果から TCDD が蓄積しやすいことも胸腺が影響を受けやすい原因となっていることが考えられた。

TCDD は胸腺萎縮を引き起こし、また胸腺細胞の分化を変化させることがよく知られている。これらの作用は AhR に依存して誘導されることが報告されている。細胞内に入った TCDD は細胞質で AhR と結合してこの分子を活性化する。活性化された AhR は核に移行して AhR nuclear translocator (ARNT) という分子と複合体を作り遺伝子上の dioxin responsive element (DRE) という配列に結合し、CYP 1A1 をはじめとする、DRE 配列をエンハンサー内にもつ遺伝子の発現を変化させる。TCDD が AhR に依存してどのように胸腺萎縮や胸腺細胞の分化を変化させるかの詳細なメカニズムは明らか

かにされていないが、AhR 依存的な遺伝子発現が関与する可能性が考えられている。これらの知見は従来の主として高用量 TCDD 暴露の実験結果から得られたものである。そこで本研究では、今回の低用量 TCDD の経胎盤・授乳暴露によっても仔の免疫器官で AhR 依存的な遺伝子発現が起こるかどうかについて検討を加えた。そのために AhR-TCDD 依存性の遺伝子発現の中でも最も感受性の高い CYP1A1 遺伝子の mRNA 量を competitive RT-PCR 法により測定した。その結果、生後 5 日の仔の胸腺では、母親への 50、200 または 800 ng/kg の投与によって用量依存的な CYP1A1 の発現誘導の増加がみられ、800 ng/kg 群では対照群の約 200 倍の誘導がみられることが明らかとなった (図 11)。また 800 ng/kg を投与した母親から生まれた仔の生後 5、21、49 日の胸腺では、生後 5 日で CYP1A1 の発現が最も高く、経時的に減少することが観察された。一方脾臓では CYP1A1 の発現誘導はごく弱く、800 ng/kg 群の生後 5 日の組織においてもその発現は対照群の数倍程度であった (図 11)。

このように今回の低用量 TCDD の経胎盤・授乳暴露によって仔の胸腺で CYP1A1 が誘導されていることが確認された。しかし仔の胸腺重量および細胞数は、生後 21、49、120 日とも対照群と投与群の間に有意な差はなかった。各群の胸腺細胞数を図 12 に示した。また実験期間中を通して胸腺の CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>double negative 細胞、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>double positive 細胞、CD4<sup>+</sup>single positive 細胞、CD8<sup>+</sup>single positive 細胞の比率に、対照群と投与

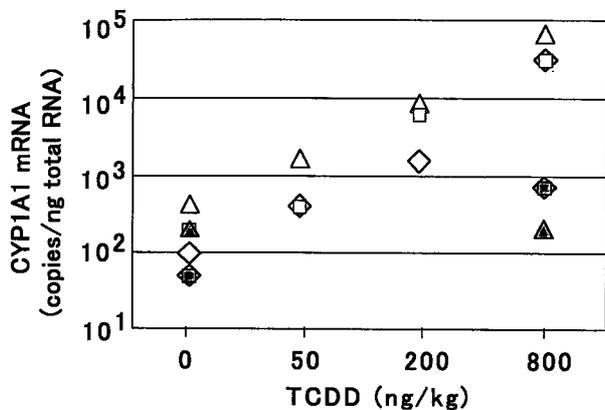


図11 生後 5 日の胸腺および脾臓における CYP1A1 遺伝子の発現  
対照群および TCDD 暴露群それぞれ 3 匹の胸腺 (□, △, ◇) および脾臓 (■, ▲, ◆) について、competitive RT-PCR 法により mRNA の発現量を測定した。

群で再現性のある有意な変化はみられなかった。

これに対して、脾臓の重量は生後 21、49、120 日で対照群と暴露群の間に差はなかったが、生後 49 日で TCDD 用量依存的な組織重量当たり脾臓細胞数の減少がみられ、800 ng/kg 群の減少は有意であることが明らかとなった (図 13)。このときの脾臓の B 細胞、CD4 T 細胞、CD8 T 細胞の比率には対照群と投与群で再現性のある有意な変化は認められなかった。また生後 21 日と 120 日では細胞数、細胞構成ともに対照群と暴露群の間で差はなく、細胞数の減少は生後 49 日、すなわち思春期付近に特異的であることが示された。

以上の結果から、低用量 TCDD の経胎盤・授乳暴露によって仔の思春期の脾臓に用量依存的な影響が現れることが明らかとなり、800 ng/kg 群では対照群と比較してその差は有意であった。またメカニズムとしては、AhR 依存的な遺伝子発現の変化による直接的な影響というよ

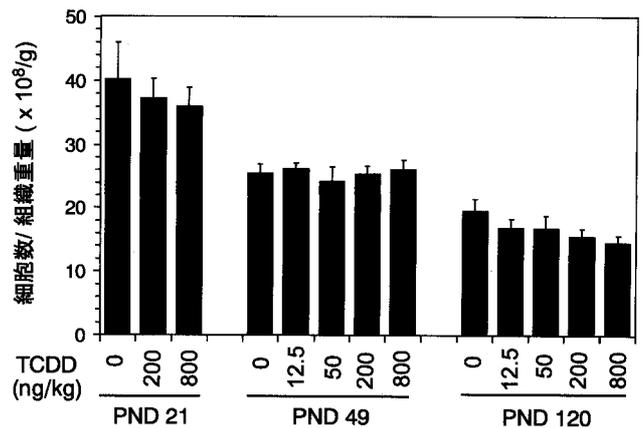


図12 TCDD の経胎盤・授乳暴露の胸腺細胞数への影響  
細胞数の平均値と標準誤差

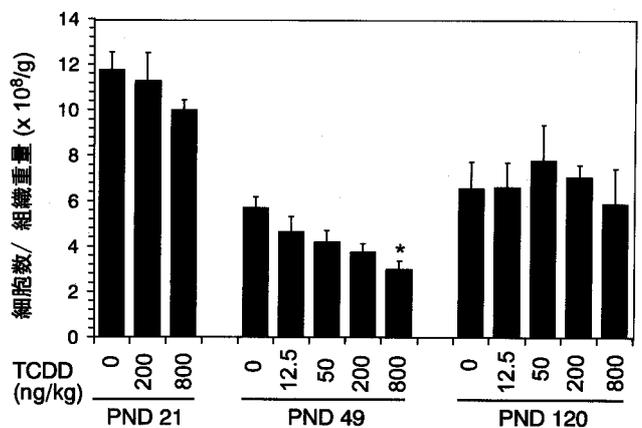


図13 TCDD の経胎盤・授乳暴露の脾臓細胞数への影響  
細胞数の平均値と標準誤差 (\*P<0.05)

りは、内分泌系等を介した間接的な影響であることが示唆された。脾臓細胞数の減少は免疫機能の低下につながる事が予想されるが、実際にどのような免疫機能に変化が起こるかについてはさらに検討が必要である。また TCDD の影響発現に関して、免疫系と内分泌系や生殖系との相互作用についてさらに検討が必要と考えられた。

### 2.1.5 ダイオキシン類の母ラットから仔への移行と蓄積量

近年、我々も含め幾つかの研究グループが、妊娠動物への TCDD の投与実験を行い、発生・分化段階の胎仔や新生仔は、成体よりもはるかに感受性が高いことを明らかにしている。特に、オスの仔の生殖器は感受性が高く、ダイオキシン類暴露によりその発達は抑制される。これら出生仔は親から胎仔期には胎盤を介し、出生後は授乳を介して TCDD の暴露を受けているが、生殖器の発育には胎仔期の暴露の方がより深刻な影響を及ぼすことも明らかになっている。

しかし、この障害の生じた出生仔に母親の妊娠期間中あるいは授乳期間中にどの程度ダイオキシン類が移行しているのかは、あまりよく知られていない。そこで、我々は妊娠動物に TCDD を投与し、胎仔および出生仔への影響と、妊娠期だけでなく授乳期の母体、胎仔および出生仔体内の TCDD 濃度を測定した。従来このような観察には、放射性同位体を用いるが、我々は正確を期するため高分解能 GC/MS を用いて TCDD の定量を行った。

妊娠 15 日目のホルツマンラットに、TCDD をコーンオイルに溶解し、0, 50, 200, 800 ng/kg 体重を経口投与した。投与後 1 日および 5 日に母体を解剖し、母体の肝臓、脂肪および血清、さらに胎仔と胎盤を採取した。また、生後 2 日、5 日、離乳時(出生後 21 日)、生後 49 日および 120 日に、母体、胎仔または出生仔の解剖を行い、血液、脂肪、肝臓等の試料を採取した。これら採取した試料は群ごとにプールし、高分解能 GC/MS で TCDD の定量を行った。

#### (1) 妊娠期間中の TCDD の母親から仔への移行

妊娠期間中の TCDD の母親から仔への移行を見るため、妊娠ラット体内での TCDD 分布を観察した(図 14)。どの用量においても TCDD は母体の肝臓に局在し、その濃度は、肝臓>脂肪>血清>胎盤の順であった。また、ラット母体中の TCDD 濃度はどの部位でも用量依存的

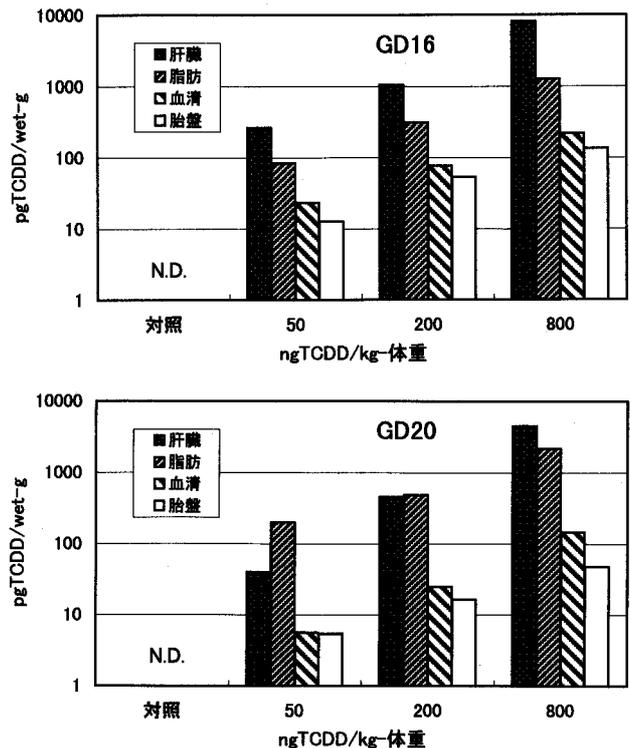


図14 TCDD 投与 1 日後 (GD16) および 5 日後 (GD20) の母体における TCDD 分布

表 1 胎仔 TCDD 濃度と、母親からの TCDD 移行量

	TCDD 投与量 (ng/kg-体重)			
	対照	50	200	800
GD16	1.1	7.2	31.6	95.9
		(40)	(155)	(711)
GD20	0.0	5.4	16.6	47.6
		(310)	(702)	(1990)
	pgTCDD/wet-g, (pgTCDD/腹)			

に増加し、また脂肪組織を除いて投与直後から経時的に減少することも明らかとなった。

一方、ラット胎仔の TCDD 濃度と母体からの移行量を表 1 にまとめて示した。母体同様、胎仔の TCDD 濃度は用量依存的に増加し、また経時的に減少した。胎仔の TCDD 濃度は胎盤よりも低く、投与 1 日後の濃度は、母体肝臓 TCDD 濃度の 1~3% であった。さらに、胎仔の成長に伴って母体から胎仔への TCDD 移行量は増加した。投与 1 日後には、母親への用量の約 0.2% が胎仔へ移行していたが、投与 5 日後には 50, 200, 800 ng/kg 体重投与群で、それぞれ母体投与量の 1.6, 0.9, 0.6% の TCDD が母親から仔へ移行し、用量が低いほど仔へ移行する割

合が高い傾向も見られた。

以上より、妊娠動物に TCDD を投与すると、TCDD の多くは母体肝臓にたまるが、その一部は血流を介し胎盤を通過し胎仔へと移行し、胎仔の発育に影響を与える。母体と胎仔の TCDD 濃度に大きな差があるため、TCDD 暴露の胎仔への影響を評価する際には、母体への投与量ではなく、標的臓器である胎仔の TCDD 濃度を知る必要がある。我々は 50ng/kg 体重の TCDD を妊娠 15 日目のラットに投与すると、その出生仔の生殖器に不可逆的な傷害が生じることを明らかにしており、この時期の胎仔 TCDD 濃度は 5~7 pg/wet-g である。しかし、このような胎仔でのダイオキシン類濃度の測定例は少ないため、詳細な胎仔のリスク評価を行うためには、今後、出生仔の生体影響と併せ、胎仔あるいは出生仔のダイオキシン類暴露量に関する情報をさらに蓄積する必要がある。

(2) 授乳期間中の TCDD の母親から仔への移行

生後 2 日の出生仔の TCDD 濃度を表 2 に示した。これらは妊娠 20 日から 3 日間経過したものであるが、どの用量でも出生仔の TCDD 濃度は、妊娠 20 日目の胎仔と比べ約 4 倍高かった。これは、出生直前の急激な成長に伴い血液を介し、あるいは出生後の授乳によって急激に TCDD が母親から仔へ移行したためと考えられた。生後 5 日と離乳時の母体および出生仔の TCDD 濃度を表 3, 4 にまとめて示した。生後 5 日と 21 日の出生仔の肝臓と脂肪の TCDD 濃度は、ほぼ同程度であり、授乳期間中はその濃度がほぼ保たれていると考えられた。一方、離乳時の母体の TCDD 濃度は、図 14 に示した投与直後の濃度よりもかなり低く、特に肝臓での減少が著しかった。これは糞便への排泄と授乳によって減少したものと考えられた。さらに、800 ng/kg 体重投与群の仔 1 個体からは、離乳時に 14.2 ng の TCDD が検出され、授乳によって仔 1 個体に母体への用量の約 4% に相当する TCDD が移行することが明らかとなった。

さらに、対照群と TCDD 暴露群から生まれた仔を、TCDD 暴露した母親に育てさせ、それぞれ離乳時に解剖した。その結果、両群の仔の血清、肝臓、脂肪組織の TCDD 濃度間にほとんど差はなく、離乳時の TCDD 濃度には、妊娠期の暴露はほとんど影響しないことが明らかとなった(図 15)。先の事実と合わせ、授乳によって多量の TCDD が母親から仔へと移行することが明らかとなった。

表 2 生後 2 日の出生仔の TCDD 濃度

		TCDD 投与量 (ng/kg-体重)			
		対照	50	200	800
		0.02	22.1	64.3	207
		pgTCDD/wet-g			

表 3 生後 5 日の出生仔臓器中の TCDD 濃度

		TCDD 投与量 (ng/kg-体重)			
		対照	50	200	800
肝臓		0.1	99	603	2039
脂肪		7.3	260	583	1177
		pgTCDD/wet-g			

表 4 離乳時(生後 21 日)における母親および出生仔の臓器中 TCDD 濃度

		TCDD 投与量 (ng/kg-体重)			
		50	200	800	
母親	血清	0.31	1.2	5.0	
	肝臓	5.8	20	310	
	脂肪	70	402	1400	
出生仔	血清	1.6	11	60	
	肝臓	93	337	2280	
	脂肪	181	396	1310	
		pgTCDD/wet-g			

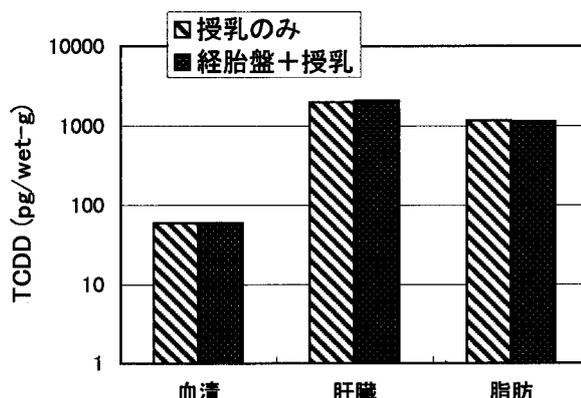


図 15 授乳のみと経胎盤と授乳による TCDD 暴露を受けた出生仔の TCDD 濃度の比較

### (3) 離乳後の出生仔での TCDD の動態と分布

生後 49 日および 120 日の出生仔の臓器中 TCDD 含量を、表 5, 6 に示した。肝臓、脂肪ともその TCDD 濃度は経時的に減少したが、特に肝臓での減少が著しかった。また、高濃度暴露群ほど、肝臓での TCDD の減少速度が大きい傾向が見られた。生後 120 日でも、各臓器から TCDD は検出され、脂肪組織に次いで胸腺で比較的高濃度の TCDD が検出された。一方、脳や精巣での TCDD 濃度は血清と同程度であり、比較的低いことも明らかとなった。

これらの事実から、肝臓では CYP 1A2 に TCDD が特異的に結合するため、投与直後や高濃度暴露群では肝臓に TCDD が局在するが、排泄等により体内の TCDD 濃度が下がると、TCDD はその物理化学的性質に応じて脂質含量に依存して体内に分布するようになると言える。しかし、脳や精巣にはそれが当てはまらず、それら臓器には何らかの障壁が存在している可能性が示唆された。

表 5 生後49日の出生仔臓器中の TCDD 濃度

	TCDD 投与量 (ng/kg-体重)			
	対照	50	200	800
血清	0.02	0.50	1.13	3.97
肝臓	0.13	5.14	19.5	47.9
脂肪	0.43	36.6	90.3	209

pgTCDD/wet-g

表 6 生後120日の出生仔臓器中の TCDD 濃度

	TCDD 投与量 (ng/kg-体重)			
	対照	50	200	800
血清	0.01	0.07	0.16	0.34
肝臓	0.10	0.67	1.85	3.97
脂肪	0.98	6.03	15.3	24.1
精巣	0.02	0.13	0.30	0.49
腎臓	0.03	0.18	0.49	1.04
肺	0.12	0.72	1.81	3.78
脳	0.03	0.17	0.38	0.65
脾臓	0.11	0.28	0.99	1.73
胸腺	0.41	1.47	5.52	11.5

pgTCDD/wet-g

## 2.2 TCDD の作用の機作に関する研究

### 2.2.1 TCDD の毒性発現機序におけるプロテインキナーゼの関与—ラット肝臓への TCDD 投与によるプロテインキナーゼの誘導とそれに関連した遺伝子発現機構の検討—

TCDD の投与によりチトクロム P 450 1 A 1 (CYP 1 A 1) を初めとして多くの薬物代謝酵素遺伝子が誘導されることが知られている。一般にこれらの遺伝子は AhR と呼ばれるリガンドに依存した転写活性化因子を介して発現されることが知られている。しかし、TCDD の内分泌攪乱物質としての毒性発現が、単純にこれらの薬物代謝酵素のみにより引き起こされているとは考えにくい。我々は、先にダイオキシン類の一種であるコプラナー PCB により初代培養ラット肝実質細胞に glutathione S-transferase P 1 (GST-P 1) 遺伝子が発現することを見いだした。この遺伝子発現は H 7 など幾つかのプロテインキナーゼ阻害剤で阻害され、GST-P 1 を初めとしたダイオキシン類による遺伝子発現にはプロテインキナーゼカスケードが関与していることが示唆された。しかしこれまで、TCDD の作用により生体内で活性化されるプロテインキナーゼは同定されていない。そこで、TCDD を投与したラット肝臓で活性化されているプロテインキナーゼを検出・同定することとした。

これまで TCDD の毒性研究においては、比較的高濃度の TCDD を投与して影響が調べられているが、本研究においては肝がんのプロモーション実験に用いられる 1  $\mu$ g/kg を中心に比較的低濃度の TCDD 投与による影響を検討した。また、プロテインキナーゼの活性化機構を明らかにすることに備え、初代培養肝実質細胞に TCDD を暴露することによりプロテインキナーゼが活性化されるか否かも検討した。

また、上記の GST-P 1 遺伝子のダイオキシン類による発現機構を明らかにすることを目的として、コプラナー PCB の 1 種 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl (PenCB) による GST-P 1 遺伝子発現に必要な領域を chloramphenicol acetyl transferase (CAT) assay により決定した。

コーンオイルに溶かした TCDD を 0.01, 0.1, 1  $\mu$ g/kg (実験 1) あるいは 1, 2, 4  $\mu$ g/kg (実験 2) 経口投与し、7 日後に解剖し肝臓と血清を採取した。また、肝臓組織をホモジナイズした後、遠心分離し細胞分画を行った。1,000 g 沈殿を核分画、10,000 g 沈殿をミトコンドリア

分画, 100,000 g 沈殿をマイクロゾーム分画, 100,000 g 上清を細胞質分画とした。

ラット肝実質細胞の初代培養は, コラゲナーゼ処理したラット肝臓により単離した後, コラーゲン処理したプラスチック培養皿に播種することにより行った。播種した細胞を 10% 牛胎仔血清を含む Williams' E 培地中で 4 時間培養して培養皿に接着させ, さらに無血清 Williams' E 培地中で一晩培養した後, 100 nM PenCB あるいは 20 nM TCDD で 24 時間処理した。

実験 1 の試料を用いて肝臓粗抽出液中のプロテインキナーゼを分析したところ, 分子量 60,000 のプロテインキナーゼ (60 k-PK) が TCDD 投与により活性化されていた。60 k-PK の活性の TCDD 投与量依存性を調べたところ, 0.01  $\mu\text{g}/\text{kg}$  投与から有意に活性が増加していた (図 16)。しかしこの投与量では有意な CYP 1A1 mRNA 量の増加は認められなかった。従来, CYP 1A1 の誘導は TCDD 暴露の最も鋭敏な指標と考えられており, 60 k-PK の活性化はこれに匹敵するものである。

60 k-PK の活性化は初代培養肝実質細胞を PenCB あるいは TCDD 処理することによっても認められた。その活性化に必要な時間は意外に短く, 処理後 6 時間ですでに 60 k-PK の活性化が認められ, 処理後 24 時間でもその活性はほとんど変わらなかった (図 17)。

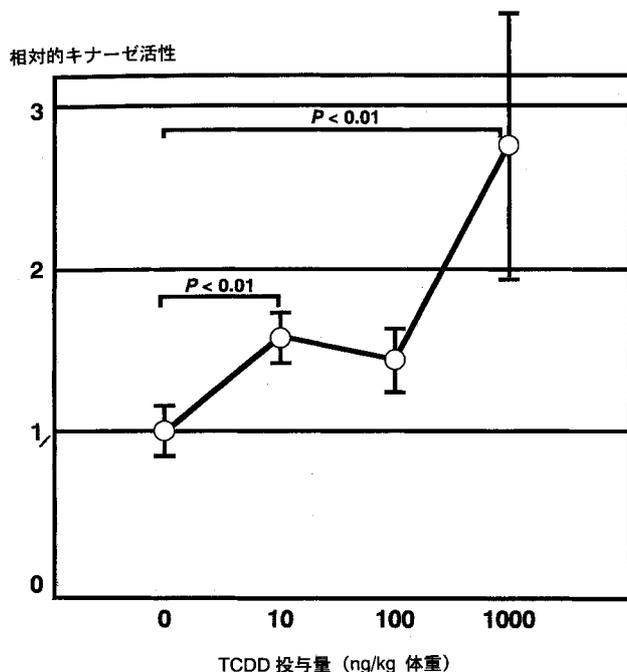


図16 TCDD 投与による肝臓での60k プロテインキナーゼの活性化  
値は平均値±標準偏差

一般に, プロテインキナーゼは細胞内局在性が強い。そこで, 各細胞画分についてプロテインキナーゼの検出を行った。その結果, 60 k-PK はマイクロゾーム分画に回収されることが明らかになった。また, マイクロゾーム分画では 60 k-PK のほかにも分子量 120,000 のプロテインキナーゼ (120 k-PK) の活性化が認められた。それに対して, 核分画, ミトコンドリア分画および細胞質分画では各細胞分画に特異的なプロテインキナーゼが検出されたものの, TCDD 投与に依存したプロテインキナーゼの活性化は認められなかった。実験 2 においても投与量と活性の関係を求めたが, 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  以上の投与では 60 k-PK, 120 k-PK ともに活性の投与量依存性は認められなかった。

実験 2 において, 血清中の肝障害の指標 GOT, GPT および炎症の指標 IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 は TCDD 投与により増加していなかった。

また, CAT assay の結果 PenCB による GST-P 1 遺伝子の発現に必要な GST-P 1 遺伝子の 5' 上流域は, 抗酸化剤や活性酸素種的作用により誘導される遺伝子の発現に必要な anti-oxidant responsive element (ARE) を含む GPE-I enhancer 領域であることが明らかになった。

以上の結果から動物個体への TCDD 投与により活性化されるプロテインキナーゼがラット肝臓においてはじめて同定された。60 k-PK や 120 k-PK は極めて低用量の TCDD により活性化されることから, これらは TCDD 暴露の鋭敏な指標となることが示唆された。また, これらプロテインキナーゼの活性化が, 肝障害や炎症の指標が上昇しない条件下で観察されたことから, プロテインキナーゼの活性化は TCDD 投与による肝障害

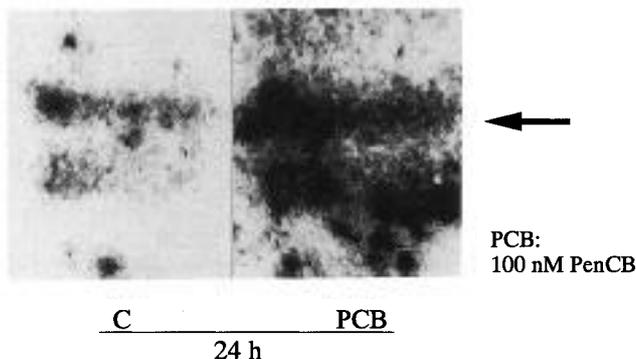


図17 TCDD と PenCB による初代肝実質での60k プロテインキナーゼの活性化

により引き起こされたのではなく、正常肝臓組織内で発生した生理現象に伴って誘導されたものと思われる。さらに、60 k-PK や 120 k-PK がミクロゾーム分画に回収されたことから、これらは膜受容体型のプロテインキナーゼである可能性が考えられる。

これらのプロテインキナーゼの誘導機構は不明である。しかし、初代培養肝実質細胞を PenCB あるいは TCDD で 6 時間処理することによっても 60 k-PK が活性化されることから明らかなように、これらの化合物の直接的な影響によるものと考えられる。また、60 k-PK の活性化が PenCB や TCDD といった AhR のリガンドとなる化合物により引き起こされることから考えて、60 k-PK の活性化は AhR に依存するものと思われる。また、コプラナー PCB による GST-P 1 誘導が ARE に依存することから、ダイオキシン類の投与により発生した活性酸素種が発生し、その作用により 60 k-PK の活性化が誘導された可能性がある。実際、いわゆる酸化ストレスにより活性化されるプロテインキナーゼもすでに報告されている。TCDD による毒性の発現機構を明らかにしていくため、今後、60 k-PK や 120 k-PK を同定していく必要がある。

### 2.2.2 CYP 誘導のラット系統差

TCDD の毒性や生化学的な反応は動物の種や系統で大きく異なる。例えば、急性毒性（経口）LD<sub>50</sub>（半数致死量）は動物の種によって 5000 倍の違いがある。C 57 BL/6 系統マウスは、致死毒性において DBA/2 系統より 5 から 14 倍高い感受性を示し、CYP 1 A 1 mRNA の酵素誘導能も高い。AhR の結合能や親和性の違いが

CYP 1 A 1 誘導の差の要因であると考えられている。ラットにおいては、Han/Wistar 系が Long-Evans (LE) 系に比べ TCDD に対する高い抵抗性を持っている。しかし、致死性と CYP 1 A 1 誘導能あるいは AhR 含量との間の相関関係は見いだされていない。また、ヒトの健康影響を考えると、ヒトは慢性的に低濃度での暴露を受けているという実態がある。さらに、TCDD の低濃度域においても個人個人の TCDD に対する感受性も異なると考えられている。

我々は、低用量の TCDD によって引き起こされる肝のチトクロム P 450 1 A 1 (CYP 1 A 1) 遺伝子の発現のラット系統差について検討した。8 系統のラットに 13.5 ng/kg 体重及び 40 ng/kg 体重の TCDD を 1 回経口投与し、3 日後に解剖を行って肝臓を摘出した。対照にはコーンオイルを経口投与した。摘出した肝臓は、Isogen により全 RNA を抽出し、CYP 1 A 1 mRNA の発現を競合的 RT-PCR 法で定量した。

CYP 1 A 1 mRNA の発現は、DRH, Long-Evans Cinnamon (LEC), LE 及び Holtzman (HO) ラットにおいては 13.5 ng/kg の TCDD 投与により、対照群に比べ有意に増加した。しかし、Sprague-Dawley (SD), Wistar-Imamichi (WI), Lewis (LEW) Fisher-344 (F 344) ラットでは有意な増加は認められなかった。40ng/kg 投与群では、すべての系統で CYP1A1 mRNA の有意な誘導が示された (表 7)。その順番は高いほうから DRH, LEC, HO, LE, F 344, WI, LEW そして SD であった。最も低かった SD における CYP 1 A 1 mRNA の誘導を 1 とすると最も高い DRH で 37 倍以上、LEC で 34 倍以上であった。CYP 1 A 1 mRNA の誘導能の違い

表 7 8 系統間での 40ngTCDD/kg 投与による CYP1A1mRNA の誘導能の比較

ラット系統	CYP1A1 mRNA (Copies x 10 <sup>6</sup> /50 ng RNA)	CYP1A1 誘導能 (cyp1a1/cyclophilin x 10 <sup>3</sup> )	誘導能相対値 (SD=1)
SD	1.03 ± 0.38	5.1	1
LEW	2.34 ± 0.69	9.25	1.81
WI	3.86 ± 1.90	17.5	3.43
F344	4.77 ± 1.33	22.8	4.4
LE	14.5 ± 5.41	80.9	15.8
HO	23.3 ± 3.82	158.9	31.16
LEC	26.1 ± 8.20	175.1	34.33
DRH	38.6 ± 1.38	189.4	37.14

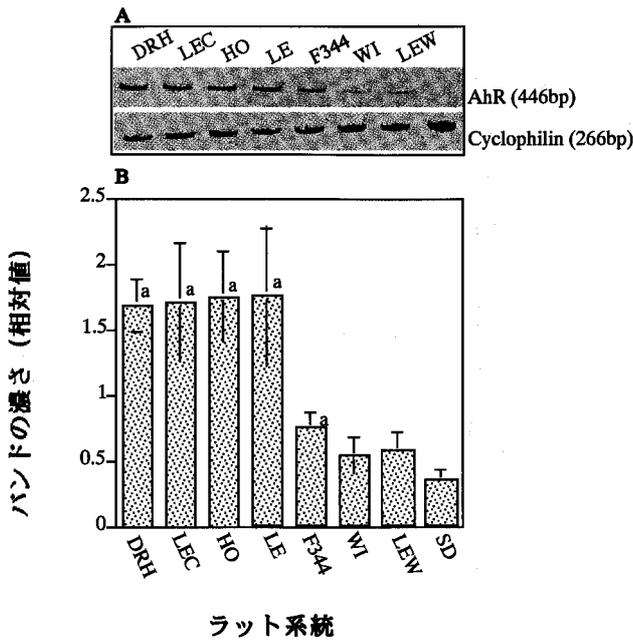


図18 定常状態の AhRmRNA の発現量の比較  
 (A) 代表的な RT-PCR の発現バンド  
 (B) 画像解析による AhR 発現の定量的比較  
 値は平均値±標準偏差

いから SD を 1 とした時に誘導能が 10 以下を低感受性群 (SD, LEW, WI, F 344), 10 以上を高感受性群 (LE, HO, LEC, DRH) と二分することができる。

次に定常状態における AhR 発現を調べた。DRH, LEC, HO 及び LE が約 4 倍高く, F 344 では約 2 倍であった。WI 及び LEW は SD と有意な差は認められなかった (図 18)。さらに, ARNT mRNA の発現も検討した。ARNT の mRNA 転写産物は 572 bp であり, 予測されたバンドが認められたが, それ以外にすべての系統で 527-bp の大きさのバリエーションが確認できた。高感受性群のうち, DRH, LEC 及び HO では野生型の方がバリエーションよりも優位な発現であった。とくに, DRH 及び LEC での野生型は最も低い WI より有意に高かった。そしてバリエーションの cDNA の塩基配列を調べたところ 228 から 274 の間の 45-bp が欠失していることがわかった。この領域には bHLH と呼ばれる DNA 結合領域の 24-bp が含まれていた (図 19)。さらに, 塩基配列の解析からこの欠失 45-bp の 5' 及び 3' 端にはイントロンが存在していたので 527-bp のバリエーションはスプライシング

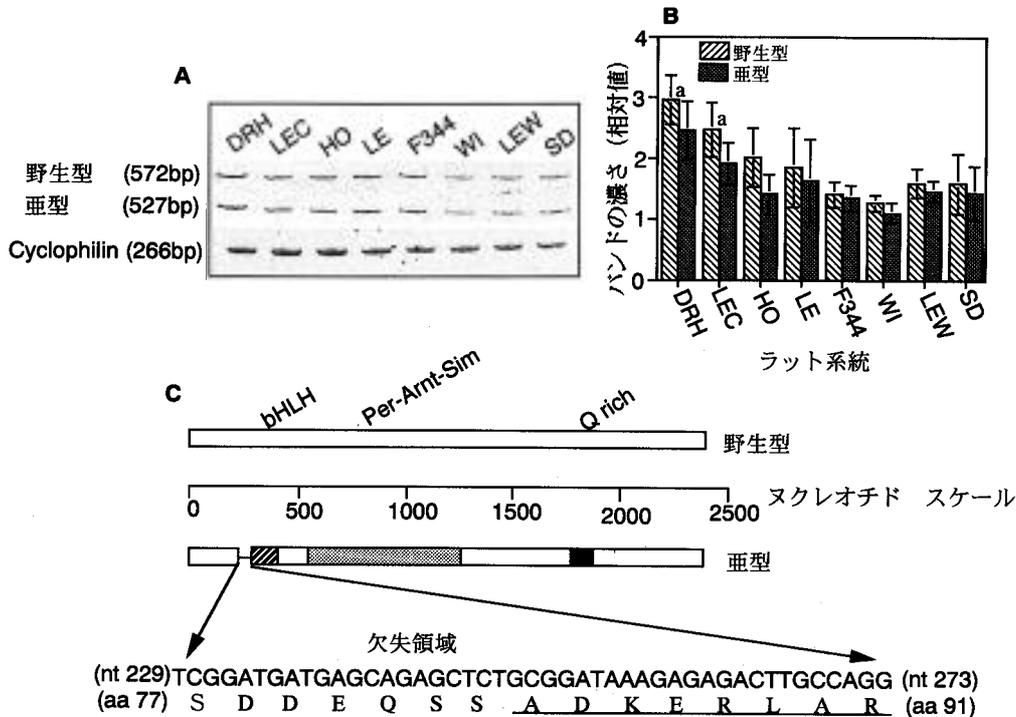


図19 定常状態の Arnt mRNA の発現量の比較  
 (A) 代表的な RT-PCR の発現バンド  
 (B) 画像解析による Arnt 発現の定量的比較  
 (C) 野生型 Arnt の機能領域の概略図と変型 (バリエーション) で観察された欠失領域。下線部は bHLH 領域に含まれる。  
 値は平均値±標準偏差

バリエーションである可能性が高い。同様な現象はマウス細胞 Hepa 1 でも見られていることが報告されている。

以上の結果から、CYP 1A1 mRNA の発現の著しい系統差の理由は、一つには、AhR の発現と CYP 1A1 mRNA の発現に相関的な関係があったので、AhR の発現の差に起因する可能性がある。もう一つには、ARNT の発現の差に起因するのではないかということである。さらには、AhR と ARNT のそれぞれの系統間での発現の違いが協同的に作用して CYP 1A1 mRNA の発現の差を大きくしている可能性もある。今後さらに、AhR や ARNT の発現の差やスプライシングバリエーションに関するメカニズム研究を進めていく必要がある。これらの解析によって TCDD に対する影響のヒトの感受性差が明らかになる可能性があるからである。

### 2.2.3 妊娠期 TCDD 投与ラットの仔の脳におけるホルモン、ホルモンレセプター、ホルモン代謝酵素への影響

ほ乳類の脳における性決定機構では、胎仔期、新生仔期に脳に作用するさまざまなホルモン、とくにテストステロン (T) やエストロゲン (E) が重要な役割を果たしている。E はアロマターゼ (CYP 19) によって生成されるため、胎生期における脳内 CYP 19 は性成熟後の性行動に関する重要な酵素であることがわかっている。

ダイオキシン類は AhR に結合し、さまざまな内分泌系作用を阻害するが、特に性ホルモンである T や E に関して、その生理作用を阻害することが報告されている。また、同時に、代謝酵素であるチトクロム P 450 (CYP) の中でも、ホルモン合成酵素であるいくつかの分子種に対しては、その活性を阻害することが知られている。したがって、妊娠期間中のダイオキシン類暴露によって次世代に性行動異常が起こる理由の一つとして、胎生期における脳内 CYP 19 や E 作用をダイオキシンが阻害する可能性が考えられる。成獣や培養細胞内でのダイオキシンによるステロイドホルモン (SH) や SH 産生酵素に対する影響についてはこれまで詳細な報告があるが、胎仔期や新生仔期の暴露影響についてはまだ報告が少ない。そこで、脳の性差の決定に重要なこの期間にどのような毒性影響があるのかを調べることを本研究の目的とした。

#### (1) ホルモン受容体発現量に対する TCDD の影響

E や T は核内で各受容体に結合し、標的遺伝子の転写を開始する。そこで、核内転写因子である E 受容体や T 受容体について、インプリンティング期にダイオキシンによってその発現量に変化が見られるかどうかについて調べた。しかし、胎生 20 日仔ラットの全脳、生後 21 日齢、生後 49 日齢のラットの視床下部では、オス、メスとも TCDD 暴露によって、E、T 各受容体の mRNA 発現量に変動は見られなかった。

#### (2) ホルモン濃度に対する TCDD の影響

新生仔期の生殖器官 (オス：精巣、メス：卵巣) 中の E、T の濃度はダイオキシン暴露群と対照群とで差は見られなかった。オス及びメスの新生仔期の血清中の E は TCDD 濃度依存的に低下したが、有意な差は見られず、T は両群間で差はなかった。

オスの新生仔期の脳における E 及び T は、TCDD 暴露群で上昇する傾向を見せた (図 20)。メスでは E 濃度に有意な差は見られなかったが、T 量は増加していた。これらの原因については現在検討中である。すべての SH はコレステロールを出発点として種々の CYP を始めとする代謝酵素によって合成される。この基質となるコレステロール量は、新生仔期のラットの脳については、TCDD 暴露群と対照群間とで差が見られなかった。

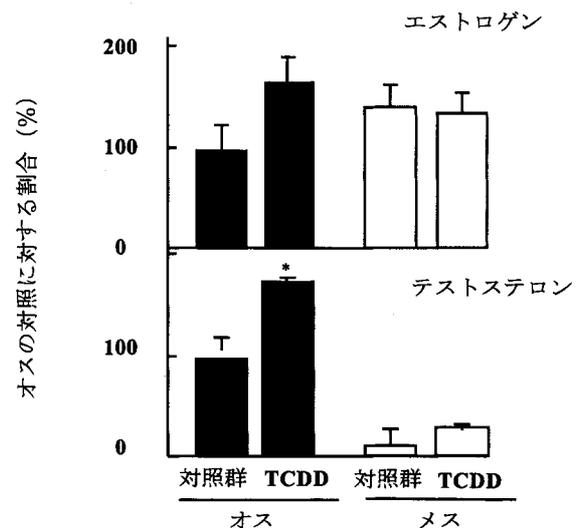


図20 新生仔ラットの脳におけるステロイドホルモン量へのダイオキシン暴露の影響  
C：対照群，T：ダイオキシン投与群。  
値は平均値±標準偏差 (\*P<0.05)

### (3) CYP分子種発現に対するTCDD暴露の影響

#### 1) 肝臓におけるCYP分子種発現への影響

ダイオキシンは転写因子であるAh受容体に結合して、その標的遺伝子の発現を亢進、あるいは抑制する。ダイオキシンによって発現量が増加するCYPのひとつであるCYP1A1は、21日齢、49日齢のラットの肝臓では、TCDD投与群において、対照群と比べてCYP1A1のmRNA発現レベルが濃度依存的に上昇していることが半定量的RT-PCR解析により認められた。

肝臓では異物代謝を行うためにほかにもさまざまなCYP分子種が発現している。これらの分子種の中には、その発現パターンに性差が見られるものがある。性成熟後のラットのオスではCYPの中でCYP2C11がメスに比べて優位に発現しており、メスではCYP2C12が発現している。これらのCYP分子種の発現パターンは、胎仔期・新生仔期のインプリンティング期にSHが脳に作用することによって、視床下部・下垂体におけるソマトスタチン(SS)陽性ニューロン、成長ホルモン放出ホルモン(GHRH)陽性ニューロン、成長ホルモン(GH)産生細胞への分化などが決定され、性成熟後にGHの分泌パターンがオス型、メス型に分かれることで調節されていることがわかっている。したがって、インプリンティング期のTCDD暴露がこれらの過程に影響を及ぼしていると、肝臓における性特異的CYP分子種の発現パターンにも影響が出ることが予想される。

49日齢のオスラットの肝臓では、胎生期・新生仔期

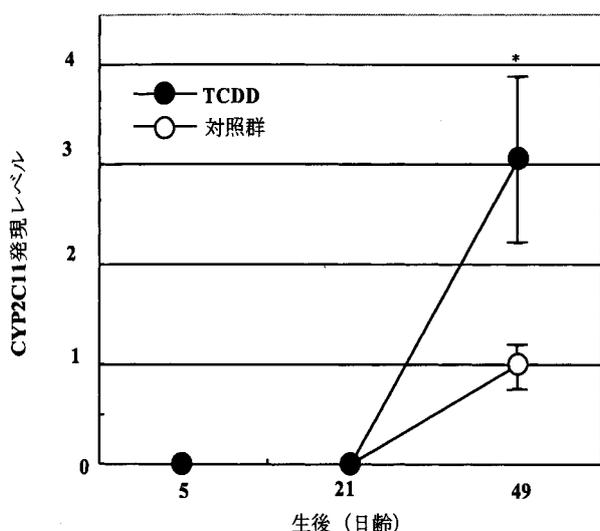


図21 ラット肝臓における加齢によるオス特異的なCYP2C11タンパク発現量の変化とダイオキシンの影響値は平均値±標準偏差 (\*P<0.05)

TCDDに暴露された群において、コントロール群に比べてCYP2C11のmRNA、タンパク発現レベルが上昇していた(図21)。49日齢のラットでは、肝臓でCYP1A1 mRNAが誘導されていることから、残存しているTCDDによる影響も考えられるが、これまでの報告では、成熟ラットにダイオキシン類を投与するとCYP2C11発現量は減少すること、肝培養細胞にダイオキシン類を暴露しても同様にCYP2C11発現量が減少することが知られている。したがって、今回の結果では、インプリンティング期において、性特異的CYPの発現を調節するSHあるいはGHの分泌パターンの調節機構を変化させることで、性成熟後の性特異的CYP分子種の発現パターンに変動があったことが示唆された。

#### 2) 脳におけるCYP分子種発現への影響

胎生20日のラットの脳において、TCDDはmRNAレベルでCYP1A1を誘導することが半定量的RT-PCR解析によってわかった。CYP1A1依存の代謝活性であるエトキシレゾルフィンO脱エチル化活性は、TCDDを暴露した群では、生後5日目のラットの大脳新皮質、海馬、線条体、小脳などの各セクションにおいて上昇していた。しかし、21、49日齢では、肝臓と異なり、mRNA解析では、脳においてTCDDによるCYP1A1の顕著な誘導は認められなかった。

近年、脳においてもSHを代謝するCYP分子種が発現していることが報告されている。視床下部におけるCYP2C11を半定量的RT-PCRで調べたところ、胎生20日のオスの脳ではmRNAはほとんど発現していないが、21、49日齢では同レベルに発現しており、肝臓における発現パターンとは異なる結果が得られた。しかし、これらの発現パターンは、ダイオキシンによる大きな影響はみられなかった。また、コレステロール側鎖切断酵素であり、SH産生の律速段階を担うCYP分子種、P450<sub>scc</sub>の脳におけるmRNA発現量も、胎生20、21、49日齢ではダイオキシン暴露によって大きな変動は見られなかった。TからEを産生し、脳のインプリンティングに重要な役割を果たすCYP19の酵素活性も同様に、TCDD暴露による有意な変動は見られなかった。しかし、Tからより活性の強い男性ホルモンであるデヒドロテストステロンを産生する5 $\alpha$ -還元化酵素は、TCDD暴露群では対照群に比べてその酵素活性が減少傾向にあることがわかった(図22)。

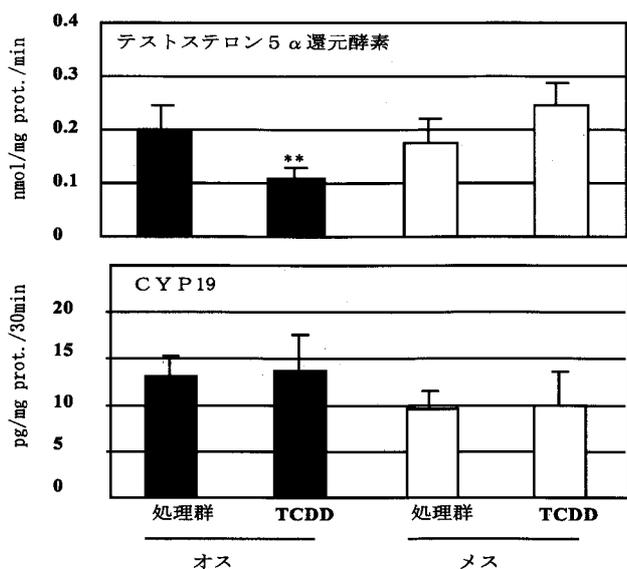


図22 胎仔ラットの脳におけるテストステロン代謝酵素活性に対するダイオキシンの影響  
C: 対照群, T: ダイオキシンの投与群。値は平均値±標準偏差 (\*\*P<0.01)

胎仔期, 新生仔期の TCDD 暴露では, 脳におけるホルモン産生量について影響がある可能性が示唆された。T は胎仔期や新生仔期の視床下部などで, SS 陽性ニューロンへの分化促進など, GH 分泌の調節機構を決定することが知られている。今回, 肝臓においてオスに特異的な CYP 分子種である CYP 2C11 の発現量が, TCDD 暴露群で増加していることから, GH の分泌に影響を与えている可能性が示唆された。現在, SS 産生量や GH 分泌パターンへの影響について解析を進めている。

#### 2.2.4 卵巣摘出ラットにおける TCDD とエストロゲンの相互作用

ラットにおける TCDD の発ガン性は性差があり, メスの肝臓でのみ生ずる。ヒト培養細胞である子宮内膜がん腫由来の細胞, RL 95-2, KLE を用いた実験では, TCDD による CYP 1A1 誘導にエストロゲンレセプター $\alpha$  (ER $\alpha$ ) が重要な役割を果たしていることが示された (2.3.1 参照)。一方, Safe らは ER のない乳がん細胞株, MDA-MB-231, Hs 578 T では AhR や ARNT が正常に発現しているにもかかわらず CYP 1A1 の誘導が起きないこと, ER $\alpha$  を一時的に発現させると CYP 1A1 の誘導が起きることを報告している。これらの結果は, 生理的な条件のもとではエストロゲンが ER と協調して, または独立して CYP 1A1 遺伝子の活性化に役割を

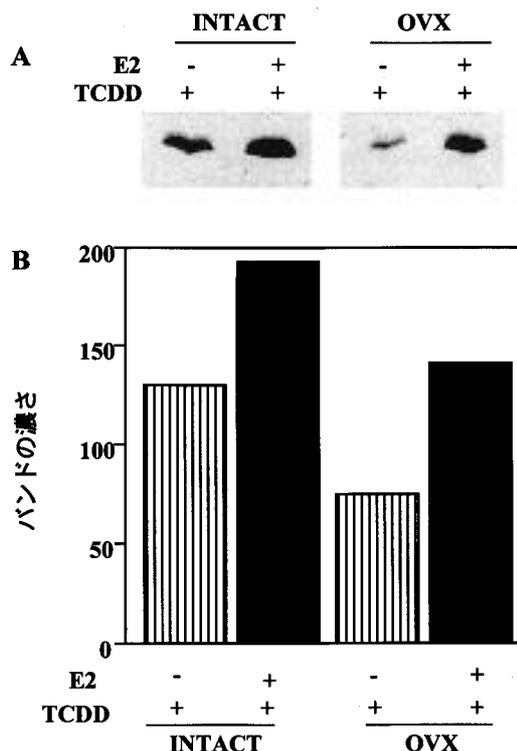


図23 INTACT (無処置) および OVX (卵巣摘出) ラット肝, ミクロソーム画分における TCDD (300ng/kg) による CYP1A1 タンパクの誘導に対する E<sub>2</sub> (5 $\mu$ g/kg/day) の影響  
(A) CYP1A1 タンパクの代表的なイムノプロット  
(B) CYP1A1 タンパク発現の定量化

果たしていることを示唆する。この研究では, *in vivo* において TCDD による CYP 1A1 の誘導へのエストロゲンの関与を検討した。

実験にはメスの Long-Evans ラットを用いた。卵巣摘出 (OVX) したラットに, 1 週間の回復期間の後, エストロゲン (E<sub>2</sub>), 5  $\mu$ g/kg/day を 11 日間投与した。投与 4 日目に TCDD を経口投与し, 7 日後にと殺した。最初に TCDD と E<sub>2</sub> の相互作用を見る条件を設定するため, TCDD 100, 300, 1000 ng/kg 体重を投与して, 肝での CYP 1A1 の誘導に対する用量-反応関係を調べた。TCDD 100 ng/kg から用量依存的な CYP 1A1 の誘導が認められた。血漿 E<sub>2</sub> レベルは 1000 ng/kg で有意な減少が認められた。以上の結果から E<sub>2</sub> に影響を与えない TCDD 濃度として 300 ng/kg を選んだ。

無処置および OVX 処置ラットにおいて TCDD 投与により肝の CYP 1A1 タンパクが誘導され, E<sub>2</sub> の投与により誘導レベルは増加した (図 23)。TCDD を投与しないラットでは CYP 1A1 タンパクの誘導はみられなかった。

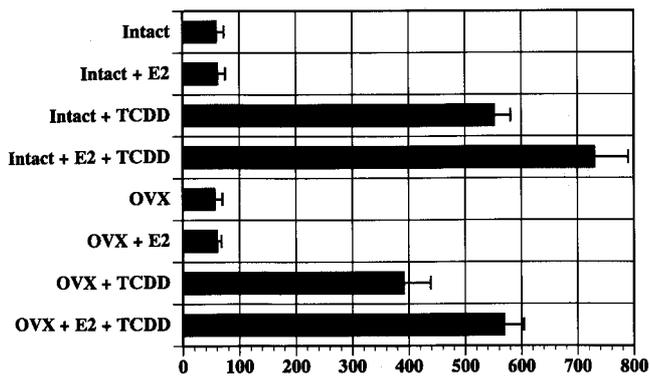


図24 INTACT（無処置）およびOVX（卵巣摘出）ラット肝、ミクロソーム画分におけるTCDD（300ng/kg）によるEROD活性の誘導に対するE<sub>2</sub>（5μg/kg/day）の影響  
値は平均値±標準偏差

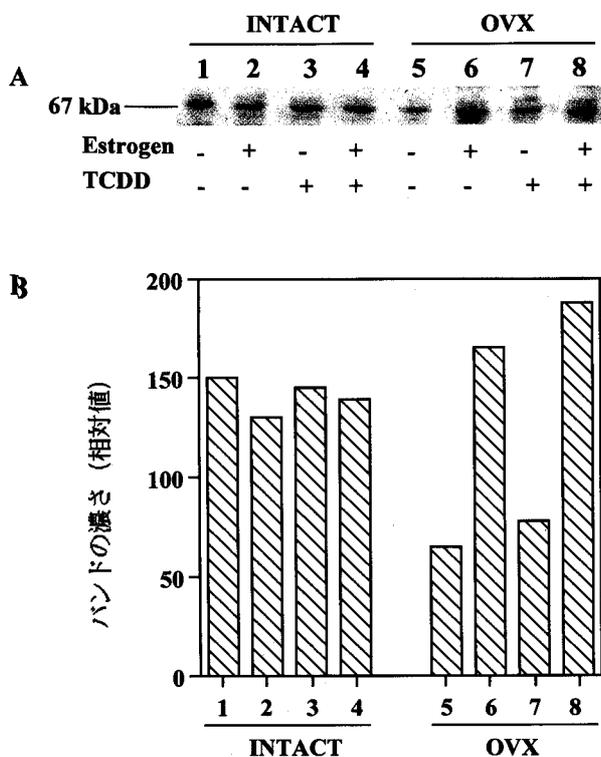


図25 INTACT（無処置）およびOVX（卵巣摘出）ラット肝、核画分におけるTCDD（300ng/kg）、E<sub>2</sub>（5μg/kg/day）および両者の処理によるエストロゲンレセプター発現への影響  
(A) 代表的なエストロゲンレセプターのイムノブロット  
(B) エストロゲンレセプター発現の定量化

EROD活性は無処置およびOVXで、TCDD投与により増加が認められ、TCDDとE<sub>2</sub>を投与したものではTCDD単独投与よりも有意に高かった（図24）。血漿中のE<sub>2</sub>レベルはE<sub>2</sub>とTCDDをともに投与した無処置ラットで有意な減少が認められた。

EROD活性とE<sub>2</sub>レベルとの相関を無処置およびOVXで調べると、E<sub>2</sub>とERODに正の相関が認められた。

次にE<sub>2</sub>がAhRのレベルを変え、その結果、CYP1A1発現と関連した転写活性の変化がもたらされるのかを検討する目的で肝のAhRレベルを調べた。イムノブロットにより通常状態で106、101 kDaの2つのバンドが検出された。細胞質のAhRタンパクは無処置でも検出され、処理による変化はなかった。このことは十分なAhRが細胞質に存在し、いずれの処理によっても誘導されないことを示している。一方、核内のAhRは、何も処理しないラットでは検出されなかったが、TCDDもしくはE<sub>2</sub>処置したラット肝で検出された。しかし、E<sub>2</sub>およびTCDD単独に比べて、両方を投与したものでイムノブロットによるAhRのバンドが濃くなることはなかった。このことはE<sub>2</sub>とTCDDの両方の投与によるCYP1A1の増加は核内のAhRのレベルに依存しないことを示唆している。また、E<sub>2</sub>のみの処理でもCYP1A1を誘導することなく、AhRを核内に移行させることは興味深い。

最後に無処置とOVXのラットにおいて核内ERレベルを調べた。無処置ラットではERレベルに各処理による差は見られなかった。OVXラットではE<sub>2</sub>処理により、ERレベルが3倍に増加した。またE<sub>2</sub>とTCDDの両方の処理はE<sub>2</sub>単独と変わらなかった（図25）。核内ERレベルはE<sub>2</sub>処理により安定化し、TCDDによるCYP1A1誘導に重要であると考えられた。ERは転写活性化能をもつ。先の実験で核内にERを移行できないKLE細胞ではTCDDはCYP1A1の誘導を引き起こさなかった。野生型のERを発現させるとCYP1A1の誘導が回復した。このことは核内のERの存在がCYP1A1誘導には重要であることを示している。今回の結果は、OVXラットにおいてもE<sub>2</sub>処理により十分なERが核内に存在し、このERレベルはTCDDによって影響を受けないことが示された。このように核内にERが十分存在すれば、CYP1A1の発現、EROD活性の増強が引き起こされる。以上のことから、ERがE<sub>2</sub>の存在下、TCDDによるCYP1A1誘導に関与していることが*in vivo*でも示された。

最後に要約すると、この実験では、無処置およびOVXラットにTCDDとE<sub>2</sub>の両方を投与した場合、TCDD単独よりもCYP1A1タンパクおよびEROD活性が増

加することが認められた。E2によるCYP1A1の誘導増強を*in vivo*で初めて示した実験である。E2がTCDDによるCYP1A1遺伝子の転写活性化に関与していることを示唆した。

#### 2.2.5 ダイオキシンの毒性と分子構造, 電子状態の相関

ダイオキシン類の分子構造や電子状態から分子の平面性, イオン化ポテンシャル, 電気陰性度の算出及び定量的構造活性相関用ニューラルネットワーク法の実用化を通じて, 定量的リスク (毒性) 評価システムを開発することを目的とした。

具体的な研究課題として,

- ・ダイオキシンの構造と振動解析
- ・ダイオキシンの重要な物理化学定数 (IP, EA, EPS 等)
- ・ダイオキシンの生成反応, trichlorophenol (TCP) からの生成過程と生成反応の遷移状態 (活性化エネルギー)
- ・ダイオキシンの毒性と分子構造, 電子状態との関連の研究を行った。

##### (1) ダイオキシンの生成経路解析

人工的な化合物の中で最も強い毒性をもつ有害化学物質ダイオキシンは, 除草剤, 殺菌剤などの有機塩素化合物の生産過程や, ゴミの焼却, 自動車, たばこなど多くの燃焼過程で非意図的に生成される。しかしながら, 実際にどのような化学反応が進行してダイオキシンが生成しているのかは全く明らかにされていない。そこで本研究では, 高い毒性を持つダイオキシンを直接扱わずにその生成メカニズムを予測し, 発生原因を解明することによって, 多様な発生源からのダイオキシンの生成を抑制するための反応条件を明らかにすることを目的とする。一般的に理論的化学反应解析は, 実験的には取り扱うことが困難な反応中間体や遷移状態を直接求めることが可能なため, ダイオキシンから生成する過程において, その発生源を解析しダイオキシンの発生を抑制する反応条件を明らかにすることを試みた。さらに出発物質の塩素置換位置および置換数の違いによって, 生成するダイオキシン異性体のうち毒性をもつ異性体の存在比がどのようになるのかを, 分子軌道計算によって求められた活性化エネルギーを基にして反応動力学的観点から考察し, 気相中における実験結果と比較した。これらの計算から身近な化学物質からのダイオキシンの発生を防ぐ反応条

件を明らかにすることが可能になるものと考えている。

##### (2) リスク評価のための新たな理論的指標の開発

本研究は実際の物質を直接扱わずに, ダイオキシンのリスク (毒性) 評価システムを確立することを目的として, 分子構造や電子状態に関する物理量が, 毒性にどのように寄与しているかを定量的に明らかにし, ダイオキシンのリスク (毒性) 評価システムの研究開発を行った。構造活性相関を定量的に解析する方法として, ニューラルネットワーク法を用いた。定量的構造活性相関を求める方法については, 伝統的な Hansch-Fujii 法や, 分子の3次元構造に基づいて解析する CoMFA 法がよく知られているが, 本研究ではダイオキシンの物理量のそれぞれを非線形パラメーターとして取り扱うため, 我々が開発したパーセプトロン型ニューラルネットワーク法により定量的構造活性相関を行った。多くの構造活性相関の場合と異なって, ダイオキシン類の場合は塩素の数と置換位置というきわめて小さい差異が, 非常に大きな毒性変化に反映するので, 入力パラメーターの精度と非線形的取り扱いが必須である。入力層には, *ab initio* 分子軌道法により算出したダイオキシン異性体のイオン化ポテンシャル, 電子親和力, 双極子モーメント, 塩素数 (位置), 平面性, 結合距離 (角), 電荷分布等の物理量を用い, 出力層には毒性の指標として, receptor binding, 酵素AHH, およびERODの誘導体, *in vitro*におけるEC<sub>50</sub> (M) を用いた (図26)。

ここでは一例として, 出力層に Receptor Binding を用いた場合の結果について考察する。結合距離については, ダイオキシンの対称性を考慮してベンゼン環の炭素をC<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>に分類し, O-C, C<sub>1</sub>-C<sub>1'</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>3'</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>1</sub>の結合距離を平均した値を用いて解析した。図27に, それらと毒性の相関を Descriptor Mapping を用いて示す。O-C, C<sub>1</sub>-C<sub>1'</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>1</sub> についての結果は, 結合距離が短いほど毒性が強いが, 他の変数が大きくなると, 注目している個々の変数の傾きは小さくなるのがわかる。それに対して, C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>とC<sub>3</sub>-C<sub>3'</sub> についての結果は, 結合距離が短いほど毒性が強く, 他の変数との相関が非常に小さいという結果が得られた。特に, C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> の場合の Receptor Binding 強度の値は大きいことから, 毒性に大きく寄与していると考えられる。

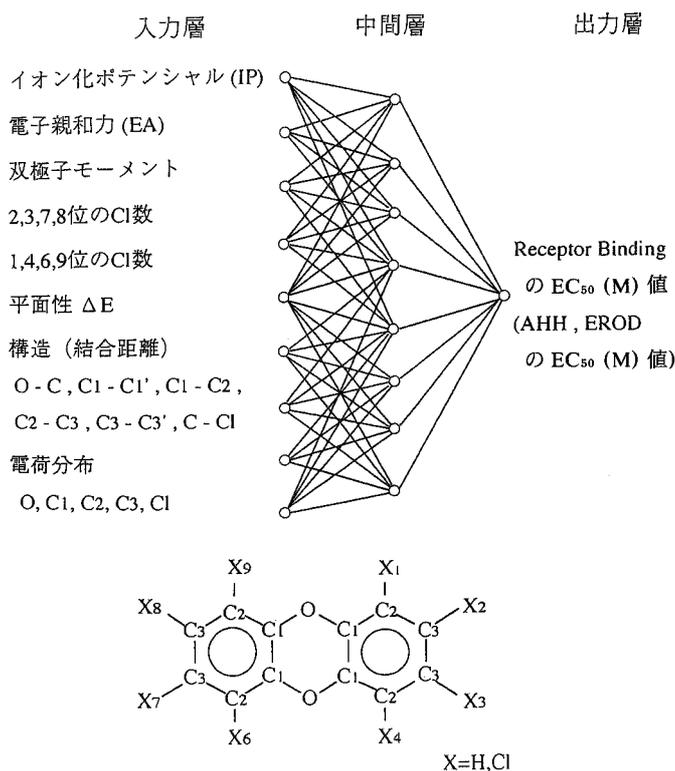


図26 定量的構造活性相関に用いたパラメーターの種類

## 2.3 環境中のホルモン様化学物質のスクリーニング手法及び暴露量の推定に関する研究

### 2.3.1 ヒト生殖器官由来の細胞を用いたダイオキシン類のスクリーニング手法の検討

ダイオキシンは、女性ホルモン、エストロゲン(E2)との相互作用はよく知られている。培養細胞を用いた実験では、TCDDはエストロゲンレセプター(ER)をもったヒトの乳がん細胞において、E2に依存した細胞増殖やE2により誘導されるカテプシンD及びpS2などのタンパクの分泌を阻害する。また、TCDDは、雄性生殖器官に対しても低用量で影響を及ぼすことが知られている。ラット、マウスにおいて前立腺、精囊腺、精巣上体重量の減少、一日精子産生数の減少を引き起こすことが報告されている。これらの副生殖腺の重量の減少は必ずしもアンドロゲンの減少と関連していないこと、TCDDは精巣のアンドロゲンの産生を抑制することなく、選択的に前立腺の発達を阻害するという報告があることから、TCDDは前立腺に対して直接的にも作用している可能性がある。このようにダイオキシンの内分泌攪乱作用を考えると、性ホルモンに支配される組織におけるダイオキシンの作用、ダイオキシンと性ホルモンとの相互作用に関心が持たれている。我々は、この相互作用に着

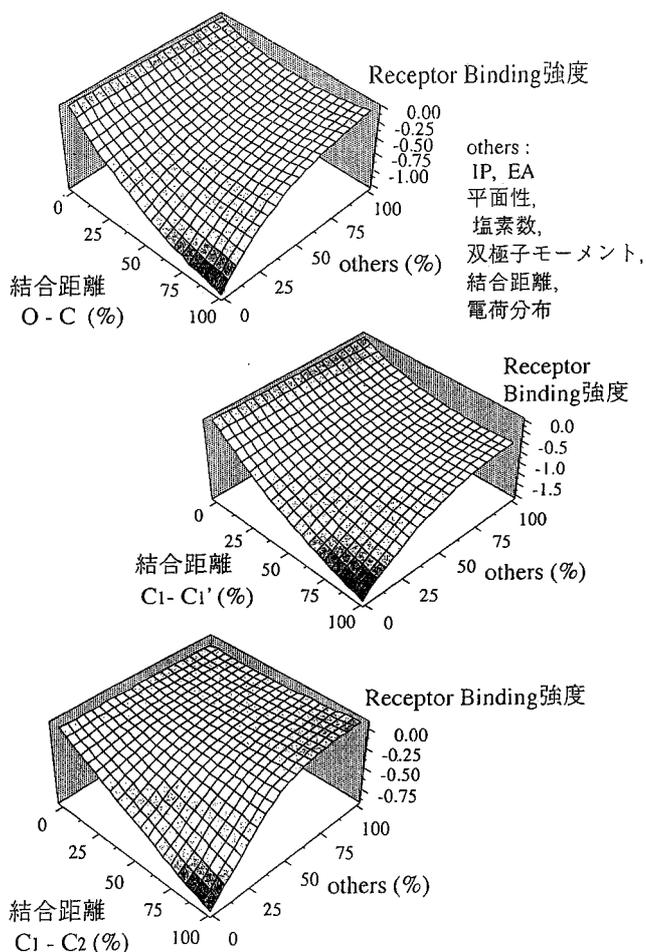


図27 結合距離：O-C、C1-C1'、C1-C2と毒性との相関

目して3種のヒト生殖器官由来の細胞を用いてダイオキシン類のスクリーニング手法の検討を試みた。

#### (1) スクリーニング手法の原理

ダイオキシンの作用の多くはアрилヒドロカーボンレセプター(AhR)を介してその作用を発現すると考えられている。このAhRはリガンドで活性化される転写制御因子として機能し、多くの遺伝子発現制御に関与している。AhRは核内でARNT(AhR nuclear translocator)とAhR-ARNT複合体を形成し、標的遺伝子上流に存在するXRE(xenobiotic responsive element)あるいはDRE(dioxin responsive element)と呼ばれる応答配列に結合し、下流遺伝子の転写を制御する。TCDDはさまざまな生化学的反応を引き起こすことが知られている。

そこで、我々はXREにルシフェラーゼリポーター遺伝子を結合したプラスミドを培養細胞に導入し、TCDD

の存在下でルシフェラーゼ活性がどのように変動するかを調べた。別に、遺伝子導入を行わないインタクトな細胞での TCDD 応答遺伝子の発現変動も検討した。TCDD によって誘導される遺伝子の中でもチトクロム P 450 1A1 (CYP1A1) は、毒性およびいくつかのガンの発生に関与していると考えられていることから大きな関心が払われている。CYP1A1 の誘導は肺、乳腺、子宮がんの感受性増加と相関があるといわれ、非常に低濃度からすばやく誘導されるため、さまざまな毒物に対する特定の細胞や組織の暴露や反応性のマーカーとなりうる。そのため、CYP1A1 mRNA 発現変動も合わせて検討した。

(2) ヒト子宮内膜がん腫由来の細胞 RL-95 における TCDD の作用

実験においては、ヒト子宮内膜がん細胞 RL-95 及び同じ細胞種で ER の応答性がない KLE を陰性対照として用いた。別に陽性対照としてヒト乳がん細胞の MCF-7 を用いた。また、TCDD 及び E2 は溶媒である DMSO に溶かした。はじめに、細胞の通常の増殖あるいは E2 に依存した増殖に対する TCDD の影響を調べた。10 または 100 nM の TCDD によって MCF-7 乳がん細胞の増殖は対照のそれぞれ 67%, 51% に抑えられた。しかし、これらの濃度は RL 95-2, KLE 子宮内膜がん腫細胞の増殖には影響を及ぼさなかった。10 nM の E2 は MCF-7 細胞の増殖を対照の 148% に増加し、この効果は 10, 100 nM

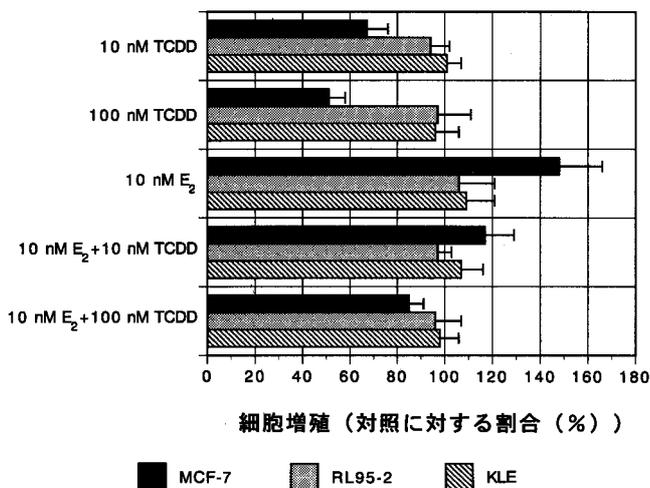


図28 MCF-7, RL95-2, KLE 細胞における増殖、エストロゲン (E2) 刺激による増殖に対する TCDD の影響値は平均値±標準偏差

の TCDD で 117, 85% に抑えられた。E2 は子宮内膜がん腫由来の細胞に対しては増殖を促す作用は認められなかった (図 28)。

図 29 に TCDD の用量に依存した CYP1A1 誘導および EROD 活性増加を示す。RL 95-2 細胞では用量依存的な増加が見られ、0.01 nM という低濃度から誘導が認められた。KLE 細胞では高濃度でのみ低レベルの発現が認められた。同様に CYP1B1 および PAI-2 (plasminogen activator inhibitor 2) 遺伝子の mRNA 発現を調べたところ、RL 95-2 細胞では CYP1B1 は TCDD により誘導された。PAI-2 は無処理の対照でも発現しており、TCDD により用量依存的に発現が増加した (図30)。一方、KLE細胞ではCYP1B1もPAI-2も無処理の細胞で発現しているが、TCDD によってわずかしか誘導の増加は見られなかった。

さらに、ER $\alpha$  発現プラスミドと TCDD 反応性リポータープラスミドを MCF-7, RL 95-2 及び KLE に導入し、その応答性を調べた。TCDD 反応性リポーター遺伝

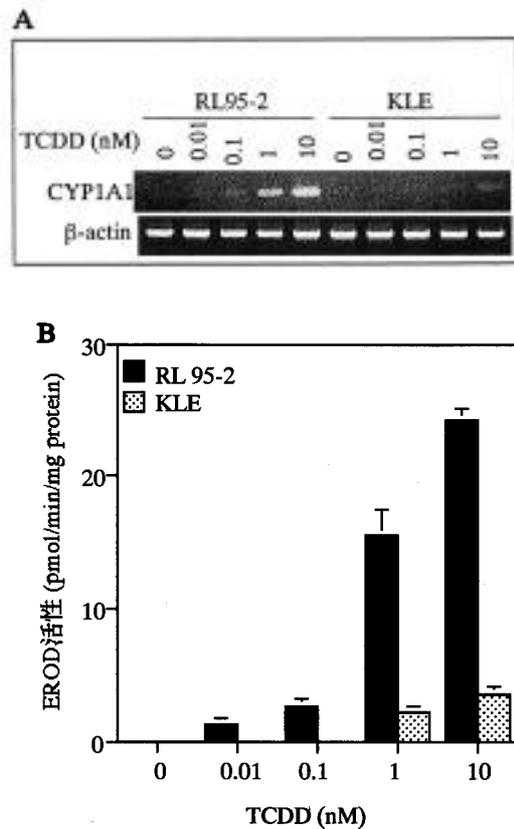


図29 TCDD 処理した RL95-2 および KLE 細胞における用量に依存した CYP1A1 mRNA の発現および EROD 活性 (A) CYP1A1 (146bp) の RT-PCR 産物 (B) EROD 活性 (平均±標準偏差)

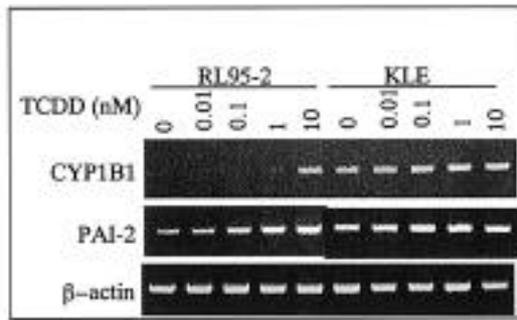


図30 TCDD 処理した RL95-2 と KLE 細胞における用量に依存した CYP1B1 (214bp) と PAI (794bp) の mRNA の発現

子を導入した場合、10 nM の TCDD によって、MCF-7 と RL 95-2 細胞においてはリポーター遺伝子の活性が数倍に上昇したが、KLE 細胞では活性の上昇は見られなかった。ER $\alpha$  を同時に導入すると TCDD 処理によりリポーター遺伝子活性が上昇し、これは用いた ER $\alpha$  量に比例した (図 31)。

この実験では、TCDD に対する子宮の反応性を検討するモデルシステムとして、CYP 1 A 1 誘導を主な指標として、子宮がん腫由来の 2 つの細胞株を用いた。ある程度分化した RL 95-2 細胞では TCDD に反応したが、あまり分化していない KLE 細胞では、高濃度でのみ反応した。一つの XRE を含むリポータープラスミドを一時的に発現させた KLE 細胞では、RL 95-2 細胞とは異なり、TCDD による転写活性の増加は起きなかった。しかしながら、ER $\alpha$  を導入すると TCDD による転写活性の増加が起こり、ER $\alpha$  がこのプロセスに正の修飾因子として作用していること、AhR と関連する遺伝子の活性化に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

RL 95-2 細胞で TCDD により PAI-2 mRNA の発現が増強された。子宮内膜症患者の腹腔液中で PAI-2 が高かったという報告があり、TCDD による子宮内膜症発症に PAI-2 発現増加が一部関係しているかもしれない。

以上をまとめると、子宮内膜がん腫由来の細胞、RL 95-2 を用いて CYP 1 A 1 や PAI-2 mRNA の発現もしくは XRE を含むリポータープラスミドの即時応答能を指標にダイオキシン類のスクリーニングが可能であることを示した。また、KLE は外来性の ER $\alpha$  がいないと TCDD は応答しないので、この二つの細胞に対する応答の差でエストロゲン作用を含む類縁体かどうかの違いを解析することができるかもしれない。

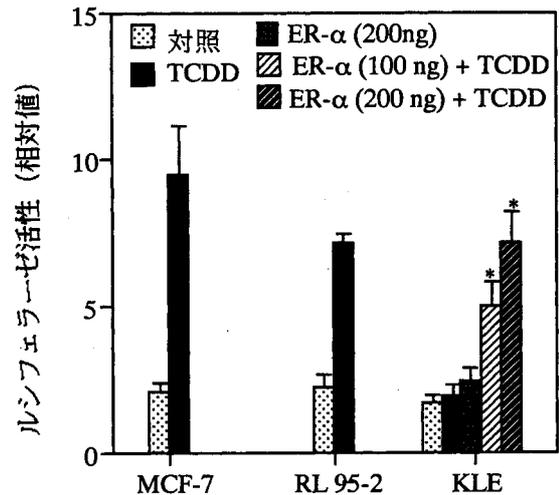


図31 TCDD 反応性のリポータープラスミド、pGL3-1 (XRE)-LUC を一時的に発現させた RL95-2 および KLE 細胞における ER $\alpha$  発現プラスミド HEO の存在、非存在下における TCDD (10nM) に対する反応性 MCF-7 は陽性対照。値は平均値±標準偏差。\*P<0.001でそれぞれの対照に比べ有意。

### (3) ヒト前立腺腫瘍細胞 LNCaP における TCDD とテストステロンの相互作用

はじめに通常の LNCaP 細胞の増殖、あるいはテストステロンで刺激された細胞増殖に対する TCDD の影響を検討した。8 日間の培養後、細胞増殖は TCDD 1, 10, 100 nM によって、それぞれ 0.1% DMSO 添加の対照に比べて、91%, 77%, 55% の増殖に抑えられた (表 8)。一方、10 nM のテストステロンは対照の 162% の増殖刺激を示すが、この増殖刺激も TCDD 10, 100 nM によって、それぞれ、148%, 125% に抑えられた。

図 32 には、TCDD と CYP 1 A 1 mRNA の発現および EROD 活性の量-反応関係を示す。TCDD 1 nM から mRNA の発現、EROD 活性が認められ、用量依存的に増加した。図 33 A は、通常の細胞およびアンドロゲン反応性のリポーターアッセイシステムを一時的に発現させた細胞における、テストステロンによって誘導される転写活性への TCDD の影響を調べたものである。10 nM のテストステロンは、アンドロゲン反応性のレポーター遺伝子活性を 37 倍に増加させる。TCDD 10, 100 nM はこの増加をそれぞれ 29 倍、10 倍にまで減少させた。

このことをさらに確かめるために、テストステロンによって制御されている内在性の PSA (prostate specific antigen) への TCDD の影響を調べた。PSA mRNA およびタンパクレベルはテストステロンによって増強され

たが、この増強は、10, 100 nM の TCDD によって抑制された (図 33 B, C)。

表 8 LNCaP 細胞の通常の増殖およびテストステロンで刺激された細胞増殖に対する TCDD の影響

処 理	細胞増殖*
0.1% DMSO	100
1 nM TCDD	91 ± 19
10 nM TCDD	77 <sup>a</sup> ± 6.7
100 nM TCDD	55 <sup>a</sup> ± 7.2
10 nM テストステロン	162 ± 14
10 nM テストステロン + 1 nM TCDD	169 ± 15
10 nM テストステロン + 10 nM TCDD	148 <sup>b</sup> ± 17
10 nM テストステロン + 100 nM TCDD	125 <sup>c</sup> ± 7.6

注：細胞は8日間、それぞれの処理を行った

\* 値はDMSO対照に対する割合(%)、平均±標準偏差、n=3

a p<0.001 (DMSOに対して)

b p<0.05 (テストステロン処理群に対して)

c p<0.001 (テストステロン処理群に対して)

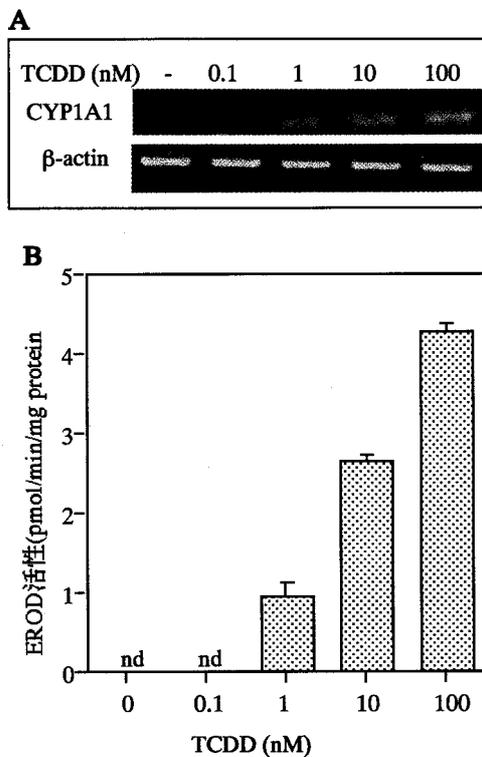


図32 TCDD 処理 LNCaP 細胞における用量依存的な CYP1A1 mRNA 発現および EROD 活性の増加 (A) CYP1A1 (145bp) の RT-PCR 産物 (B) EROD 活性。(平均±標準偏差)

この実験の結果は、TCDD が直接、前立腺がん細胞の成長に対して作用する可能性を示す。おそらく、TCDD は成長因子のシグナル伝達経路の阻害または AR の作用点の下流の細胞周期を制御するタンパクの発現を変化させることによって細胞の成長を阻害している可能性がある。実際、TCDD は、テストステロンに誘導される転写活性およびテストステロンに制御される PSA の発現を阻害した。TCDD の抗アンドロゲン作用は、妊娠期、授乳期 TCDD 暴露のラット雄性仔において、20 kDa タンパク、プロバシン、前立腺結合タンパク C-3 が減少したということが最近の研究でも報告されている。

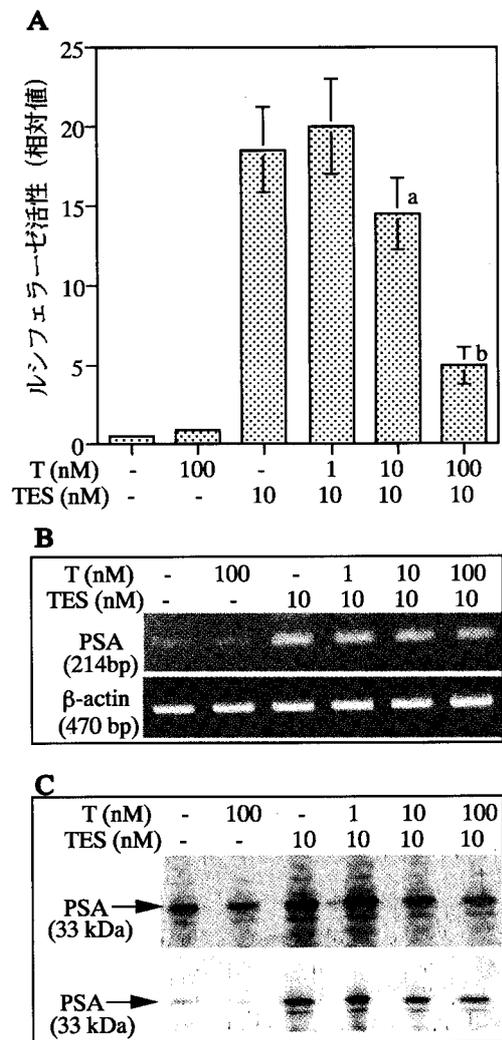


図33 (A) テストステロン反応性リポータープラスミドを一時的に発現させたLNCaP細胞における、テストステロンにより誘導される転写活性に対するTCDDの阻害。(平均値±標準偏差) (B) PSA発現に対するTCDDの阻害のRT-PCR解析。 (C) 細胞内 PSA 量 (上パネル) と培養液への放出 (下パネル) の Western blot 分析

結論として、前立腺がん細胞 LNCaP 細胞において、TCDD は抗アンドロゲン作用を示し、テストステロンおよび TCDD により誘導されるシグナル伝達経路における相互の転写阻害が認められた。このことを利用して環境中のダイオキシン類のみならず抗アンドロゲン作用のある物質のスクリーニングが可能となる。

### 2.3.2 ダイオキシンの暴露とそれによる健康影響との関連

ダイオキシンによる人体の汚染とその健康影響が懸念されている。特に生殖への影響は感受性が高く、次世代にも影響が及ぶことから大きな関心が払われている。東京大学医学部産婦人科の協力を得て、子宮内膜症患者の脂肪組織、男性不妊症患者の血液中のダイオキシン濃度を測定し、症状の程度との関連を検討した。

#### (1) 脂肪組織中ダイオキシン類濃度と子宮内膜症重症度との関連

2,3,7,8-TCDD はアカゲザルにおいて子宮内膜症を引き起こすことが報告され、近年、ヒトにおいて子宮内膜症が増加していることから、ダイオキシン暴露との関連が注目されている。手術を受けた子宮内膜症患者 12 例、軽症例 (Re-AFS 分類 1~2 期) 3 例 (28.8±5.9 歳)、重症例 (同 3~4 期) 9 例 (32.6±4.9 歳) の計 12 例について、インフォームドコンセント下に手術時に腹壁より

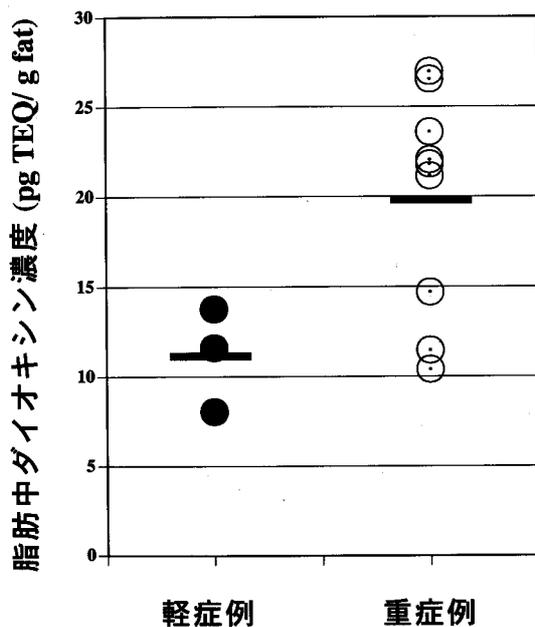


図34 ダイオキシン濃度と子宮内膜症の重症度

1 cm 角以下の脂肪組織を採取した。ダイオキシン類についてはダイオキシン (PCDDs) 7 種類、フラン (PCDFs) 10 種類を対象として高分解能 GC/MS により定量分析を行った。脂肪組織中のダイオキシン類濃度は 1 g 当たりの TEQ (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) 換算) で、軽症子宮内膜症群では 11.20±2.89 pgTEQ/g だった。一方、重症子宮内膜症群では 19.88±6.18 pgTEQ/g で、重症例で有意に ( $p < 0.05$ ) 高い値を示した (図 34)。

#### (2) 男子不妊症患者における血中ダイオキシン類濃度と精子濃度、ホルモン濃度との関連

この半世紀の間にヒトの精子数が半減したとの報告から、内分泌攪乱化学物質への暴露の精子濃度への影響に関心がもたれている。大学の産婦人科を訪れ、体外受精を行った男性患者 38 名 (乏精子症 18 名 (精子濃度  $40 \times 10^6/ml$  未満), 対照 20 名) を対象とした。インフォームドコンセント下に採血し、その血清を試料とした。年齢あるいは精子濃度にて乏精子症患者をそれぞれ 2 群に分け、A 群 9 名 (年齢 36~45 歳), B 群 9 名 (同 26~35 歳), C 群 9 名 (精子濃度  $1 \sim 13 \times 10^6/ml$ ), D 群 9 名 (同  $14 \sim 39 \times 10^6/ml$ ) とした。同じく対照を 4 群に分け、E 群 10 名 (年齢 36~45 歳), F 群 10 名 (同 26~35 歳), G 群 9 名 (精子濃度  $100 \sim 280 \times 10^6/ml$ ), H 群 11 名 (同  $40 \sim 99 \times 10^6/ml$ ) の計 8 群とした。各々の群の血清を等量ずつ混合し、ダイオキシン (PCDDs: 7 種類), フラン (PCDFs: 10 種類) を高分解能 GC/MS により定量分析を行った。また血中 FSH, LH, DHEA-S, E2, テストステロン, 総脂質についても併せて測定を行った。血中のダイオキシン類濃度は脂肪 1 g 当たりの TEQ (pgTEQ/g, fat. 以下略) とした。①精子濃度の高低では明らかな差異は認められなかった (C 13.88, D 12.17, G 11.73, H 12.33)。②精子濃度にかかわらず、高年齢群で高い傾向を示した (A 16.64 vs B 15.79, E 14.94 vs F 8.89)。③ 35 歳以下の低年齢群では乏精子症群で高い傾向を示した (B 15.79 vs F 8.89) が、高年齢群では明らかな差異は認められなかった (A 16.64 vs E 14.94) (図 35)。血中 FSH, LH は乏精子症群で高い傾向を示した。

子宮内膜症、乏精子症のいずれの場合もダイオキシン類濃度は、バックグラウンドで見られる濃度の範囲内であり、今後ライフスタイル等の背景解析を含めた多数例の検討が必要である。

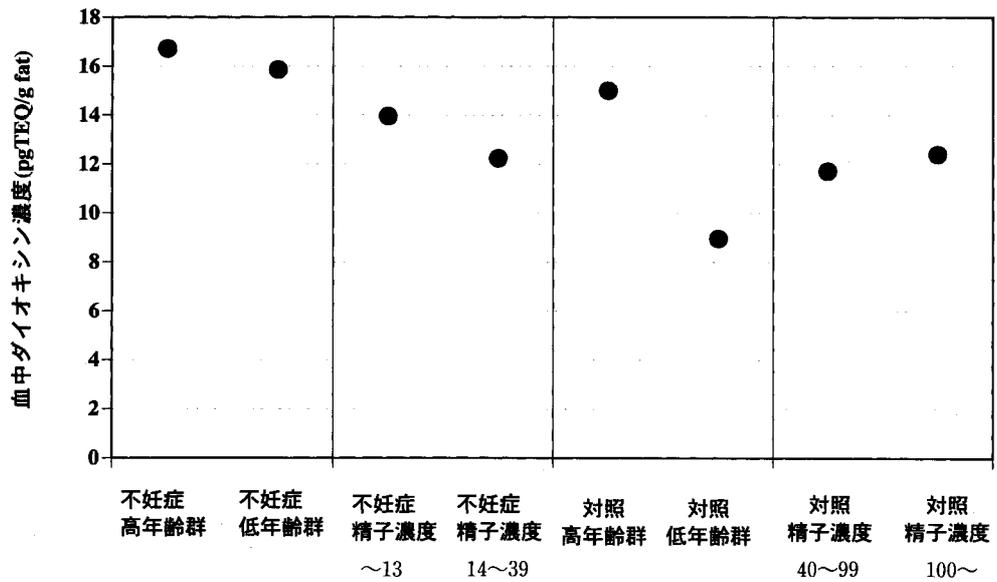


図35 男子不妊患者の血中ダイオキシン濃度  
精子濃度は ( $\times 10^6/ml$ )

[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]

##### 地域環境研究グループ

統括研究官	森田 昌敏
上席研究官	兜 眞徳
化学物質健康リスク評価研究チーム	米元 純三・高木 博夫・曾根 秀子

##### 環境健康部

病態機構研究室	青木 康展・松本 理・大迫誠一郎・石村 隆太
生体機能研究室	藤巻 秀和・野原 恵子
保健指標研究室	石塚真由美・梅津 豊司
環境疫学研究室	宮原 裕一
化学環境部	藤井 敏博

#### [B 客員研究員]

堤 治	(東京大学医学部)	(平成9～10年度)
塩田 邦郎	(東京大学農学部)	(平成9～10年度)
後藤佐多良	(東邦大学薬学部)	(平成9年度)
常磐 広明	(立教大学理学部)	(平成9～11年度)

### 2 研究課題と担当者(\*客員研究員)

- (1) 定量リスク評価のための環境中ホルモン様化学物質の生殖・発生影響に関する実験的研究  
米元純三・曾根秀子・大迫誠一郎・石村隆太・藤巻敏博・野原恵子・宮原裕一・西村典子・塩田邦郎\*
- (2) TCDDの作用の機作に関する研究  
曾根秀子・青木康展・松本 理・石塚真由美・藤井敏博・常磐広明\*・後藤佐多良\*
- (3) 環境中のホルモン様化学物質のスクリーニング手法及び暴露量の推定に関する研究  
米元純三・高木博夫・曾根秀子・堤 治\*

## II 研究成果発表一覧

### 1 誌上発表

発表者	題 目	掲 載 誌	巻(号)	ページ	刊行
米元純三	ダイオキシンの発生毒性	ファルマシア	34(5)	449-452	1998
曾根秀子	ダイオキシンとリスクアセスメント	ファルマシア	34(5)	457-461	1998
曾根秀子	内分泌攪乱物質の女性生殖器への影響	ホルモンと臨床	46(7)	589-597	1998
米元純三	内分泌攪乱物質(環境ホルモン)問題について	大気環境学会誌	34(1)	A 8-A 14	1999
曾根秀子, 遠山千春	内分泌攪乱と健康リスク	産科と婦人科	66(2)	189-199	1999
遠山千春, 曾根秀子, 米元純三	ダイオキシンの健康リスク	臨床環境医学	8(2)	51-61	1999
米元純三	ダイオキシンの発生影響	日本小児臨床薬理学会雑誌	12(1)	58-63	1999
N.R. Jana, S. Sarkar, J. Yonemoto, C. Tohyama, H. Sone	Strain differences in cytochrome P4501A1 gene expression caused by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin in the rat liver; Role of the aryl hydrocarbon receptor and its nuclear translocator	Biochemical and Biophysical Research Communications	248	554-558	1998
O. Tsutsumi, H. Uechi, H. Sone, J. Yonemoto, Y. Takai, M. Momoeda, C. Tohyama, S. Hashimoto, M. Morita, Y. Taketani	Presence of dioxins in human follicular fluid: their possible stage-specific action on the development of preimplantation mouse embryos	Biochemical and Biophysical Research Communications	250	498-501	1998
米元純三	プラスチックに関連した環境ホルモンの問題点について	環境工学	63(6)	310-312	1999
米元純三	内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)の影響はどこまでわかっているか	公衆衛生	63(8)	600-604	1999
米元純三	リスクコミュニケーションの必要性	労働の科学	54	597	1999
米元純三	ダイオキシン問題と健康リスク	土木学会誌	84(11)	60-63	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 Clinica	15(2)	43-48	2000

発表者	題 目	掲 載 誌	巻(号)	ページ	刊行
N.R. Jana, S. Sarkar, M. Ishizuka, J. Yonemoto, C. Tohyama, H. Sone	Cross-talk between 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin and testosterone signal transduction pathways in LNCaP prostate cancer cells.	Biochemical and Biophysical Research Communications	<b>256</b>	462-468	1999
N.R. Jana, S. Sarkar, M. Ishizuka, J. Yonemoto, C. Tohyama, H. Sone	Role of estradiol receptor- $\alpha$ in differential expression of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin-inducible genes in the RL95-2 and KLE human endometrial cancer cell lines	Archives of Biochemistry and Biophysics	<b>368</b>	31-39	1999
M. Matsumoto, M. Imagawa, Y. Aoki	Identification of enhancer element of class piglutathione S-transferase gene required for expression by coplanar polychlorinated biphenyl	Biochem. J.	<b>338</b>	599-605	1999
S. Sarkar, N.R. Jana, J. Yonemoto, C. Tohyama, H. Sone	Estrogen enhances induction of cytochrome P-4501A1 by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin in liver of female Long-Evans rats	International Journal of Oncology	<b>16</b>	141-147	2000
K. Nohara, H. Ushio, S. Tsukumo, T. Kobayashi, M. Kijima, C. Tohyama, H. Fujimaki	Alterations of thymocyte development, thymic emigrants and peripheral T cell population in rats exposed to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin	Toxicology	<b>145</b>	227-235	2000

2 口頭発表

発表者	題 目	学会等名称	開催都市名	年月
松本 理, 青木康展, 今川正良	ラット肝細胞におけるグルタチオンS トランスフェラーゼP遺伝子のコプラ ナーPCBによる発現誘導	第23回環境トキシコロジ ーシンポジウム・第1回衛 生薬学フォーラム合同大会	東 京	9.10
N.R. Jana, H. Sone, S. Sarkar, J. Yonemoto, C. Tohyama	Strain-specific differences of rat hepatic cytochrome P4501A1 gene expression in response to TCDD; Detection and quantification by competitive RT- PCR.	Int. Workshop Chem. Safty Res. (IWCSR '98)	Tsukuba	10.1
S. Sarkar, H. Sone, N.R. Jana, C. Tohyama, J. Yonemoto	Estrogen status alters 2, 3, 7, 8-tetrach- lorodibenzo-p-dioxin-induced CYP1A1 protein expression in female Long Evans rat.	Int. Workshop Chem. Safty Res. (IWCSR '98)	Tsukuba	10.1
矢城美代子, 常盤広明, 藤井敏博, Raja A, 米元純三	環境汚染物質ダイオキシンに関する分子 軌道論的研究5 ダイオキシン生成反応 の理論的反応経路解析	日本薬学会 第118回年会	京 都	10.3
米元純三, N.R. Jana, S. Sarkar, 遠山千春, 曾根秀子	Long Evans ラットにおける2, 3, 7, 8- Tetrachlorodibenzo-p-dioxinの応答遺 伝子発現の臓器分布と性差	第25回日本トキシコロジ ー学会学術年会	名古屋	10.6
松本 理, 青木康展, 今川正良	初代培養ラット肝細胞を用いたコプラ ナーPCBによる遺伝子発現機構の検討	第5回肝細胞研究会	つくば	10.6
J. Yonemoto, N.R. Jana, S. Sarkar, C. Tohyama, M. Morita, H. Sone	Expression of dioxin-related genes in response to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodiben- zo-p-dioxin (TCDD) in various tissues of Long Evans rats	18th International Sympo- sium on Halogenated Envi- ronmental Organic Pollut- ants and POPs (Dioxin 98)	Stockholm	10.8
高見宏之, 常盤広明, 藤井敏博, S. Arulmozhiraja, 米元純三	理論計算を用いたダイオキシン生成メカ ニズムの解析	第24回環境トキシコロジ ーシンポジウム・第2回衛 生薬学フォーラム合同大会	大 阪	10.10
榛葉繁紀, 林充 昭, 手塚雅勝, 曾根秀子, 米元純三	TCDD投与ラット肝に誘導されるRNA 結合蛋白質	第24回環境トキシコロジ ーシンポジウム・第2回衛 生薬学フォーラム合同大会	大 阪	10.10
大迫誠一郎, 西村典子, 宮原裕一, 坂上元栄, 黒沢修一, 青木康展, 遠山千春, 石塚真由美, 曾根秀子, N.R. Jana, S. Sarkar, 米元純三	妊娠ラットへの低用量TCDD曝露が仔 に及ぼす影響(1) 雄性生殖器官	日本内分泌攪乱化学物質学 会第1回研究発表会	京 都	10.12

発表者	題 目	学会等名称	開催都市名	年月
西村典子, 大迫誠一郎, 宮原裕一, 遠山千春, S. Sarkar, N.R. Jana, 曾根秀子, 米元純三	妊娠ラットへの低用量 TCDD 曝露が仔 に及ぼす影響 (2) 甲状腺	日本内分泌攪乱化学物質学 会第 1 回研究発表会	京 都	10.12
N.R. Jana, S. Sarkar, M. Ishizuka, J. Yonemoto, C. Tohyama, H. Sone	Different response of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin cytochrome P4501A1 and 1B1 induction in two uteri endometrial carcinoma cell lines RL95-2 and KLE.	日本内分泌攪乱化学物質学 会第 1 回研究発表会	京 都	10.12
堤 治, 上地博人, 高井 泰, 百枝幹雄, 武谷雄二, 曾根秀子, 橋本俊二, 米元純三, 遠山千春, 森田昌敏	ダイオキシン類の人生殖系への汚染とマ ウス初期胚発育への影響	日本内分泌攪乱化学物質学 会第 1 回研究発表会	京 都	10.12
青木康展	内分泌攪乱物質によるシグナル伝達系の 活性化—コプラナー PCB を例として—	第 112 回日本医学会シンポ ジウム	東 京	10.12
N. Nishimura, S. Ohsako, M. Ishizuka, C. Tohyama, H. Sone, J. Yonemoto	Endocrine function of male rats exposed maternally to 2, 3, 7, 8-tetra- chlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin (TCDD)	38th Annual Meeting of the Society of Toxicology	New Orleans	11. 3
S. Ohsako, N. Nishimura, Y. Miyabara, Y. Ishizuka, Y. Aoki, C. Tohyama, H. Sone, J. Yonemoto	Changes in the reproductive organs of the male rats exposed maternally to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin (TCDD)	38th Annual Meeting of the Society of Toxicology	New Orleans	11. 3
J. Yonemoto, S. Ohsako, N. Nishimura, C. Tohyama, H. Sone	Computer assisted analysis of epididymal sperm motility of rats exposed maternally to 2, 3, 7, 8-tetra- chlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin (TCDD)	38th Annual Meeting of the Society of Toxicology	New Orleans	11. 3
米元純三, 曾根秀子, 藤巻秀和, 遠山千春	妊娠ラットへの低用量 TCDD 曝露が仔 におよぼす影響	第 69 会日本衛生学会総会	千 葉	11. 3
高見宏之, 常磐広明, 藤井敏博, Sundaram Arulmoz- hiraja, 米元純三, 森田昌敏	環境汚染物質ダイオキシンに関する分子 軌道論的研究VIII, ダイオキシン類生成反 応の主要経路に関する化学量学論的考察	薬学会第 119 年会	徳 島	11. 3

発 表 者	題 目	学会等名称	開催都市名	年 月
米元純三	発生毒性—ダイオキシンを中心として—	第72回日本産業衛生学会	東 京	11. 5
米元純三, 曾根秀子, 大迫誠一郎, 西村典子, 野原恵子, 藤巻秀和, 牛尾博子, 宮原裕一, 青木康展, 石塚真由美, N.R. Jana, S. Sarkar, 遠山千春	TCDDの胎児期・授乳期曝露が雄ラット におよぼす影響	第26回日本トキシコロジ —学会学術年会	札 幌	11. 7
大迫誠一郎, 宮原裕一, 坂上元栄, 黒沢修一, 西村典子, 石塚真由美, 青木康展, 遠山千春, 曾根秀子, N.R. Jana, S. Sarkar, 米元純三	妊娠ラットへの低用量 TCDD 曝露によ る雄性生殖器の変異	精巣毒性研究会	東 京	11. 7
S. Arulmoziraja, T. Fujii, J. Yonemoto, H. Takami, H. Tokiwa	Electron affinity tetrachlorinated dibenzo- <i>p</i> -dioxin, 2, 3, 7, 8-, 1, 2, 3, 4-, and 1, 3, 6, 8-, TCDDs.	WATOC '99, 5th World Congr. Theor. Oriented Chem.	London	11. 8
K. Nohara, H. Fujimaki, H. Ushio, T. Kobayashi, S. Tsukumo, M. Kijima, Y. Miyabara, J. Yonemoto, C. Tohyama	Changes in thymocyte development and thymic emigrants in rats exposed to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -diox- in	19th International Symposi- um on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (Dioxin 99)	Venice	11. 9
N. Nishimura, S. Ohsako, S. Sarkar, Y. Miyabara, C. Tohyama, H. Sone, J. Yonemoto	Effect of gestational and lactational exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodiben- zo- <i>p</i> -dioxin on pituitary and thyroid hormone levels in male rats	19th International Symposi- um on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (Dioxin 99)	Venice	11. 9
S. Ohsako, Y. Miyabara, M. Sakaue, S. Kurosawa, N. Nishimura, Y. Aoki, C. Tohyama, H. Sone, M. Ishizuka, N.R. Jana, S. Sarkar, J. Yonemoto	Effects of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin (TCDD) on the development of male reproductive organs in the rats	19th International Symposi- um on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (Dioxin 99)	Venice	11. 9

発 表 者	題 目	学会等名称	開催都市名	年 月
野原恵子, 藤巻秀和	ダイオキシンと Th 1/Th 2 バランス	第 6 回免疫毒性研究会	仙 台	11. 9
大迫誠一郎, 宮原裕一, 坂上元栄, 黒沢修一, 西村典子, 石塚真由美, 青木康展, 遠山千春, 曾根秀子, N.R. Jana, S. Sarkar, 米元純三	ダイオキシンによる雄性生殖機能の変異	日本繁殖学会	仙 台	11. 9
米元純三	内分泌攪乱物質のリスク評価	第 39 回日本臨床化学学会年 会	京 都	11. 9
野原恵子, 牛尾博子, 藤巻秀和	ダイオキシンが胸腺細胞の分化と末梢リンパ球構成に及ぼす影響	第 29 回日本免疫学会総会 学術集会	京 都	11. 12
松本 理, 今川正良, 青木康展	ラット肝細胞におけるコプラナー PCB と細胞増殖因子によるグルタチオン S トランスフェラーゼ P の発現	第 72 回日本生化学会大会		11. 10
J. Yonemoto, N.R. Jana. S. Sarkar, T. Kusumegi, C. Tohyama, H. Sone	Role of the aryl hydrocarbon receptor and its nuclear translocator in a strain difference of cytochrome P4501A1 gene expression induced by 2, 3, 7, 8- tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin in the rat liver	日本内分泌攪乱化学物質学 会第 2 回研究発表会	神 戸	11. 12
Y. Miyabara, N. Nishimura, S. Ohsako, R. Ishimura, K. Nohara, H. Sone, C. Tohyama, J. Yonemoto	Tissue concentrations of 2, 3, 7, 8- tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin in dams and pups of rats exposed throughout pregnancy and lactation	日本内分泌攪乱化学物質学 会第 2 回研究発表会	神 戸	11. 12
K. Nohara, H. Fujimaki, H. Ushio, M. Kijima, S. Tsukumo, T. Kobayashi, Y. Miyabara, H. Sone, C. Tohyama, J. Yonemoto	Effects of perinatal exposure to low doses of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> - dioxin (TCDD) on thymus and spleen lymphocytes in rats	日本内分泌攪乱化学物質学 会第 2 回研究発表会	神 戸	11. 12

発 表 者	題 目	学会等名称	開催都市名	年 月
N. Nishimura, M. Sato, Y. Miyabara, M. Ohmura, J. Yonemoto, Y. Aoki, C. Tohyama	Changes in thyroid hormones in female Sprague Dawley rats following a low dose of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin.	日本内分泌攪乱化学物質学会第2回研究発表会	神 戸	11.12
S. Kurosawa, S. Ohsako, R. Ishimura, M. Sakaue, J. Kimura, K. Takeda, J. Yonemoto, C. Tohyama	Analysis of mechanism for anti-androgenic effect of vinclozolin on spermatogenesis in the adult rat	日本内分泌攪乱化学物質学会第2回研究発表会	神 戸	11.12
R. Ishimura, M. Ohmura, Y. Miyabara, S. Ohsako, N. Nishimura, M. Sakaue, S. Kurosawa, H. Sone, J. Yonemoto, Tohyama	Abruption of placental maturation by mid-pregnant exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin in Holtzman rats	日本内分泌攪乱化学物質学会第2回研究発表会	神 戸	11.12
M. Matsumoto, M. Imagawa and Y. Aoki	Gene expression by a co-planar polychlorinated biphenyl and epidermal growth factor	日本内分泌攪乱化学物質学会第2回研究発表会	神 戸	11.12
西村典子, 佐藤巳喜夫, 宮原裕一, 大村昌子, 米元純三, 青木康展, 遠山千春	低用量 TCDD によるラット甲状腺ホルモンの変動	第16回日本毒性病理学会	岐 阜	12.1
N. Nishimura, J.S. Suzuki, M. Sato, M. Satoh, Y. Aoki, M. Ohmura, C. Tohyama	Induction of metallothionein in liver of female rats treated with 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin.	39th Annual Meeting of the Society of Toxicology	Philadelphia	12.3

発表者	題 目	学会等名称	開催都市名	年月
M. Sato, Y. Miyabara, J. Yonemoto, Y. Matsuzaki, Y. Aoki, C. Tohyama, N. Nishimura	Hypothyroxinemia caused by a low oral dose of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin in female Sprague Dawley rats.	39th Annual Meeting of the Society of Toxicology	Philadelphia	12. 3
Y. Miyabara, N. Nishimura, S. Ohsako, R. Ishimura, K. Nohara, H. Sone, C. Tohyama, J. Yonemoto	Transfer of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin through pregnancy and lactation in rats.	39th Annual Meeting of the Society of Toxicology	Philadelphia	12. 3
K. Nohara, H. Fujimaki, H. Ushio, M. Kijima, T. Kobayashi, S. Tsukomo, Y. Miyabara, H. Sone, C. Tohyama, J. Yonemoto	Reduction of spleen cellularity by low-dose maternal exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin (TCDD) in the rats	39th Annual Meeting of the Society of Toxicology	Philadelphia	12. 3
M. Matsumoto, M. Imagawa, Y. Aoki	Identification of an enhancer of glutathione S-transferase P1 gene required for expression by co-planar polychlorinated biphenyl	39th Annual Meeting of the Society of Toxicology	Philadelphia	12. 3
C. Tohyama, C. Suzuki, J. Yonemoto, S. Watanabe, M. Kabuto, H. Sone	CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 mRNA expression levels in human blood using a real-time reverse transcription-PCR system	39th Annual Meeting of the Society of Toxicology	Philadelphia	12. 3
西村典子, 佐藤雅彦, 米元純三, 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	第70回日本衛生学会	大 阪	12. 3
西村典子, 米元純三, 遠山千春	低用量 TCDD のラット甲状腺ホルモンに及ぼす影響	第70回日本衛生学会	大 阪	12. 3
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	12. 3

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-37-2001

---

平成13年1月31日

編 集 国立環境研究所 編集委員会

発 行 環境庁 国立環境研究所

〒305-0053 茨城県つくば市小野川16番2

電話 0298-50-2343 (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 305-0053 Japan

January 2001

本報告書は再生紙を使用しています。