

1) GJIC 阻害の時間経過

WB 細胞への TCDD 処理 24 時間までの時間経過を SL/DT 法で解析した結果、GJIC 阻害が処理 1 時間後に起こり、その回復後に再度 12 時間後以降を中心に阻害が見られ、24 時間後においては濃度依存的な阻害効果が観察された(Fig.1)。しかしそれ以降には回復傾向にあった。

2)細胞増殖作用

TCDD (1~5 μ M) 処理では、48 時間以降より濃度依存的な増殖性が見られ、72 時間後の 5 μ M 処理により、DNA 量はコントロールの 1.4 倍に増加した。

3) Ras 蛋白の誘導および MAPK(Erk)活性化

24 時間以降より Ras 蛋白の有意な誘導が検出された。72 時間後には濃度依存的な誘導が確認された。

実験 2. TCDD による WB-RAS 細胞の GJIC 阻害及び細胞増殖作用

次に、WB-RAS 細胞に対する TCDD の GJIC 阻害、細胞増殖作用が、WB 細胞より顕著である可能性を検討した。またその要因に、TCDD による Ras の誘導能、MAPK(Erk) 活性化の増強が関与するかについて解析した。

1) GJIC への作用

spindle 型の形態に変化した WB-RAS 細胞では、既に GJIC がほぼ消失していたが、TCDD (~5 μ M) 処理により、48 時間以降よりオリジナルの WB-RAS2A 細胞様の形態へと変化し、これに伴い、GJIC もオリジナル WB-RAS2A のレベルに近い値に回復した。WB 細胞では、72 時間後には GJIC 阻害は見られず、それに対して WB-

RAS 細胞では、回復があるものの WB 細胞の 50%以下の低値が持続した(Fig.2)。

2)細胞増殖作用

TCDD の 72 時間処理後で比較した場合、WB 細胞では TCDD(5 μ M)処理で DNA 量の増加率が 1.2 倍であるのに対し、WB-RAS 細胞では約 4 倍の増加が認められた(Fig.3)。

3)Ras の誘導ならびに MAPK(Erk)の活性化

pan-Ras の誘導能については、TCDD 処理 72 時間後において、WB-RAS 細胞と WB 細胞には有意な差は認められなかった。MAPK(Erk)の活性は、WB-RAS 細胞ならびに WB 細胞ともに、TCDD 濃度依存的な上昇が見られたが、定常レベルの活性が、WB-RAS 細胞では WB 細胞より 3 倍以上高く、TCDD 処理により相加的な上昇が見られた(Fig.4)。

D. 考察

論文報告によると、WB 細胞では、TCDD の 48 時間処理後においては GJIC 阻害が起こらないとされており、これには AhR の欠如が要因であると推測されていた。しかし、本実験に際し、我々は WB 細胞に AhR が発現していることを RT-PCR 法で確認し、また 24 時間以内に軽度ではあるが、GJIC 阻害が起こることを見出した。また、これに引き続き細胞増殖が起こることも確認し、これには Ras 蛋白の誘導、それに引き続く MAPK 活性化の関与を示唆する結果が得られた。しかしながら、Ras-MAPK 経路の活性化は、一過性の GJIC 阻害機構には関与していないものと考えられた。

TG/AC マウスでの TCDD による発がん好発性要因として、変異型 ras 発現組織においては、TCDD による GJIC 及び細胞増

殖がより顕著に起きている可能性がある。WB-RAS の GJIC は、表現系の変化(spindle 型細胞)に伴いほとんど消失していた。しかし、原因は不明であるが、TCDD により形態ならびに GJIC は、オリジナルの v-ras 導入細胞株 (WB-RAS2a) 様に回復した。しかしながら、GJIC は野生型 WB 細胞より有意に低値を持続していた。細胞増殖性については、WB-RAS 細胞は WB 細胞より顕著であることが証明された。この現象には、定常的な低レベルの GJIC ならびに MAPK 経路の活性化が、TCDD による増殖シグナルの促進に有利に働いたためと推測される。

E. 結論

本研究において、変異型 ras 導入細胞では TCDD による細胞増殖が、野生型細胞より顕著であることが明らかとなった。これには、定常的な低いレベルの GJIC ならびに活性化した MAPK 経路が、TCDD による増殖シグナルの促進に寄与したものと推測される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 佐井君江 : 緑茶の肝発がん抑制過程における生物学的諸変化. 放射線科学, 42, 113-119 (1999)
- 2) T. Umemura, S. Kai, R. Hasegawa, K. Sai, Y. Kurokawa, G. M. Willoams. Pentachlorophenol (PCP) produces liver oxidative stress and promotes but does not initiate hepatocarcinogenesis in B6C3F1 mice. Carcinogenesis, 20, 1115-1120 (1999).

2. 学会発表

- 1) K. Sai; Green tea: Its biologically suppressing effects during the

hepatocarcinogenesis induced by pentachlorophenol -A possible implication for interaction of green tea components with endocrine disruptors- The 5th International Symposium on green Team Seoul, Korea (May 7, 1999)

- 2) K. Sai, B.L. Upham, K.-S. Kang, R. Hasegawa, J.E. Trosko, T. Inoue: Pentachlorophenol inhibits gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells. 1999 International Gap junction Conference Gwatt, Switzerland (August 28 ~ September 2, 1999)
- 3) 佐井君江、菅野 純、黒川 雄二、井上 達 : Pentachlorophenol の肝培養細胞におけるアポトーシス阻害作用ならびにギャップ結合細胞間連絡阻害との関連 : 第 58 回日本癌学会総会、広島(平成 11 年 9 月 29 日 ~ 10 月 1 日)
- 4) K. Sai, J.E. Trosko, T. Inoue: Pentachlorophenol-induced down-regulation of gap junctional intercellular communication was ameliorated by (-)-epigallocatechin gallate in rat liver epithelial cells. Epigenetic Toxicant-Induced Signal Transduction and Altered Cell-Cell Communication, Ann Arbor, Michigan (October 17 - 20, 1999)
- 5) B.L. Upham, G. Chem, A. Voges, K. Sai, J.E. Trosko: The inhibition of gap junctional intercellular communication and the activation of MAPK by methylated anthracenes with specific structures. Epigenetic Toxicant-Induced Signal Transduction and Altered Cell-Cell

Communication, Ann Arbor, Michigan
(October 17 - 20, 1999)

6) B.L.Upham, K.Sai, P.K.Tithol,
G.Chen, W.R.Wilson, J.E.Trosko:
Inhibition of gap junctional
intercellular communication,
activation of MAPK, and the release
of arachidonic acid by specific
isomers of methylated anthracenes.
Society of Toxicology 39th Annual
Meeting, Philadelphia, Pennsylvania
(March 19 - 23, 2000)

厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)
分担研究報告書

ダイオキシンの発がんプロモーター作用の
in vivo 高感度検出系に関する研究

分担研究者 菅野 純 (国立医薬品食品衛生研究所)

研究要旨 ダイオキシン類の生体影響のメカニズム解析を目的とし、発がん作用の高感度検出系として、発がんにおけるプロモーター作用にも感受性を示すとされる TG/AC マウスを用いて成熟期個体における発がん性について検討を行った。また、このものと AhR 遺伝子欠失マウスとを交配して双方の遺伝子変異を持つマウスを生産し、発がん性の認められた化合物について AhR を介するか否かの分別を行うと同時に、誘導される代謝酵素の検討も併行して行う予備実験を開始した。

A. 研究目的

ダイオキシンの発がんプロモーター作用の検出系を検討し、そのメカニズムの解析を行う。この知見の応用として、いわゆるダイオキシン類化合物の作用を検討する基礎とする。

B. 研究方法

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)は変異原性試験において陰性であるが、米国 National Toxicology Program (NTP)の癌原性試験において、肝臓、甲状腺等に対する発がん性が示されている。このような発がん性はアリルハイドロカーボン受容体(AhR) (別名ダイオキシン受容体)の遺伝子を欠失させたマウスでの実験結果から AhR を介した酵素誘導等の epigenetic な事象の上に成り立ったメカニズム、言い換え

ると発がんプロモーター作用が、その本態であることが推察される。短期発がん系において、いわゆるイニシエーションを要求せずに TCDD による、発がんを観測できる系として、Tg/AC マウスが知られている。このマウスは、v-Ha-ras 遺伝子導入マウスであり、皮膚を主体とする各臓器・組織における発がん感受性の亢進が認められ、特に非変異原性の発がんプロモーターにも感受性を有する特徴がある。本研究では、このトランスジェニックマウスを用いる系として、AhR 遺伝子欠失マウスとの掛け合わせを目的とし、その背景系統である C57BL/6 マウスとの F1 動物における皮膚易発癌性の検討、肝臓発がん好発系である C3H 系マウスとの F1 動物における肝臓易発がん性の検討を行った。これと並行して、v-Ha-ras 導入非形質転換 BALB 由来細胞株(Bhas42 細胞)を用いて、その発が

んプロモーター作用の in vitro 検出系の検討とその分子生物学的メカニズムの解析を試みるものである。

C. 研究結果

Tg/AC マウス (Taconic 社より入手) は FVB マウスに v-Ha-ras 遺伝子をマウスゼータグロブリンプロモーターとともに導入したもので、皮膚発がん好発系である。AhR ノックアウトマウスは、藤井らにより作成されたもので、C57BL/6 を背景としている。肝発がんに関しては、C57BL/6 および FVB マウスは C3H よりも嫌発系である。

本年度は、Tg/AC マウスおよび C57BL/6 の F1、Tg/AC マウスおよび C3H の F1、を作成した。それらには、Tg/AC の自然発生腫瘍として知られる歯原性腫瘍 (odontogenic tumor) および、皮膚創傷部位の皮膚乳頭腫の発生が低頻度ながら観察された。このことから、遺伝的背景が異なっても、Tg/AC マウスとしての易発癌性とその標的臓器とともに保たれる可能性が示された。現在、これを、さらに検証するために、これらに対する皮膚発がん 2 段階モデル (DMBA+TPA)、および肝発がん 2 段階モデル (DEN+PB) を各々実施中である。

D. 考察

TCDD の有害作用の一つの大きな項目である発がん性は、この物質に変異原性が認められないことから、epigenetic な機構に依ることが示唆され、佐井らの、培養細胞を用いた検討から、そこに ras 遺伝子が関与するものと考えられることから、このメカニズムの検討には、Tg/AC マウスおよび Bhas42 細胞のような系が適切であると考えられる。今後、さ

らに、これらの系について遺伝発現を含む諸項目について検討が必要である。また、in vivo 指標として、発がんプロモーター作用に感受性のある Tg/AC マウスを用いる検討を進めた。AhR 遺伝子欠失マウスとの掛け合わせを目的とし、本年度は、Tg/AC マウスおよび C57BL/6 の F1、および Tg/AC マウスおよび C3H の F1、をそれぞれ作成した。それらには、Tg/AC の自然発生腫瘍として知られる歯原性腫瘍 (odontogenic tumor) および、皮膚創傷部位の皮膚乳頭腫の発生が低頻度ながら観察された。このことから、遺伝的背景が異なっても、Tg/AC マウスとしての易発がん性とその標的臓器とともに保たれる可能性が示された。現在、これを、さらに検証するために、それらに対する皮膚発がん 2 段階モデル (DMBA+TPA)、および肝発がん 2 段階モデル (DEN+PB) を実施中である。

E. 結論

ダイオキシン類の発がん作用の高感度検出系として、発がんプロモーターに感受性を示すとされる TG/AC マウス (変異型 ras、v-Ha-ras の遺伝子導入マウス) を用いた発癌実験の予備実験を開始し、発がんの用量作用関係及び発がん過程における細胞間連絡の修飾と細胞増殖について検討した。また同様の検討を発がんイニシエーター感受性を示す proto-ras (c-Ha-ras) 遺伝子導入マウスにおいて検討し、TG/AC マウスと比較した。今後遺伝発現を含む遺伝子解析について作業を進めることにより、in vivo におけるイニシエーション作用の有無を含む発がん修飾メカニズムの解明が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kanno, J., Wakikawa, A., Utsuyama, M., Hirokawa, H. Effect of restraint on immune system and experimental b16 melanoma metastasis in aged mice. Mechanisms of ageing and development, 1997 93(1-3):107-117

Nishikawa A, Kase Y, Hayakawa T, Yanagisawa T, Kanno J, Hayashi Y Enhance ment of cell proliferation and prostaglandin biosynthesis by 1,8-dihydroxyanthraquinone in the rat large intestine.

Carcinogenesis, 1997 18(6):1259-1263

Okada Y, Kawakami S, Fukuda H, Nagahama K, Saito K, Ohtsuka Y, Kihara K, Morita T, Oshima H, Eishi Y, Kanno J. [Small cell carcinoma of the urinary bladder : a case report and review of Japanese literature][Article in Japanese]. Hinyokika Kyo 1997 43(10):739-742

井上 達、菅野 純 Topics on Toxicology (7). 内分泌障害性化学物質-その概念と問題点- J Toxicol Sciences 1997: 22(appendix):163-167.

菅野 純、井上 達 内分泌障害性化学物質の最近の諸問題. 1997 塩ビ食品衛生協会会報 121:1-10.

菅野 純、相賀 裕美子、井上 達, 化

学物質の生物毒性試験-内分泌障害性を中心- 1998 組織培養工学 24:268-271, 1998.

井上 達、菅野 純 エンドクリン問題の最近の動向 ポリ衛協会報 3:4-21, 1998

花田 信継、手島 英雄、木村 好秀、荷見 よう子、天神 尚子、有田 白峰、成高 和稔、菅野 純、谷澤 徹 悪性卵巣腫瘍と術前診断された後腹膜原発脂肪肉腫の一例. 日産婦関東連会報 35(4):411-416,1998

菅野 純 内分泌かく乱化学物質の生物影響 ファルマシア 3月号,35:219-223,1999

菅野 純 内分泌攪乱化学物質について-生物学的立場から- 有機合成化学協会誌 57(1):35-39,1999

菅野 純 内分泌かく乱化学物質について-生物影響の立場から- (特別講演の抄録)ビルと環境 84:10-15,1999

菅野 純 内分泌攪乱のメカニズムを考慮した生物試験 医学のあゆみ 190(7-8):751-752,1999

Takeo Iwata, Jiro Kamikawa, Tetsuro Higuchi, Kazuo Yagi, Tadashi Matsuzaki, Jun Kanno, Akihiko Maekawa Development of Invasive Adenocarcinoma in a Long-Standing Diverted Ileal J-Pouch for Ulcerative Colitis Dis Colon Rectum, January 2000 Vol 43.No.1 p101-104

2. 学会発表

なし

1) A. Ono, J. Kanno and T. Inoue, Conformational changes on ERA induced by endocrine disrupting chemicals (EDCs). Keystone symposia, 2000

3. その他

なし

2)佐井君江、菅野 純、黒川 雄二、井上達:Pentachlorophenol の肝培養細胞におけるアポトーシス阻害作用ならびにギャップ結合細胞間連絡阻害との関連: 第 58 回日本癌学会総会、広島(平成 11 年9月 29 日-10月 1 日)

3)平林容子、高木篤也、児玉幸夫、菅野純、黒川雄二、井上達:Mn-SOD 遺伝子導入マウス骨髄細胞での紫外線抵抗性:第 58 回日本癌学会総会、広島(平成 11 年9月 29 日-10月 1 日)

4) A. Ono, J. Kanno and T. Inoue, Mechanism based high through put screening method for chemicals (EDCs) using bio-sensor. 2nd European Workshop 99 International Molecular Toxicology 1999

5) 松島裕子、菅野 純、宮城恵理、井上達, 卵巣摘出ラットにおけるエストロゲン枯渇期間と子宮肥大反応の関係について, 日本内分泌攪乱化学物質学会第2回研究発表会 1999

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

アрилヒドロカーボン（ダイオキシン）受容体の機能調節に関する研究

分担研究者 藤井 義明 東北大学大学院教授

研究要旨

ダイオキシンに対する感受性の大きな差があるハムスターとモルモットについてアрилヒドロカーボン受容体（AhR）とその抑制因子（AhRR）について cDNA クローニングを行い、AhR については両動物種の構造を決定することができた。今後、AhRR についての研究を続けると共に、これまで得られているヒト、マウス、モルモット、ハムスターの AhR について構造と TCDD との結合活性について検討する。CYP1A2 はダイオキシンによって誘導されるがプロモーター領域には XRE がなく、その誘導機構は CYP1A1 と異なることが予想された。そのプロモーター領域をルシフェラーゼに結合して TCDD による誘導に働く DNA 配列を決定した。この配列は新しい配列で、これに結合する因子が GMSA で認められたが、AhR と Arnt ヘテロダイマーはこの因子に結合することが示唆された。AhRR による AhR の活性抑制はトリコスタチンによって解消されることからヒストンデアセチラーゼによることが示唆された。

A. 研究目的

ダイオキシンの生物作用を Ah 受容体による仲介作用を中心に分子レベルで明らかにすることを目的とする。Ah 受容体の標的遺伝子を differential cloning、differential display あるいは microarray 法を利用して検索する。また、ダイオキシンに対して感受性の大きな違いがあるモルモットとハムスターについて Ah 受容体と Ah 受容体リプレッサーの cDNA クローニングを行う。そして、その構造と性質を明らかにして、ヒト及びマウスで得られた結果も考慮して、動物のダイオキシンに対する感受性とこれらの生体内因子がどのように関連しているのかを検討する。さらに AhR 欠失マウスにこれらの動物の AhR 遺伝子を knock-in して、マウスのダイオキシン感受性がどのように変化するかを検討する。Ah 受容体リプレッサーについても、遺伝子欠失マウスを作製し、Ah 受容体で計画されている実験を行い、ダイオキシンの生物作用発現へこの因子がどのように関わっているかを

明らかにする。

B. 研究方法

3メチルコラントレン処理した動物（ハムスター、モルモット及びマウス）の肝及び肺から poly(A)RNA を調製し、cDNA ライブラリーを作製する。5'及び3'RACE 法により5'末端及び3'末端のcDNA の塩基配列を決定し AhR 及び AhRR の構造を決定する。これらの cDNA ベクターを発現ベクターに組み込んで、培養細胞にリン酸カルシウム共沈殿法によって導入して種々の動物種の AhR 及び AhRR を発現させて 3MC との結合活性や遺伝子発現活性化能を検討する。CYP1A2 のプロモーター領域を Hep3B 細胞に導入し発現活性を検討する。発現に必要な DNA 断片を用いて Gel Mobility Shift Assay (GMSA) を行い、この DNA 配列に結合する因子を同定する。さらにこの結合因子をアフィニティークロマトグラフィー等により精製する。AhR/Arnt ヘテロ2量体を用いて、この因子との相

相互作用を検討する。

C. 研究結果 及び D. 考察

RT-PCR 法と cDNA クローニング法を併用してハムスターとモルモットの AhR の全構造を決定した。ハムスターの AhR は 921 アミノ酸、モルモットの AhR は 833 アミノ酸からなるペプチドであり、ハムスターの AhR には 20 アミノ酸からなる 4 つの繰り返し構造が挿入されていることが明らかになった。この挿入配列と機能の関係は、今後、検討する予定である。さらに、ヒト、マウス、モルモット及びハムスターのリガント結合性、転写活性化能の比較検討を行い、構造と活性の関係を明らかにする。AhRR についてもヒト、マウス及びハムスターについては構造が明らかになっているので、モルモットについても検討を続けている。ヘテロサイクリックアミノなどの発癌物質の代謝活性化に強い活性を示す CYP1A2 の遺伝子発現については、Hep3B 細胞を用いて、3MC による誘導能に必要な DNA の塩基配列を転写開始点の約 2100 塩基上流に決めることができた。その配列は CATGN₆CTTG という配列で、これに結合する因子 X の存在を認めた。この誘導には AhR/Arnt が必要であるが AhR/Arnt は直接にこの配列に結合しないで因子 X に結合することが分かった。現在この X 因子の精製を試みている。AhR の転写活性をフィードバック的に阻害する因子 AhRR の作用メカニズムについては転写制御ドメインを C 末端の約 100 アミノ酸に限定した。また、この制御はヒストンアセチラーゼの阻害剤であるトリコスタチンによって解消されることからヒストンデアセチラーゼによることが示唆された。

E. 結論

モルモット及びハムスターの AhR の構造を決定した。AhRR の構造については

ハムスターの構造を決定した。CYP1A2 の 3MC あるいは TCDD による誘導に必要な塩基配列を決定し、その DNA に結合する因子の存在を示した。また、AhR/Arnt はこの因子に結合して転写を活性化することを示し、AhR/Arnt の新しい作用メカニズムの存在を示した。AhRR の AhR 活性の抑制はヒストンデアセチラーゼによることを示唆した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Y. Shimizu, Y. Nakatsuru, M. Ichinose, Y. Takahashi, J. Mimura, Y. Fujii-Kuriyama and T. Ishikawa. Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the arylhydrocarbon receptor Proc. Natl. Acad. Sci. USA in press

R.J. Denver, L. Quellte, D. Furling, A. Kobayashi, Y. Fujii-Kuriyama & J. Puymirat. Basic Transcription Element Binding Protein (BTEB) is a Thyroid Hormone-Regulated Gene in the Developing Ventral Nervous System : Evidence for a Role in Neurite Outgrowth. J. Biol. Chem. 274:23128-23134 (1999)

M. Ema, S. Ikegami, T. Hosoya, J. Mimura, H. Ohtani, K. Nagao, K. Inokushi, M. Katsuki and Y. Fujii-Kuriyama. Mild impairment of learning and memory in mice overexpressing mSim2 gene located in chromosome 16, an animal model of a Down syndrome. Hum. Molec. Genet. 8:1409-1415 (1999)

M. Ema, K. Hirota, J. Mimura, H. Abe, J. Yodoi, K. Sogawa, L. Poellinger and Y. Fujii-Kuriyama. Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and

HIF1a in response to hypoxia : their stabilization and redox signal induced interaction with CBP/p300. EMBO J. 18:1905-1914 (1999)

2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

J. Mimura, M. Ema, k. Sogawa & Y. Fujii-Kuriyama. Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. Genes Dev. 13: 20-25 (1999)

2. 学会発表

“内分泌攪乱化学物質の生体毒発現における Ah レセプターの役割” 藤井義明、三村純正、十川和博、依馬正次、小林聡 1999年10月9日 第72回生化学会 (パシフィコ横浜)

“Arnt3(=BMAL1)/Clock ヘテロダイマーの転写活性化機構の解析” 高畑祥、尾崎宣洋、十川和博、藤井義明 1999年10月7日 第72回生化学会 (パシフィコ横浜)

“GCbox 結合転写因子 BTEB 遺伝子欠損マウスの小脳機能失調” 守田匡伸、中島修、高橋智、島貫智匡、小林聡、今高寛晃、小倉博雄、山本雅之、藤井義明 1999年10月9日 第72回生化学会 (パシフィコ横浜)

“AhRR の転写抑制機構” 三村純正、馬場崇、十川和博、藤井義明 1999年12月9-10日 第22回分子生物学会 (福岡ドーム)

“ヒト HL60 細胞のマクロファージへの分化時における Ah レセプター遺伝子の発現に必要な DNA エlement” 川西政史、藤井義明、渡辺潤子、生田統悟、川尻要、十川和博 1999年12月9-10日 第22回分子生物学会 (福岡ドーム)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

神経薬理学的検討

分担研究者 三国 雅彦 群馬大学医学部教授

研究要旨

慢性可変ストレスおよびダイオキシン類の連続投与が成熟ラットの脳内代謝にどのような影響を及ぼすかを検討するために Sprague-Dawley 系雄ラットを用いて 1) 7 日間の慢性可変ストレス負荷群、2) TCDD 慢性投与群、3) 慢性可変ストレス及び生食慢性投与群、4) 生食慢性投与群の 4 群で [14C]-2-deoxyglucose を用いたオートラジオグラフィによって前頭皮質の糖代謝を比較したが、各群間で有意差はみられなかった。今後他の脳部位でも比較検討を行うとともに、胎生期でのダイオキシン類投与についてさらに検討する必要があると考えられた。

A. 研究目的

われわれはこれまで、ラット妊娠母胎への軽微なストレス性刺激の反復処置や合成副腎皮質ホルモンである dexamethasone の反復処置が雄性仔ラットの成熟後の視床下部におけるセロトニン濃度を増加させ、成熟後の新たなストレス性刺激に対する副腎皮質ホルモン分泌の過剰を引き起こすと共に不安や抑うつと関連する行動を出現させることを明らかにし、この胎性期のストレス性刺激の効果を伝達している物質の一つがグルココルチコイド受容体であることを示してきた。類似の研究として、新生児期における母ラットと仔ラットとを分離するストレスを毎日長時間行った報告でも、成熟後のストレス刺激に対する副腎皮質ホルモンの過剰分泌を引き起こすことが明らかにされているが、興味深いことに母仔分離ストレスを負荷している時期に、GABA-A 受容体・クローリオンチャネル複合体に作用して不安緩和作用を有するステロイドである tetrahydrodeoxycorticosterone (THDOC) を投与すると、母仔分離ストレスの成熟後の効果を予防できることが報告されている。したがって、胎性期や新生児期のストレス処置やグルココルチコイド受容体刺激は中枢神経系のその後の発達に直接影響し、

神経伝達物質濃度を変化させたり、ストレスに対する内分泌学的反応や行動学的変化を引き起こすが、これらの効果は同時に投与された不安緩和物質で防止可能であることを示唆している。

一方、胎性期の testosterone は細胞内のアロマトラーゼで代謝されて estrogens となって、神経系を男性化することが知られているが、新生児期の性ホルモン処置も成熟後のストレスに対する視床下部-下垂体-副腎皮質系の反応性を変えることも知られている。以上のように、様々な内分泌ホルモンが神経系の発達に関与し、ストレスに対する脆弱性を引き起こすこととも考えられている。

本研究では胎性期のストレス負荷や dexamethasone 処置が、胎性期に暴露されたダイオキシン類の影響を受けやすくするか否かについて明らかにすることを目的としている。これによって胎性期や新生児期のストレス刺激が神経系の発達に直接影響し、ダイオキシン類の暴露に対する脆弱因子を形成していることが明らかにできれば、治療法や予防法を確立するための対応が可能となる。

B. 研究方法

胎性期のストレス負荷や dexamethasone

処置が、胎性期に暴露されたダイオキシン類の影響を受けやすくするか否かについて明らかにする前に、慢性可変ストレスおよびダイオキシン類の連続投与が成熟ラットの脳内代謝にどのような影響を及ぼすかを検討するために以下の動物実験を行った。実験動物は Sprague-Dawley 系雄ラット（7週齢、体重 250-300 g）で、使用した薬物は 2,3,7,8-tetrachlorobenzo-p-dioxin (TCDD、10 μ g/kg、腹腔内投与)である。ラットを下記の4群 (n=5-6) に分け各群に以下のような処置を行った。

(1群) 7日間の慢性可変ストレス (chronic variable stress、CSV)

1日目：尾の痛み刺激5分間。

2日目：30分間の強制水泳 (水温 21 \pm 2 $^{\circ}$ C)。

3日目：1時間の金網による拘束。

4日目：17時間の絶食。

5日目：尾の痛み刺激5分間。

6日目：17時間の絶飲。

7日目：1時間の金網による拘束。2日目から6日目の5日間、ストレス負荷前に TCDD を投与。

(2群) CSV なし。1群と同じ期間、TCDD を投与。

(3群) CSV 実施、2nd day から 6th day の5日間、ストレス負荷前に生食を投与。

(4群) CSV なし。1群と同じ期間、生食を投与。

最終ストレス終了後、[14C]-2-deoxyglucose (2DG、50 μ Ci/rat、腹腔内投与)を投与し、45-60分後に断頭して 20 μ m の脳凍結切片を作成し、脳組織の単位面積当たりの放射エネルギーを BAS2000 で定量解析し、各群の前頭皮質糖代謝を比較検討した。

(倫理面への配慮)

本研究の過程で発生した TCDD 汚染物質 (動物死体、実験器具など) を安全に廃棄する方法が確立されるまで、全て凍結保存を行

った。

C. 研究結果

各群の前頭皮質糖代謝の平均値は1群 (TCDD+CSV) が 17.1 \pm 4.1 kBq/g、2群 (TCDD 投与群) が 20.5 \pm 1.6 kBq/g、3群 (生食+CSV) が 21.4 \pm 3.3 kBq/g、4群 (生食投与群) 19.8 \pm 5.0 kBq/g であり、各群間で有意差はみられなかった。

D. 考察

今回の検討で、ラット前頭前野における糖代謝を見た限りでは、慢性可変ストレス、さらにダイオキシン類の慢性投与および慢性可変ストレスとの複合処置のいずれも明瞭な影響を与えなかった。今後は海馬など他の脳部位も検討する必要がある。さらに我々が報告したように、胎生期の母体への軽微な慢性ストレス負荷が成熟後の神経内分泌機能に明らかな影響を与えた1)ことから、胎生期においてはダイオキシン類の暴露が仔ラットの中樞神経系の発達にいかなる影響を与えるか検討する予定である。

E. 結論

躁うつ病などの感情障害の一群では、視床下部-下垂体-副腎皮質 (hypothalamus-pituitary-adrenal、HPA) 系の feedback 機構の異常が認められているが、この feedback 機構に係っている神経細胞質内グルココルチコイド受容体は heat-shock proteins (HSPs) との重合によってステロイドホルモンへの親和性を維持しており、ステロイドと結合後、核内へ移行し核内遺伝子転写制御に関与している。最近の報告2)では成熟ラットを慢性可変ストレスに曝した場合と、慢性単一 (拘束) ストレスに曝した際には、前者では海馬における細胞質内グルココルチコイド受容体と HSP90 と重合の低下と共にグルココルチコイド受容体の核内移行が阻害されていた。

すなわち成熟後でも馴化の形成されにくいストレスに曝されることによって、グルココルチコイド受容体機能が障害され、躁うつ病などの精神疾患の病態の一つとして考えられる神経内分泌学的異常をきたしている可能性が有る。しかし、我々が報告したように、胎生期の母体への軽微な慢性ストレス負荷が成熟後の神経内分泌機能に明らかな影響を与えたことから、胎生期においてはダイオキシン類の暴露が仔ラットの中枢神経系の発達により大きな影響を与える可能性がある。

一方、ダイオキシン類と結合する aryl hydrocarbon (Ah)受容体も細胞質内であって、HSP90 と重合していることが明らかにされている3) ことから、ダイオキシン類が Ah 受容体/ を介してグルココルチコイド受容体機能に影響を与え、さらに中枢神経系機能に変化を与えている可能性が有る。これを検証するため、我々はヒトリンパ球においてデキサメサゾン刺激によるグルココルチコイド受容体の核内移行を免疫抗体法により観察し、さらにダイオキシン類の投与がこれに与える影響について検討中である。

F. 参考文献

1. 三国雅彦：胎生期ストレスによる神経系の発達に伴う可塑的变化と感情障害病態モデル。山脇成人編「感情機能と神経・免疫・内分泌－脳の世紀に向けて－」、1997 pp.55-67、新興医学出版社

2. Sasuga Y, Asakura M, Miyamoto S, Bodaiji N.: Influence of chronic variable stress (CVS) on the association of glucocorticoid receptor with heat-shock protein (HSP) 90 in rat hippocampus. Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi 1997 Oct;17(5):193-200

3. Heid SE, Pollenz RS, Swanson HI: Role of heat shock protein 90 dissociation in mediating agonist-induced activation of the aryl hydrocarbon receptor. Mol Pharmacol 2000 Jan;57(1):82- 92

研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. 実用新案登録
なし

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

ダイオキシン規制の国際動向

分担研究者 黒川 雄二 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

1990年にWHOによりはじめてダイオキシンのTDI（一日耐容摂取量）が、10 pgTCDD/kg bw/dayとされてから、世界各国・機関はそれぞれに毒性・暴露等の評価を行い、TDI等を設定してきた。日本では、厚生省が1996年に当面のTDIとして、10 pgTCDD/kg bw/dayを公表し、1997年に環境庁はダイオキシン類の健康リスク評価指針値を5 pg/kg/dayとした。その後、98年5月のWHOによる再評価で、TDIがコプラナーPCBを含んで、1-4 pg TEQ（毒性等量）/kg bw/dayとなった。その後、環境庁及び厚生省が専門家会合（中央環境審議会環境保健部会ダイオキシンリスク評価小委員会及び生活環境審議会・食品衛生調査会ダイオキシン類健康影響評価特別部会）を組織し、その合同会合においてTDIの見直しが行われ、1999年6月にコプラナーPCBを含め、4 pgTEQ/kg/dayを当面のTDIとすることが適当であるとした。

1. はじめに

ダイオキシン類がヒトの健康に重大な影響を及ぼすことは、1980年代から世界的に大きな問題となってきた。日本では、1984年に「廃棄物処理に係るダイオキシン等専門家会議」を設置し、評価指針として100 pg/kg bw/dayをまず提示した。その後、WHO/EURO（欧州地域事務局）は1990年に、TDI（Tolerable Daily Intake、耐容一日摂取量）として、10 pg/kg bw/dayを公表し、世界的に多大なる影響を与え、各国での規制値設定を促した。厚生省でも、1990年に「ダイオキシン類発生防止等カイトライン」を決め、さらに調査研究班を設けて、「ダイオキシンの毒性発現機構に関する調査研究」（1992-94年度）¹⁾、「ダイオキシンのリスクアセスメントに関する研究」（1995-97年度）²⁾を行ってきた。1996年6月には、当面のTDIとして10 pg/kg bw/dayを中間発表している。本稿では、その間に国内外で設定された規制値等について、その設定根拠などを概略する。なお、1998年5月にWHO/EUROにより開催され

た「TDI再評価会議」の結果、TDIがWHO-TEF*を用いて、1-4 pg TEQ/kg bw/dayとなり、世界的に特に日本に大きな影響を与えた。

その後、環境庁及び厚生省が専門家会合（中央環境審議会環境保健部会ダイオキシンリスク評価小委員会及び生活環境審議会・食品衛生調査会ダイオキシン類健康影響評価特別部会）を組織し、その合同会合においてTDIの見直しが行われ、1999年6月にコプラナーPCBを含め、4 pgTEQ/kg/dayを当面のTDIとすることが適当であるとした³⁾。

本稿では、ダイオキシン類とはポリ塩化ダイベンゾダイオキシン(PCDD)及びポリ塩化ダイベンゾフラン(PCDF)を意味する。2,3,7,8-テトラクロロジベンゾダイオキシンは、ダイオキシン又はTCDDと記した。

*TEF (Toxic Equivalency Factor, 毒性強度) は、TCDDの毒性を1としたときの、他のダイオキシン類の毒性を比較するために設定されている。従って、他のダイオキシン類の暴露量がわかればそれらを乗算して、総合的な毒性

をTEQ (Toxic Equivalent, 毒性等量) として求められる。なお以前の、I(International)-TEFはコプラナーPCBを含んでいない。

2. リスクアセスメントにおけるTDI等について

周知の如く、リスクアセスメントは、有害性確認に始まり、用量反応評価、暴露評価、リスク判定などの段階を経て行われている³⁾。用量反応評価の段階における目的は、適切な毒性試験ないし疫学データからNOAEL (No-Observed-Adverse-Effect-Level、無毒性量) ないしNOEL (No-Observed-Effect-Level、無影響量) を導き出すことにある。勿論、NOAELが求められないときには、LOAEL (Lowest-Observed-Adverse-Effect-Level、最小無毒性量) を用いることになる。その場合、どの種類の毒性をエンドポイントにするかによって同じデータからでも異なった値が得られるが、通常、安全性を考慮して、低濃度で鋭敏に現れ、且つ重篤な症状を呈する毒性を採用する。その後、用量反応評価の段階で、NOAELをヒトに外挿するための不確実係数(UF, Uncertainty Factor)で割ることにより、TDIを算出する。なお、TDIとは、「健康影響の観点から、一生涯摂取しても、一日当たりこの量までの摂取が耐容されると判断される量。本来混入することが望ましくない環境汚染物質(ダイオキシン類は最適の例)などの場合に用い、摂取する利益がないことから、一般に、暴露は最小限に抑えられることが望ましい」と定義されている。一方、ADI (Acceptable Daily Intake、許容一日摂取量)は、「健康影響の観点から、一生涯摂取しても、一日当たりこの量までの摂取が許容されると判断される量。それを使用することによる利益があり、意図的に使用される物質(例、食品添加物、農薬)の場合に用いられる」という定義であり、不確実係数と同様な根拠ではあるが、安全係数(SF, Safety Factor)が通常用いられる。

不確実係数の値は、通常、動物とヒトの種差

を考慮した係数10にヒトの個体差を考慮した係数10を掛けた100である。しかし場合によっては、毒性の重篤性、実験内容の質的因子、LOAELのみのとき、短期試験データのみとき等を考慮して、それぞれ最大10の不確実係数を付加することもある。

以上は、毒性発現に閾値ありと判断された場合であるが、一方、遺伝子毒性を示す発がん物質のように閾値なしとした場合には、数理モデルを使ってVSD (Virtually Safe Dose、実質安全量) を算定することになる。通常は、発がん危険度を 10^{-6} として計算している。

3. 国内外のダイオキシンに関するTDI等の規制値

3.1. 設定根拠の概要

これまでのところ、疫学調査及び文献においてヒトへの暴露量の算出が正確に行えるものがほとんどないということから、各機関におけるダイオキシン類暴露規制あるいは許容濃度の算出には、全て動物実験のデータが使用されている。実験としては、TCDDによる雌ラットの肝発がん性または生殖発生毒性が、多くの機関で採用されている。

肝毒性をエンドポイントとする場合は、雌ラットの肝臓の過形成結節を基に得られたKocibaらの実験のNOAELである1 ng/kg bw/dayという値が主として採用されている⁴⁾。生殖発生毒性をエンドポイントする場合は、Murrayらによる生殖機能異常のNOAELである1 ng/kg bw/dayという値が採用されている⁵⁾。しかし最近になって、TCDDを用いたRierらによるアカゲザルの慢性毒性試験における子宮内膜症発症にかかるNOAELないしLOAELを取り入れる傾向もある(これらの実験概要は後述)⁶⁾。

また、同じ動物実験データを用いる場合でもヒトへの外挿に対して異なったモデルを用いれば、機関ごとの規制値にばらつきが生じる。各国・機関での規制値は、“閾値あり”または“閾値な

し”の算出モデルをとっており、この両者のモデルのうちどちらを選択するかによって、その値に大きな隔たりを生じている。

“閾値あり”の用量相関関係モデルを採用する各国・機関は、ダイオキシン類がヒトにおいて遺伝子毒性がないという前提に立っており、Kociba らまたは Murray らの報告による NOAEL または NOEL 値を不確実係数(又は安全係数)で割ることにより、規制値を算出している。不確実係数(又は安全係数)は、実施機関によって算出法が異なるが、結果的には 100~1000 の値が採用されている^{7,8)}。

ダイオキシン類による発がん性に“閾値なし”とし、低用量でも直線性が存在するとする用量相関モデルを採用した機関は米国のみであり、Kociba らの報告をもとに線形多段階計算モデル (Linearized Multi-stage Model, LMS model) 法により算出している (Table 1) (Table 2)。

3. 2. “閾値あり”モデルを採用した規制値

3. 2. 1. WHOのTDI

1990年にWHOでは、TCDDは動物で発がん性をもつが、ヒトでは結論はでないとした。そして、この化合物にはプロモーター作用があるが、遺伝子毒性はないと考え、一般毒性を示すものと同等にとらえて規制値を算出した⁹⁾。様々な種の動物で実験された生殖発生毒性及び免疫毒性データに基づき、NOELを1 ng/kg bw/day であると結論づけた。そして、過去のリスクアセスメントにおける不確実性を大きく軽減する新しい方法を取り入れている。即ち、ヒトと動物での組織内濃度を比較することが可能だとして、薬物動態学的解析により、このNOEL値1 ng/kg bw/day は、ラット肝濃度では540 ng/kg bw であり、ヒト一日摂取量として100 pg/kg bw に同等であるとした。不確実係数は、ヒトにおける生殖発生毒性に関する十分な知見がないことから、10の値を採用し、TDIと

して10 pgTCDD/kg bw/day を提案した。一方、母乳からの摂取がTDIを上回るという事実にふれて、TDIは一生涯摂取量に関するものであり、乳児には適用すべきではないと述べ、計算上6ヶ月の授乳期摂取量は、一生涯摂取量の5%以下であるとしている。

3. 2. 2. 各国・機関の規制値

ドイツでは、1985年と早くから規制値を設定している。ラットにおけるKocibaとMurrayの実験からNOAEL値として1 ng/kg bw/dayを採用し、安全係数100-1000を使用して、TDIを1-10 pg/kg bw/day と幅を持たせている。この中で、1 pg/kg bw/day は安全サイドに立った目標としての値であり、10 pg/kg bw/day は、これを超えると緊急に行政措置がとられるべき値とされている。

北欧諸国(スウェーデン、ノルウェー、フィンランド、デンマーク)では、ラット発がん性及び生殖発生毒性試験の報告よりNOEL値は、1 ng/kg bw/day であるとしたが、このNOEL値が全く疑いのないものとしては、確立していないとして安全係数を200として、5 pg/kg bw/day という値とした。さらに、ダイオキシン類の毒性が組織濃度に依存し、steady stateに至るまで長時間を要すること等を考慮し、1週間当たりの規制値TWI (Tolerable Weekly Intake) として、35 pg/kg bw/week という値を推奨している。これは、魚を多食することからたまたま一日当たりのダイオキシン類摂取量が5 pg/kg/day を上回るとしても、1週間単位で35 pg/kg/day をこえなければよいという発想でもある。なお、WHOのTDIにおける不確実係数に対しては、種差を考慮してさらに2を加え、200にすべきとの見解を表明し、同時に北欧での200を正当化している。

カナダ厚生省では、1990年にMurrayらの生殖発生毒性試験から、NOAELを1 ng/kg bw/day としTDI 10 pg/kg bw/day としている。不確実係数は100であるが、それは通例の考え方ではなく、個体差とダイオキシンの重

篤な毒性を加味しているもので、ヒトは動物よりダイオキシン類への毒性感受性は低いとして種差を考慮していない点が注目される。しかし州によっては、TDIを1-2 pg/kg bw/dayとしているところもある。

☆ オランダでは、1982年にKocibaらの実験でNOAELとされている1 ng/kg bw/dayでもまだ有害性影響が見られるとし不確実係数250を適用して、4 pg/kg bw/dayを規制値に決めていたが、1991年にWHOの提案を受け入れて、10 pg/kg bw/dayの規制値を取り入れた。しかし1996年になって、その10 pg/kg/dayの基になった実験で見られた影響はやはり有害性を有すると考えた。そして、Rierらのサルの実験での100 pg/kg bw/dayを幼弱動物での精神発達障害、雌での子宮内膜症発現等を理由からLOAELとし、不確実係数100（種差5、個体差10、LOAELからNOAELへの変換2）を適用して、1 pg/kg bw/dayという数字を出した。しかしこれは、オランダの国家保健審議会からの答申値であって未だ規制値ではないということである。

英国COT（Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment）では、その値を超えたときに、環境中のレベルを下げるための調査と方策を始めるという意味合いで、TDIではなくガイドラインレベルという値を最初に設定した。Kocibaらのデータから発がん性に対するNOAEL値は10ng/kg bw/dayとし、安全係数1,000（発がん性を加味し、10を付加係数）を使って10 pg/kg bw/dayという値を算出した^{10,11)}。一方、アカゲザルを用いた生殖毒性試験の結果より、NOAEL値を0.12 ng/kg bw/dayとし、一般毒性に対する安全係数100を用いて、1 pg/kg bw/dayを算出している。結局、ガイドラインレベルとしては、1pg/kg body wt/dayを採用しているが、これをTDIとして採用すれば、リスクを過大評価することになるとしている。しかし、最終的には1991年に上記のガイ

ドラインレベルを廃し、WHOの提案したTDI 10 pg/kg bw/dayを採用している。

3. 2. 3. 厚生省のTDI

日本においては厚生省がまず1984年に、ダイオキシン類の評価指針として、油症患者からNOAELを1 ng/kg bw/dayとし、安全係数10を用いて、100 pg/kg bw/dayを提示した。その後、1995年からは、規制値設定を目標として、厚生科学研究「タ"イオキシンのリスクアセスメントに関する研究」班を発足させ調査研究に当たった。その際、原則として、ダイオキシン類のうち最も実験的・疫学的データの豊富なTCDDについて、特に経口暴露条件でのものについて、国際的な総説（WHO、EPA等）を用いて調査することとした。その結果、1996年6月に当面のTDIとして10 pg/kg bw/dayを提案し食品衛生調査会に答申後、公表した。規制値設定の前提として、①ダイオキシン類は非意図的生産物であり、環境経由で摂取するものであるため、ADIよりもTDIをもちいること、②実験動物で発がん性はあるが、遺伝子毒性はなくプロモーター作用物質であることから、閾値が設定できること、③従って一般毒性評価と同様にNOAELを基にTDI設定をすることができると等の3点を明確にした。根拠とするデータとして、Murrayらの生殖発生毒性試験及びKocibaらの慢性毒性試験等を用い、総合的に判断してNOAEL 1 ng/kg bw/dayとし、これに不確実係数100を適用して、TDIを設定した。ただし、これらは既存データを基としたもので、国内外の日進月歩の研究状況を考慮し、今回のTDIを当面のものとするのが適当と判断した。

3. 2. 4. 環境庁の健康リスク評価指針値

環境庁では1996年5月にダイオキシンリスク評価検討会を設置し、調査・研究を開始して、同年11月には、TDI等とは異なる健康リスク評価指針値として5 pg/kg bw/dayを公表した¹²⁾。この独自の指針値の定義は、①ダイオキシン類に係る環境保全対策を講ずるに当たって

の目安となる値、②人の健康を維持するための許容限度としてではなく、より積極的に維持されることが望ましい水準として人の暴露量を評価するために用いる値である、としている。この指針値の設定根拠に用いたのは、Kocibaらの発がん性試験であり、肝過形成結節を指標とした NOAEL 1 ng/kg bw/day に不確実係数 100 (種差 10、個体差 10)、または肝がんを指標とした NOAEL 10 ng/kg bw/day に不確実係数 1000 (種差 10、個体差 10、影響の重大性 10) をそれぞれ適用して、10 pg/kg bw/day という数字をまず算出した。さらに Rierらのアカゲザルの実験における子宮内膜症発生に用量相関関係があること、発症にホルモン・免疫作用の関与が想定されること等から、付加係数として2を加え健康リスク評価指針値として 5 pg/kg bw/day を導き出したものである。最近オランダにおいてアカゲザルの実験における LOAEL からTDIを設定した事実に影響されたと推察されるが、実際の LOAEL 値を用いることはしていない。

3. 2. 5 我が国におけるTDIの見直し

環境庁及び厚生省が組織した専門家会合(中央環境審議会環境保健部会ダイオキシンリスク評価小委員会及び生活環境審議会・食品衛生調査会ダイオキシン類健康影響評価特別部会)はTDIの見直しを行い、1999年6月に、未解明の面が残されているが、既存の科学的知見を対象とした論議を踏まえ、2,3,7,8-TCDDとして86ng/kgの体内負荷量の値に対応するヒトの1日摂取量43.6 pg/kg/dayに不確実係数の10を適用した数値を根拠に、コプラナーPCBを含め、4 pgTEQ/kg/dayを当面のTDIとすることが適当であるとした¹³⁾。

3. 3. 閾値なしモデルを採用した規制値

低用量でも直線性が存在するとする用量相関モデルを採用した機関は米国のみであり、線形多段階計算モデル(Linearized Multi-stage

Model, LMS model)法により 1×10^{-6} の発がんリスクにおける上限値を示すものとしてRsD(Risk Specific Dose)値を算出している。しかしRsD値における実際のリスクは 1×10^{-6} 以下でゼロになる可能性もある。さらにこれらの値は直接許容量などを示すものではなく、各種化学物質の 1×10^{-6} 発がんレベルにおける量の比較に役立つものである。米国EPA及びFDAでは、Kocibaらの用量相関関係のある雌ラット肝腫瘍の実験データを基に、それぞれ0.006 pg/kg bw/day、0.057 pg/kg bw/dayという値を導き出している⁷⁾。また米国CDC(Center for Disease Control)では、0.028 pg/kg bw/dayを下限值として算出している¹⁴⁾。同じKocibaらのデータを基に計算しているにもかかわらず各機関で結果が違ふのは、計算に組み入れる危険率(q1)などのファクターの解釈の仕方に依存している結果である。

3. 4. 米国ATSDRにおけるMRL

現在米国ATSDR(Agency for Toxic Substances and Disease Registry)発行のToxicological Profileにおいて再評価が進行中である¹⁵⁾。そこでは、新しくMRL(Minimal Risk Level)という値が示されている。これは、「特定された期間において、がん以外の特に問題となる健康影響が見られないであろう、有害化学物質に対するヒト一日暴露量」と定義されている。従って、MRLは動物実験によるがん以外の健康影響のみ(ただし、不可逆性の肝、腎傷害と発生毒性を除く)に基づき、NOAELと不確実係数により算出されている。ATSDRでは、これらを有害廃棄物の特定及び有害廃棄物処理場における健康影響を検討するためのスクリーニングレベルとして用いており、規制値としては用いられていないが、一般論としてヒトは動物に比べて毒性に感受性が高く、さらにヒトにおいても、小児、老人、栄養・免疫不良などを考慮して、MRLの値は動物のNOAELより極力低く設定している。

現在、MRLとして急性（1－14日）、亜慢性（15－364日）及び慢性（365日以上）が、経口と吸入暴露に対して出されている。慢性暴露におけるMRLは、Schantzらのデータをもとに、1 pg/kg bw/dayという値が出されている。この実験では、食餌中濃度5 ppt（WHO計算方式120 pg/kg bw/dayに相当）のTCDDを摂取した母親アカゲザルから生まれた子ザルに社会的行動異常が認められるというもので、LOAELとして位置づけられている¹⁶⁾。したがって、不確実係数としては、データが最小LOAELということで3を、さらに種差3と個体差10をあわせて約100を用いている。その他、急性経口MRLとして、B6C3F1マウスにおける感染症に対する抵抗力低下から、200 pg/kg bw/day¹⁷⁾、亜慢性経口MRLとして、モルモットにおける胸腺重量低下から20 pg/kg bw/day¹⁸⁾が示されている。

3.5 非発がん性影響に対するRfDとMoE

EPAではこれまで発がん性以外の毒性に対しては、RfD(Reference Dose)を用いてきた。RfDとは、この値以下のレベルでは、一切の毒性が発現しないとされる量であるが、許容量を設定するためではなく、上述のRsDの如く、各種化学物質の毒性を比較するに役立つ。しかし問題点として、発がん性におけるような用量相関曲線が、多くの非発がん性影響では得られないことと、特にダイオキシン類の場合にはRfDがバックグランド値の10ないし100分の一になることであり、実用的ではない。1996年にEPAはMoE(Margin of Exposure)という概念をダイオキシン類の安全性評価に取り入れた。これは平均的なバックグランド値と有害性影響の発現を比較するものであり、MoEを約10とした。即ち、バックグランドレベルの10倍に達しない場合には、動物実験又はヒト集団において有害性影響は見られていない。MoEは発がん性と非発がん性の影響を比較するには極めて有用だと考えられているが、EPAではまだ

協議中である。

4. 文献

- 1) 生活環境調査研究事業「ダイオキシンの毒性発現機構に関する調査研究」報告書、平成4－6年度
- 2) 厚生科学研究費「ダイオキシンのリスクアセスメントに関する研究」中間報告書、平成7－8年度
- 3) 国立医薬品食品衛生研究所「化学物質のリスクアセスメント」編集委員会編、厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修：化学物質のリスクアセスメント、現状と問題点、薬業時報社、東京、pp.101-114(1997)
- 4) Kociba,R.J., Keyes,D.G., Beyer,J.E., Carreon,R.M., Wade,C.E., Dittenber,D.A., Kalnins,R.P., Frauson,L.E., Park,C.N., Barnard,S.D., Hummel,R.A., and Humiston,C.G. : Toxicol. Appl. Pharmacol.,46, 279-303(1978)
- 5) Murray,F.J., Smith,F.A., Nitschke,K.D., Humiston,C.G., Kociba,R.J. and Schweta,B.A.: Toxicol. Appl. Pharmacol., 50, 241-252(1979)
- 6) Rier,S.E., Martin,D.C., Bowman,R.E., Dmowski,W.P. and Becker,J.L.: Fund. Appl. Toxicol., 21, 433-441(1993)
- 7) Coulston,F. and Kolbye,A.C.Jr.: Regul. Toxicol. and Pharmacol., 20, (1) Part2 of 2 Parts, S960-S1029(1994)
- 8) Environmental Protection Agency (EPA), Health Assessment Document for 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds. (1994)
- 9) WHO Summary Report of "Consultation on Tolerable Daily Intake from Food of PCDDs and PCDFs" EUR/ICP/PCS 030(S) 0369n(1991)
- 10) Bowman,R.E., Schantz,S.L., Gross,M.L. and Ferguson,S.A.:Chemosphere, 18, 235-

242(1989a)

11) Bowman,R.E., Schantz,S.L., Weerasinghe,N.C., Gross,M.L. and Barsotti, D. A.:Chemosphere, 18, 243-252(1989b)

12) ダイオキシンリスク評価検討会報告書、環境庁（1997）

13) ダイオキシンの耐容一日摂取量TDIについて、中央環境審議会環境保健部会、生活環境審議会、食品衛生調査会（1999）、

14) Kimbrough,R.D., Falk,H., Stehr,P. and Fries,G.F. :J.Toxicology and Environmental Health, 14, 47-93(1984)

15) Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR): Toxicological Profile for Chlorinated dibenzo-p-dioxins(Update, Draft for Public Comment)(1997)

16) Schantz,S.L., Barsotti, D.A., Allen, J.R.:Toxicol. Appl. Pharmacol., 48, A180,(1979)

17) Burleson,G.R., Lebrec,H., Yang,Y.G. : Fund. Appl. Toxicol., 29, 40-47(1996)

18) DeCaprio,A.P., McMartin,D.M. and O'Keefe,P.W.:Fundam. Appl. Toxicol., 6:454-463(1986)

5. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし