

2. 学会発表

- 1) Kanno J, Kato H, Inoue T, Uterotrophic effect of dietary genistein/daidzein-Modification of NIH-07open formula-. Hormones and Endocrine Disrupters in Food and Water: Possible Impact on Human Health Copenhagen, Denmark, 27-30 May 2000

- 2) Kimie Sai , Jun Kanno, Tohru Inoue, and Toyozo Kaneko, Effects of TCDD on GJIC and cell growth in v-ras-transfected rat liver epithelial cells. Dioxin 2000, August 13-17, 2000

- 3) Jun Kanno, Kimie Sai, Ryuichi Hasegawa, James. E. Trosko and Tohru Inoue, Prevention of the down-regulation of gap junctional inter-cellular communication by green tea in the liver of mice fed pentachlorophenol. The 2nd Congress of Asian Society of Toxicology ASIATOX II, August 23-25, 2000

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. その他
なし

アрилハイドロカーボン(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 東北大学大学院理学研究科教授

研究要旨

アрилハイドロカーボン受容体(AhR)が直接 XRE に結合して標的遺伝子の発現を活性化するメカニズムの他に AhR と Arnt のヘテロ2量体がコアクチベーターのように DNA 結合性の転写因子に結合して転写を活性化するメカニズムがあることを発見した。CYP1A2 遺伝子の発現は AhR を欠失したマウスでは、その構成的発現は残っているが、ダイオキシンやメチルコラントレンによる誘導的発現は失われる。CYP1A1 の発現が AhR の欠失マウスでは構成的発現も、誘導的発現も全く失われることと対照的である。CYP1A2 プロモーター領域にこの発現に関与しているエンハンサー配列(CATG N₆ CTIG)を見出し、この配列に結合する因子を精製して、その部分アミノ酸配列からその因子の cDNA を単離した。AhR と Arnt のヘテロ2量体はこの因子に結合して CYP1A2 の誘導的発現をコントロールする。

A. 研究目的

CYP1A2 は CYP1A1 と同様にメチルコラントレンやダイオキシンなどによって、その発現は誘導される。しかしその発現様式は異なっている。すなわち CYP1A2 は肝臓特異的に、構成的に発現し、誘導剤によってその発現は増強されるのに対し、CYP1A1 は、通常では殆ど発現していないが、誘導剤によって、上皮組織に誘導的に発現する。従って、AhR 欠失マウスでは CYP1A1 の発現は全く見られなくなるのに対し、CYP1A2 については構成的発現は見られるが、誘導的な発現増強は見られなくなる。この2つの P450 における発現様式の違いを分子レベルで明らかにすることが目的である。また AhR の欠失マウスを用いてベンツピレンによる発癌性を検討することも行う。

B. 研究方法

マウスの CYP1A2 遺伝子のプロモーター領域を CAT 遺伝子上流に結合したレポーター遺伝子を用いた実験により、遺伝子上流 2.1kb 付近に誘導剤に応答する配列が存在することを以前の実験から得ていたため、この配列に系統的に変異を導入したレポーター遺伝子を作製し、Hepa-1 細胞、または Hep3B 細胞に導入して、エンハンサー配列を決定し、その配列に結合する因子をゲル易動度シフト法によって検討する。また AhR と Arnt がこの誘導にどのように関わっているのかを明らかにする。

AhR 欠失マウスのベンツピレン発癌感受性については東大・院・医・石川隆俊教授グループと共同実験により行う。

C. 研究成果及び D. 考察

CYP1A2 遺伝子のプロモーター活性の解析より 24 塩基対が薬物による誘導的発現に重要な領域であることが分かったので、この配列に系統的に変異を導入して、プロモーター活性を測定した結果 CATG N₆ CTTG 配列(XRE2)が遺伝子発現に重要な配列であることが示された。またこの配列に特異的に結合する因子 X の存在がゲル易動度シフト法で確かめられたが、AhR/Arnt ヘテロ2量体は直接結合しないことも示された。しかし、AhRとArntはDNA結合因子Xに結合して、間接的にXRE2に結合することがゲル易動度シフト法によって明らかになった。X因子との相互作用は主にArntによるらしい。ゲル易動度シフト法によって、この因子Xは腎臓に多く発現していることが分かった。従ってX因子の精製はマウスの腎臓を用いて行った。DEAEセルロース、ヘパリンセファロースカラムクロマトグラフィーとエンハンサー配列を樹脂に結合させたアフィニティークロマトグラフィーによって精製し、アクリルアミドゲル電気泳動で2つの主成分と2つの副成分から成る精製標品を得た。これらの2つの主なバンドをゲルより溶出して、エンハンサー配列への結合活性を検討した結果、2つのバンド共にDNA結合活性を持っていることを示した。リジルエンドペプチダーゼによる加水分解産物をHPLCによって分離した結果、これらのタンパク質は共通の部分と特異的な部分をもつタンパク質のファミリーであることが予想された。分離されたペプチドの部分アミノ酸配列を決定して、タンパク質のデータベースを対照した結果、既知の転写因子であることが判明した。cDNAを発現ベクターに組み込んでタンパク質を合成して、DNA結合活性をゲル易動度シフト法で検討したところ、転写因子は

CYP1A2のエンハンサー配列に結合することが示された。現在、AhR/Arntと転写因子Xとの相互作用を検討している。

またベンツピレンによる発癌に対するAhR欠失マウスの感受性を東大・医・石川教授グループと共同実験で検討した。その結果、野生型マウスはベンツピレンの皮下注射及び皮膚への塗布のいずれの投与方法でもすべてのマウスに癌の発生が観察されたが、AhR欠失マウスは用いたすべてのマウスで癌の発生は認められなかった。この結果からベンツピレンの発癌にAhRが強く関与していることが明らかになった。

E. 結論

AHRの新しい作用メカニズムを明らかにした。このことによってAhRの新しい標的遺伝子が見出される可能性が出て来た。また、AhR/ArntはbHLH-PAS構造モチーフを持つ転写因子であるが、同じ構造モチーフを持つので、コアクチベーターとして発見されたSRC-1、pCIPなどが知られている。AhR/ArntはDNA結合性転写因子としても働き、コアクチベーターとしても働く多機能性の因子であることが分かった。AhRはベンツピレンの発癌に関与していることが明らかにされたが、奇型や胸腺萎縮等多くのダイオキシンの生物作用にも関与していることが証明されて来ており、ダイオキシンの示す生体毒の殆どに関与している可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimizu, Y., Nakatsuru, Y., Ichinose, M., Takahashi, Kume, Y.H., Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y. & Ishikawa, T. Benzo[a]

- pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **97**, 779-782 (2000)
- 2) Takahata, S., Ozaki, T., Mimura, J., Kikuchi, Y., Sogawa, K. & Fujii-Kuriyama, Y. Transactivation mechanisms of mouse clock transcription factors, mClock and mArnt3. *Genes to Cells*, **5**, 739-747 (2000)
 - 3) Nakayama, M., Takahashi, K., Kitamuro, T., Yasumoto, K., Katayose, K., Shiota, K., Fujii-Kuriyama, Y. & Shibuhara, S. Repression of heme oxygenase-1 by hypoxia in vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **271**, 665-671 (2000)
 - 4) Hosoya, T., Oda, Y., Takahashi, S., Morita, M., Kawauchi, S., Ema, M., Yamamoto, M. & Fujii-Kuriyama, Y. Defective development of secretory neurons in the hypothalamus of Arnt2-knockout mice. *Genes to Cells*. In print (2001)
2. 学会発表
- 1) "Regulation and function of Ah receptor and ARNT heterodimer" Fujii-Kuriyama, Y. (招待講演) (NIEH)
 - 2) "Repression mechanisms of AhR/Arnt heterodimer by AhRR" Mimura, J., Baba, T., Sogawa, K. & Fujii-Kuriyama, Y. 2000/4/17-20 2000 PAS Proteins:Sensors of Environmental and Developmental Signals (USA)
 - 3) "Regulatory Mechanisms of Ah (Dioxin) Receptor Functions" Fujii-Kuriyama, Y. 2000 / 4/20 2000 Special Biochemistry Seminar (Vanderbilt Univ. USA)
 - 4) "アリルハイトロカーボン(ダイオキシン)受容体の転写活性化機構とその調節" 藤井義明 2000/6/3 日本生化学会東北支部会 (盛岡地域交流センター)
 - 5) "Regulatory Mechanisms of Ah Receptor Function" Fujii-Kuriyama, Y., Mimura, J., Sogawa, K. & Baba, T. 2000/7/6-10 International Workshop P450 (From Sequence to Function:Experimental and Bioinformatic Studies of Cytochrome P450 Superfamily P450 Moscow-2000) (Moscow, Russia)
 - 6) "Regulatory Mechanisms of Transcription Activity of Ah Receptor" Fujii-Kuriyama Y. 2000/7/10-14 13th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations (Congress Center Stresa, Italy)
 - 7) "環境因子と転写因子" 藤井義明 2000/7/20-22 内分泌・代謝学サマーセミナー (北海道)
 - 8) "Ah 受容体の機能と調節" 藤井義明 2000/8/23-25 日本比較免疫学会(東京)
 - 9) "芳香族炭化水素受容体ノックアウトマウスにおける三種の発がん性芳香族炭化水素の発がん感受性" 中鶴陽子¹、清水靖仁¹、小田秀明¹、岩坂茂^{1,2}、藤井義明²、石川隆俊³(¹東大・医・分子病理、²東北大・理・化学、³大学評価・学位授与機構)
 - 10) "Ahレセプター・Arnt二量体によって仲介されるラット P4501A2 遺伝子の新しい誘導機構" 十川和博、菊池康夫、藤井義明(東北大・理・化学)
 - 11) "ヒト AhR 遺伝子の単球分化に伴う転写調節" 渡辺潤子¹、角純子¹、生田統悟¹、本間義夫¹、十川和博²、藤井義明²、川尻要¹(¹埼玉がんセ・研、²東北大・院理・化学) 2000/10/4-6 日本癌学会(横浜)
 - 12) "Ah 受容体の機能とその調節" 藤井義明^{1,2}、三村純正¹、馬場崇^{1,2}、十川和博¹(¹東北大院・理・化学、²科技団・CREST)

- 13) “生殖腺の性分化と核内受容体の機能” 諸橋憲一郎^{1,2,3}、中村直仁^{1,2}、鈴木大河^{1,4}、向井徳男^{1,5}、難波智^{1,6}、水崎弘文^{1,3}、河辺 顕^{1,7}、藤井義明^{2,8}(¹ 基生研、² 科技団・CREST、³ 総研大院、⁴ 京大院・ウイルス研、⁵ 北大院・医、⁶ 東大院・医、⁷ 九大院・医、⁸ 東北大院・理)
- 14) “AhRR 遺伝子の発現制御機構の解析” 馬場崇、三村純正、十川和博、藤井義明(東北大・院・理)
- 15) “ラット P4501A2 遺伝子に見いだされた新しい XRE 配列とその性質” 十川和博¹、高橋智¹、松下夏樹¹、沼山恵子¹、三浦千沙¹、仁川純一²、菊池康夫¹、藤井義明¹(¹ 東北大院・理・化学、² 九州工大・情報工・生物化学システム工)
- 16) “AhRR による転写抑制機構” 三村純正、馬場崇、十川和博、藤井義明(東北大院・理)
- 17) “大腸菌で発現させた PAS ドメインの性質と結晶化” 菊池康夫、三村純正、依馬正次、十川和博、藤井義明(東北大・院・理)
- 18) “新生マウスの酸素負荷網膜症発症モデルの血管新生における HLF の役割” 守田匡伸¹、中島修²、高橋智²、川内紫真子²、山下年晴¹、依馬正次¹、柴原茂樹³、鶴殿徹男³、富田浩史³、玉井信³、十川和博¹、山本雅之²、藤井義明¹(¹ 東北大・院・理、² 筑波大・TARA セ、³ 東北大・院・医)
- 19) “ヒト血管内皮細胞における低酸素によるヘムオキシゲナーゼ1の発現抑制” 中山雅晴¹、高橋和広¹、北室知己¹、安元研一¹、片寄大²、白土邦男²、藤井義明³、柴原茂樹¹(¹ 東北大・医・分子生物、² 東北大・医・循環器病態、³ 東北大・理・化)2000/10/11-14 日本生化学会(横浜)
- 20) “生物の環境応答と bHLH-PAS 転写因子” 藤井義明 2000/11/24 東京大学分子細胞生物学研究所シンポジウム(東京)
- 21) “外来異物に対する生体応答のメカニズム” 藤井義明、三村純正、馬場崇、十川和博(東北大・院・理)
- 22) “Ah リセプターと Arnt のヘテロダイマーをコアアクチベーターとして要求する転写因子の同定” 沼山恵子¹、十川和博¹、高橋智裕¹、和田忠士²、半田宏²、藤井義明¹(¹ 東北大院・理・化、² 東工大・フロンティア)
- 23) “ダイオキシンによる女性ホルモン攪乱作用の分子メカニズムの解析” 大竹史明¹、武山健一^{1,3}、柳澤純^{1,3}、佐藤隆史¹、藤井義明^{2,3}、加藤茂明^{1,3}(¹ 東大・分生研、² 東北大・院理・化学、³ 科技団・CREST)
- 24) “成体での血管新生における HLF の役割” 守田匡伸¹、高橋智²、中島修²、川内紫真子²、山下年晴¹、依馬正次¹、柴原茂樹³、十川和博¹、山本雅之²、藤井義明¹(¹ 東北大・院理、² 筑波大・TARA センター、³ 東北大・院医)
- 25) “Arnt2 regulates the development of secretory neurons in mouse hypothalamus with Sim1 as a dimmer” Hosoya, T.^{1,2}, Oda, Y.¹, Takahashi, S.², Morita, M.¹, Kawauchi, K.², Ema, M.¹, Yamamoto, M.², Fujii-Kuriyama, Y.¹(¹Tohoku Univ., Grad. Sch. Sci., Dept. Boil., ²Tsukuba Univ., TARA Center) 2000/12/13-16 日本分子生物学会(神戸)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

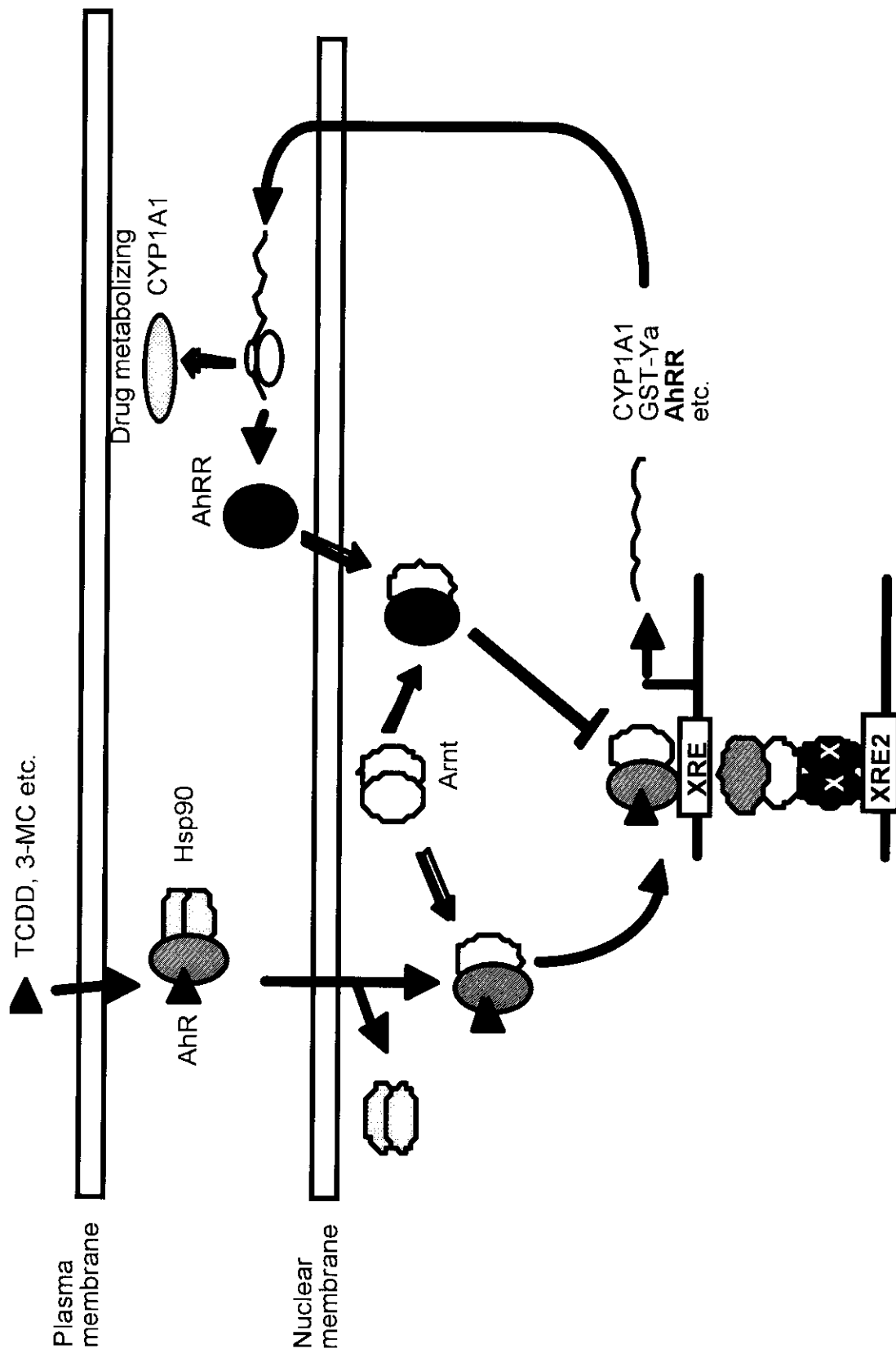
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

胎性期や新生児期のストレス負荷ラットへの成熟後のダイオキシン類暴露の影響

分担研究者 群馬大学医学部神経精神医学教室 三國 雅彦

研究要旨

成熟ラットにダイオキシン類を連続投与し、慢性変動ストレスが与える脳内代謝の変化を比較したところ、ダイオキシン類暴露によって、ラット前頭皮質の糖代謝は影響を受けず、成熟後のダイオキシン類暴露が中枢神経系に与える影響は明瞭ではなかった。さらに胎性期のストレス負荷が、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ため、胎生期にダイオキシン類、生理食塩水注射によるストレスを加えたラットを作成し、行動学的観察を行った。高架式十字迷路で観察される不安関連行動は胎生期生理食塩水投与群では有意に亢進していたのに対し、胎生期ダイオキシン暴露ラットでは、不安関連行動発達に障害が生じている可能性が示唆された。

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ものと考えられている。

本研究では、まず成熟ラットにダイオキシン類を連続投与し、慢性変動ストレスが与える脳内代謝の変化に対して影響を与えるか否かについて検討した。さらに胎性期のストレス負荷や視床下部-下

垂体-副腎皮質(hypothalamus-pituitary-adrenal, HPA)系機能を亢進させる処置(ACTHあるいはdexamethasoneによる処置)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ため、胎性期にACTH、ダイオキシン類、さらに慢性ストレスを加えたラットを作製し、行動学的観察、ストレス応答に関する内分泌機能測定、およびマイクロアレイ法を用いた脳内遺伝子変異の網羅的検索を計画し、進行中である。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

(1) 慢性変動ストレス(chronic variable stress、CSV)が脳内代謝に与える効果に対するダイオキシン類の連続投与の影響:

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、慢性変動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-tetra chlorobenzo-p-dioxin (TCDD, 10 μ g/kg、腹腔内投与)である。ラットを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日間の慢性変動ストレス

- 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 $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$)。
 - 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時間の絶食。
 - 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) CVSなし。1群と同じ期間、TCDDを投与。

(3群) CVS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) CVS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。

(2) 胎性期ダイオキシン類曝露の神経系発達に対する影響:

i. 胎性期に ACTH、ダイオキシン類処置を加えたラットの作製:

SD系雌妊娠ラットに対し,。また妊娠第17~19日目にACTH(50 μ g、皮下)あるいはTCDD、0.5 μ g/kgを投与する。出生した仔ラットを雌雄に分別して7週令に達した時点で用いる。

ii. 行動学的観察:

仔ラットに急性ストレスとして、高架式十字迷路によって、不安関連行動(10分間のopen armへ入る回数、およびopen armに滞在する時間の積算)を測定すると共に、胎性期に生理食塩水を処置した対照と比較する。

(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

(1) 慢性変動ストレス(chronic variable stress、CSV)が脳内代謝に与える効果に対するダイオキシン類の連続投与の影響:

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

(2)胎生期ダイオキシン類曝露の神経系発達に対する影響:

胎生期に TCDD を投与した母ラットから出生した仔ラット 14 匹のうち、4匹は生後まもなく死亡、無処置群、生理食塩水群に比べて高い死亡率を示した。

Fig.2 に示したように、胎生期に生理食塩水注射によるストレスに曝されたラットはオープン・アームに留まる時間はいずれも、胎生期無処置群に比して有意に減少していた。しかし、胎生期に TCDD を注射投与されたラットは、無処置群との間に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、慢性変動ストレス、さらにダイオキシン類の慢性投与および慢性変動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。つまり成熟後の脳に対してはほとんど影響を与えないものと考えられる。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曝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必要がある、今回の実験によって、胎生期に生理食塩水注射による軽微なストレスを受けたラットは成熟後に、高架式十字迷路によって測定された不安関連行動が有意に亢進していることが今回も観察された。興味深いことに、胎生期に TCDD 投与を受けたラットは、成熟後の不安関連行動は無処置群と変化がなかった。このことは生理食塩水投与によって亢進するはずの不安関連行動が消失していることになり、むしろ危険を感知し防御するという行動が障害されていることが示唆された。

E. 今後の課題

胎性期のストレス刺激が神経系の発達に直接影響し、ダイオキシン類の曝露に対する脆弱因子を形成していることか否かを明らかにするため、以

下の検討が予定され、進行中である。

1)マイクロアレイ法を用いた脳内遺伝子変異の網羅的検索:

・マイクロアレイの作成:我々の施設では既にラット海馬のcDNAライブラリからランダムクローンを取得し、シーケンスによって配列決定を行った。PCRによる増幅、産物の精製を行った後、コーティングを施したスライドガラスにスポットニングする。

・ターゲットDNAの調整:ACTH 処置ラットあるいはTCDD処置ラットの海馬を取り出し、total RNA 抽出後、mRNA を精製し、アミノアシル法によって波長の異なる蛍光色素 Cy3、Cy5で標識する。

・ハイブリダイゼーション及び解析:65°Cで12~18時間のハイブリダイゼーションを行い、ハイブリッド形成後、洗浄、除水を経て、スライドガラスをチップリーダーにかけ、各胎生期処置ラットと対照ラットの海馬における遺伝子発現パターンを調べる。この方法によって、胎生期ダイオキシン類曝露によって発現量の変化する遺伝子を、海馬で発現している全遺伝子を網羅的にスクリーニングできる。

F. 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変動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ルチコイド受容体とHSP90と重合の低下と共にグル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樞神経系の発達により大きな影響を与える可能性がある。今回の検討で胎生期のダイオキシン類曝露は、不安関連行動の発達に障害を与え、危険に対し適切な行動をとる機構に影響を及ぼしている可能性が示唆された。今後さらに行動学的解析、さらに神経内分泌学的機能を評価していく予定である。

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、さらに中樞神経系機能に変化を与えている可能性が有る。マイクロアレイ法は、胎生期にダイオキシン類曝露が成熟後の動物に及ぼす影響について遺伝子発現のレベルで解明することを目標としている。さらにグルココルチコイド受容体が発現調節している標的遺伝子の発現量を調べることにより、ダイオキシン類のグルココルチコイド受容体を介した生体への影響について知ることができるものと考ええる。

G. 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

H. 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. その他

なし

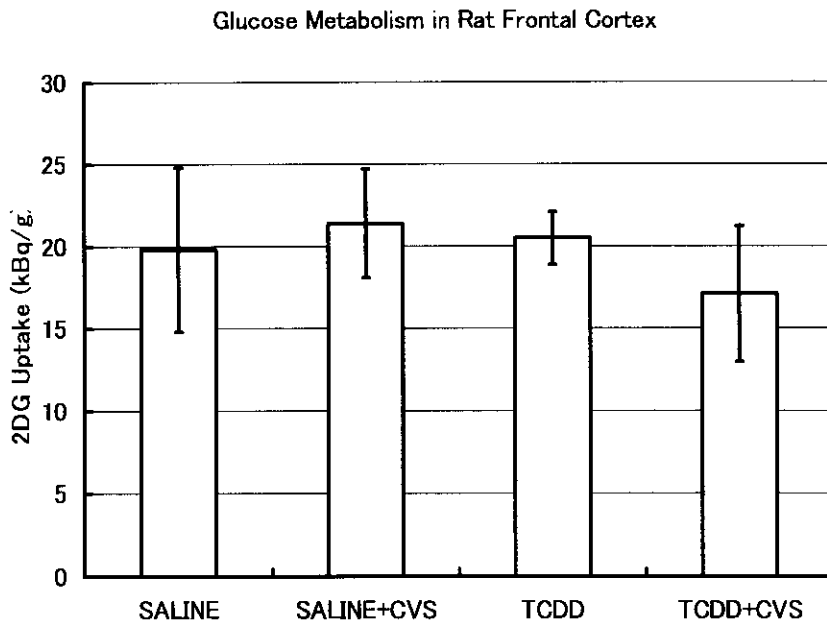


Fig.1 成熟ラット前頭皮質糖代謝に対するダイオキシン類曝露の影響:慢性ストレス暴露との比較。

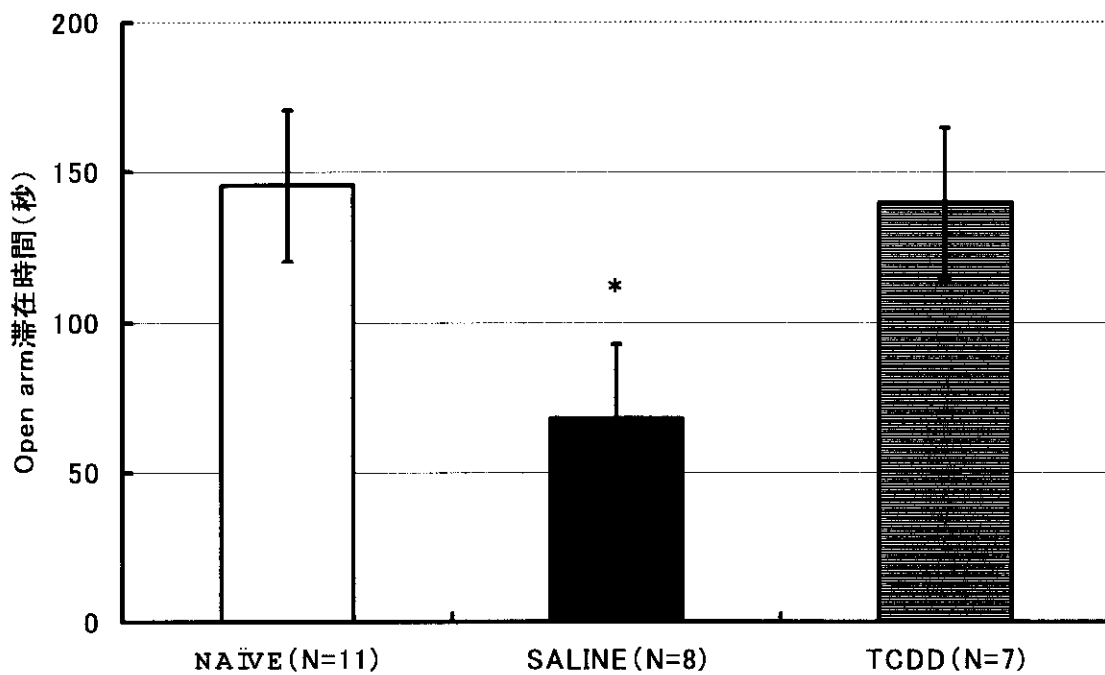


Fig.2 胎生期ダイオキシン類曝露が不安関連行動に与える影響:高架式十字迷路における OPEN ARM 滞在時間。(* : $p < 0.05$, vs. naive)

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

ダイオキシン類の毒性学的研究における国際動向に関する研究

分担研究者 広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室

研究要旨

未だ評価の確定していない子宮内膜症等の健康影響のリスク評価を確実なものにする為には、国際的な動向の最新情報を収集する必要がある。本研究は、海外における最新のダイオキシン類の汚染・暴露状況や健康影響に関する研究の進展状況に関する情報を収集するため、本年度は、米国のカリフォルニア州モントレイ開かれた Dioxin' 2000 で得た最新の知見についてまとめた。

A. 研究目的

未だ評価の確定していない子宮内膜症等の健康影響のリスク評価を確実なものにする為には、国際的な動向の最新情報を収集する必要がある。本研究は、海外における最新のダイオキシン類の汚染・暴露状況や健康影響に関する研究の進展状況に関する情報を収集することを目的とする。特にダイオキシン類による子宮内膜症や胎児期・授乳期暴露による次世代への健康影響に対する研究や、Ah レセプターを介した毒性発現メカニズムに関する情報を収集する。

B. 研究方法

本年度は、米国のカリフォルニア州モントレイ開かれた 20th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants (POPs) : Dioxin' 2000 における最新のダイオキシン類の汚染・暴露状況や健康影響に関する研究の進展状況に関する情報を収集し、特に、ダイオキシンの胎児期暴露による影響、子宮内膜症およびアシルヒドロカーボンレセプター

(AhR)を介した毒性発現メカニズム等に関する新知見についてまとめた。

C. 研究結果

1. Dioxin' 2000

本シンポジウムは、20th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs(Persistent Organic Pollutants)として USEPA, NIEHS, カリフォルニア EPA やカリフォルニア大学などとの共催のもとに執り行われた。セッションは、"Analytical", "Bioanalytical approaches for POP detection", "PCDDs/PCDFs in the atmosphere · measurement, trends, sourced, fate and transport", "Environmental fate and transport", "Emission control and abatement technologies & remediation", "Natural formation of dioxins", "Humans sources and activities associated with dioxin-like compounds and POPs in the environment", "Formation and sources", "Environmental levels", "Polychlorinated naphthalenes",

"Polybrominated flame retardants", "Toxaphene", "Polychlorinated paraffins", "POPs in foods", "Global POPs treaty and quality criteria for international POPs management", "Human Exposure", "Epidemiology - POPs, endocrine disruptors and cancer", "Epidemiology - What have We learned?", "Childhood health and development in relation to persistent organochlorine compounds", "Risk evaluation of dioxin-like chemicals", "Risk assessment and evaluation", "Non-Ah receptor mechanisms underlying immunotoxicity and neurotoxicity of non-coplanar-PCBs, PBDEs and ortho-quinones", "Molecular biology of the Ah receptor and Ah receptor-dependent signaling", "Immunotoxicity of dioxins and POPs", "Toxicology", "Endocrine disruption", "Ecotoxicology and POPs"の27セッションに分けられ行われた。

本シンポジウムでは、ダイオキシン類を含めた有機化学汚染物質に対して、分析法や生成分解過程、汚染状況、毒性、毒性発現機序、疫学調査、リスクアセスメント・マネジメントと幅広い研究分野における成果の発表やディスカッションが行われた。

特に、ダイオキシンの胎児期暴露による影響、子宮内膜症およびアрилヒドロカーボンレセプター(AhR)を介した毒性発現メカニズム等に関する新知見として以下の発表が行われた。

—2,3,7,8-TCDDのLONG EVANSラットへの胎児期暴露における生後の体内動態—

妊娠期及び授乳期にTCDDに暴露すると児動物の生殖器官の発達に影響を与えること

が知られており、前立腺や膀胱の発達に影響を与えるのにクリティカルな時期があることが調べられてきている。一方、精囊の発達に対する、クリティカルウィンドウは不明のままである。この問題に関しては、最近の研究で生後1日目での投与でも影響があることが調べられており、出生後のTCDDの体内動態に関する研究が必要になってきた。そこで、妊娠15日のラットに³H]TCDDを単回経口投与し、出生後の母動物と児動物のTCDDの体内動態が調べられた。

母動物ではTCDDの消失は肝臓では速やかであるが、脂肪細胞中ではやや緩やかなものであった。一方、児動物では、体全体に対するTCDD濃度は出生後4日目でピークになり、離乳期までゆっくりと減少していくというパターンであった。しかし、この減少は体重増加に伴う見かけ上の減少で、体全体に対する負荷量は、離乳期まで増加していることが判明した。これは、母乳経路による暴露量が児動物からの排泄を上回り、授乳期間中はTCDDが体内に蓄積していることを示している。また、自動物の臓器ごとの検索では、肝臓中濃度は、体全体に対するTCDD濃度と同様の推移を示しているが、精囊中の濃度は授乳期間中、一定した濃度を示していた。この精囊中の濃度の結果は、出生後の精囊の発達への影響と関連しているかもしれないことを示している。

—胎児期TCDD暴露による雄ラット前立腺複葉のアンドロゲン感受性の減少—

TCDDの胎児期暴露による前立腺の縮小は、もっとも感受性の高いエンドポイントの一つであるが、その発現メカニズムは明らかになっていない。一方、前立腺の発達はアンドロゲンの一つである5 α -ジヒドロテストステロン(DHT)により高度に制御されている

ことが知られている。しかし、血漿中や前立腺中の DHT 量に変化は認められていない。一方で、TCDD 処理により前立腺のアンドロゲン感受性が減少するという報告もある。そこで、TCDD による影響が DHT を介するかどうかについて精査するために、前立腺複葉における DHT 産生酵素である 5α -リダクターゼ Type2 とアンドロゲンレセプターの mRNA の発現量が調べられた。その結果、TCDD 処理により生後 49 日目には 5α -リダクターゼ Type2 の mRNA の発現量は増加したが、アンドロゲンレセプターの mRNA は用量依存的に減少した。このアンドロゲンレセプターの mRNA の減少は、生後 120 日目に回復している。これらの知見は、性成熟期におけるアンドロゲンレセプターの減少により、アンドロゲン感受性が減少し、前立腺の発達に影響を与えていることを示唆した。

—TCDD 暴露により子宮内膜症を誘発したアカゲザルの末梢白血球における TNF α 産生の増加—

アカゲザルに、5 または 25ppt の TCDD 混餌投与により、子宮内膜症の発生頻度が増加し、この影響には免疫系のメカニズムが関与することが報告されている。今回の研究では、この実験で使用したサル（投与中止後 13 年）より、末梢血を採取し、サイトカイン生成量や細胞溶解能などの各種免疫活性が検索された。その結果、ウイルス抗原への感受性や、INF γ 、IL-6、IL-10 などの生産量に変化はなかったが、TNF α の生産量が TCDD の暴露濃度に依存して増加していることが判明した。また、NK 細胞に感受性の高い細胞に対する細胞溶解能が減少していることも確認された。これらの結果は、体内に長く残存する TCDD による免疫系への長期間の影響が、子宮内膜症の発症に関連していることを

示唆した。

—AhR に関する毒性発現メカニズムに関する知見—

① 近年 AhR と相互作用する新しいタンパクとして AIP (XAP2 または Ara9 と呼ばれる) が見つかってきているが、その転写制御等に対する役割ははっきりしていない。そこで、AhR や Hsp90 などの相互作用について *in vitro* で条件を変えて解析したところ、AIP は AhR と Hsp90 の両方に結合すると共に、AIP と AhR に結合には、Hsp90 が必要であることが判明した。さらに AIP は、AIP-AhR-Hsp90 コンプレックスを安定化する作用のあることも明らかになった。

② H/W ラットの AhR は、スプライシングの違いによる変異を転写活性部位に持っていることが知られているが、CYP1A1 の誘導能は他の系統と変わらず、依然、系統差を説明する知見は見つかっていない。そこで、致死量が約 1000 も異なるラットの系統差に関して、TCDD 投与に伴う AhR や ARNT の発現量や結合活性の経時変化に関して、高感受性の LE ラットと低感受性の H/W ラットおよび、やや感受性の高い SD ラットを用いて検討された。各系統で、ARNT の変化は TCDD の投与により余り変化しなかった。AhR は、TCDD 投与により 1 日後には変化は認められないが、徐々に誘導されて 10 日後までに 2~3 倍程度誘導されたが、各系統間での差は、見いだせなかった。結果として、系統差に関する知見は得られなかったが、AhR の TCDD による発現は、CYP1A1 などの急速な酵素誘導とは違うメカニズムにより制御されていることが明らかとなった。

③ 胸腺萎縮や免疫抑制など免疫系への影響もダイオキシンによる感受性の高い毒性の一つと捉えられているが、そのメカニズム

はよくわかっていない。そのため、リガンドを必要とせず活性化される変異型 Ah-レセプターを免疫グロブリンエンハンサーにカップルさせたトランスジェニックマウス (CA-AhR) を作成し、解析が行われた。その結果、6 ヶ月齢まで、相対胸腺重量の減少が認められた。また、新生児 CA-AhR マウスの胸腺では、CD8⁺T 細胞の増加と CD4⁺T 細胞の減少、骨髄では、B 細胞コンポーネントの増加がおきていることが明らかにされた。これらのことは、T および B 細胞系で発現している Ah-レセプターが、ダイオキシンなどによる免疫系への影響に直接関与していることを示唆した。

④ TGF- β が Ah-レセプターの発現を制御していることが明らかにされているが、その制御メカニズムに関して、ヒト Ah-レセプター遺伝子の 5'末端側領域の解析が行われた。その結果、Ah-レセプターの 5'側上流約 2500bp のところに、細胞増殖因子などで制御される Smad3 結合領域が存在し、この領域を介して TGF- β により発現が制御されていることが明らかにされた。また、この TGF- β による発現制御は肺腫瘍系の A549 細胞では誘導的に、肝腫瘍由来の HepG2 では抑制的に働くことが示され、細胞特異的な発現に関与することが示された。

⑤ ヒト Ah-レセプターの 5'側上流の解析を行ったところ、AP1、AP2、ATF、ER、HNF-5、c-Myb、c-Myc、Sp1、CCAAT などの各種バインディングサイトがあることが明らかになった。齧歯類での解析より、Sp1 サイトが Ah-R の制御に重要であることがわかっているため、おそらくヒトでもこの Sp1 サイトが重要な意味を持つものと考えられた。また、この 5'側上流のヒトでのポリモルフィズムを調べたところ、ATF や Sp1 サイトの近傍に変異のあるパターンが存在することが判

明し、Ah-R の発現制御にポリモルフィズムに存在する可能性が示唆された。

⑥ TCDD による致死量に関して低感受性動物種であるハムスターの Ah-レセプター遺伝子のクローニングが行われた。SD ラットやヒトとのホモロジー解析の結果、C 末側の転写活性化領域にサテライト DNA 様のインサージョンのあるような構造をとっていることが判明した。この部分の構造的差異は、同じ低感受性のラットの系統である H/W ラットが SD ラットに比べて、スプライシングバリエーションにより C 末側の転写活性化領域に構造的差異を持つことを考え合わせると、Ah-レセプターの C 末側の転写活性化領域の構造が、ダイオキシンによる毒性の感受性に関与している可能性が示唆された。

D. 考察

Ah-レセプター自体の解析では、TCDD に対する感受性が、C 末側の転写調節領域の構造に関係しているという状況証拠も揃いつつあるようである。このあたりの研究は、Ah-レセプターと各種の核内 Co-factor との相互作用により、どのように毒性が発現されているかを解析する上で、興味深いものである。さらに、毒性発現の分子学的アプローチとはべつに、毒性評価の上では体内動態に関する知見も必要である。この意味において、今回のシンポジウムで、授乳経路による胎児の各臓器における TCDD 体内動態の解析結果は、生殖器毒性を評価する上で重要な知見であると考えられる。

また、ダイオキシン類による子宮内膜症の発症に関しては、免疫系の関与が示唆されているが、今回のシンポジウムでは、さらに増殖因子である TNF α が分子メカニズム的に関係していることが突き止められようとしている。さらに、Ah-レセプターと増殖因子と

の関係でいえば、今回のシンポジウムでは、Ah-レセプターの発現制御に各種の増殖因子が関わっていること明らかにされ、特に、Ah-レセプター遺伝子の5'上流の転写調節部位の解析が進んだようである。また、胎児期暴露による前立腺への影響に関しては、前立腺腹葉におけるアンドロゲンレセプターmRNAの発現抑制の関与が示唆されるなど、Ah-レセプターの発現制御の解析と共に、細胞特異的な毒性発現メカニズムの解析が、これからの大きな課題であると考えられた。

E. 参考文献

- Bell, DR. and Poland A., Binding of aryl hydrocarbon receptor (AhR) to AhR-interacting protein (AIP); The role of Hsp90. *Organohalogen Compounds* (2000) **49**: 310–313.
- Franc, M-A. et al., Regulation of expression of the aryl hydrocarbon receptor by TCDD in a dioxin-resistance model. *Organohalogen Compounds* (2000) **49**: 139–142.
- Hamm, JT. et al., Postnatal disposition of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the long-evans rat following gestational exposure. *Organohalogen Compounds* (2000) **49**: 104–107.
- Korkalainen, M. et al., Molecular cloning of the hamster Ah receptor reveals a unique Q-rich subdomain structure. *Organohalogen Compounds* (2000) **49**: 33–36.
- McGuire, J. et al., Involment of Ah receptor in alterations in immune system development. *Organohalogen Compounds* (2000) **49**: 82–83.
- Ohsako, S. et al., Decrease of androgen sensitivity in the ventral prostate of male exposed maternally to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-

dioxin(TCDD). *Organohalogen Compounds* (2000) **49**: 401–403.

Racky J. et al., Isolation of the human Ah receptor promoter and identification of genetic variations. *Organohalogen Compounds* (2000) **49**: 25–28.

Rier, SE. et al., Increased tumor necrosis factor alpha production by peripheral blood leukocytes from TCDD-exposed rhesus monkeys with endometriosis. *Organohalogen Compounds* (2000) **49**: 78–80.

Wolf, S. et al., Cell specific expression and regulation of human Arylhydrocarbon receptor by transforming growth factor β 1. *Organohalogen Compounds* (2000) **49**: 21–24.

F. 研究発表

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

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

平成12年度は、US-EPAが1995年に引き続き、新たに2000年6月に提示した「ダイオキシン類に関する再評価ドラフト」について検討した。全体は、暴露、健康影響、リスク評価の3部に分かれている。発がん性に関して、今回の文書においては、2,3,7,8 TCDDを明らかな human carcinogen、ダイオキシン類の混合物及びその他のダイオキシン様化合物を likely human carcinogen に分類している。1998年にWHO/IPCSが提示したTDI 1-4pg TEQ/kg/dayはリスクマネジメントには有用な値として結論づけている。厚生省ダイオキシン類健康影響評価特別部会では、「現時点において、我が国におけるTDIを早急に再検討する必要性を示唆する知見は、この再評価ドラフト等からは得られなかった」と結論した。

A. 研究目的

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¹⁻⁴⁾。その環境中濃度を規制するための方策が、世界各国政府及び国際機関で考えられてきた^{5,6)}。本研究では、そのこれまでの動きを展望し、今後の日本における規制方針策定に役立てようとするものである。昨年度は、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した⁷⁾。本年度は、さらに平成12年6月にUS-EPAから出された「ダイオキシン類再評価ドラフト」の内容を紹介・検討し、日本における対応を考慮することを目的とした。

なお本稿では、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-テトラクロロベンゾダイオキシンは、ダイオキシン又はTCDDと記した。

B. 研究方法

US-EPAのダイオキシン類再評価ドラフト

US-EPAでは、ダイオキシン類に関する再評価を1994年に行っているが⁸⁾、2000年6月に新しい再評価ドラフトを提示した⁹⁻¹¹⁾。全体は、暴露、健康影響、リスク評価の3部に分かれており、全35章にも及ぶものであるが、本研究に関わる部分の要約は

以下のものである。

(1) ダイオキシン類

ダイオキシン類は多くの化学構造上類似の化学物質の総称である。即ち、polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins(PCDDs)、Polychlorinated dibenzofurans(PCDFs)、Polybrominated dibenzo-*p*-dioxins(PBDDs)、Polybrominated dibenzofurans(PBDFs)及びPolychlorinated biphenyls(PCBs)が含まれる。更に、Polybrominated biphenylsや一つの分子に塩素と臭素が含まれる場合も考えられ、おびただしい数の化合物の存在が考えられる。いずれも脂溶性が高く、動物体内での代謝や環境中での変化を受けにくく、ヒトや動物の体内に蓄積しやすいと言う共通の性質を有している。

ダイオキシン類の中では、2,3,7,8-Tetrachloro dibenzo-*p*-dioxin(ダイオキシン、2,3,7,8-TCDD)がその強い毒性から最も注目されている。ダイオキシン類のうち全ての化合物が2,3,7,8-TCDD様の毒性を有しているわけではない。2,3,7,8-TCDDなど代表的な化合物の毒性については多くの毒性研究があるが、全ての化合物について十分な毒性データがあるわけではない。特に臭素系ダイオキシン類についての毒性情報は少なく、詳細な毒性評価は行われていない。

このようにおびただしい数のダイオキシン様化合

物が存在するものの、ヒトや動物体内での蓄積データから、環境中のダイオキシン類については20種類前後のものに絞って評価すれば十分であると考えられている。

(2)毒性等価係数(Toxic Equivalency Factor, TEF)及び毒性等量(Toxic Equivalent Quantity, TEQ)

ヒトは環境その他から、いろいろな量と割合で同時に種々のダイオキシン類による暴露を受けており、このことがヒトにおけるダイオキシン類に係る健康評価を複雑なものとしている。

そこで、異なった種類のダイオキシン類に同時に暴露された場合の健康影響評価法として、2,3,7,8-TCDDの毒性(これを1とする。)を基準として、その他のダイオキシン類の毒性の強さ、すなわち毒性等価係数(TEF)を定め、暴露された全てのダイオキシン類の量を2,3,7,8-TCDD毒性等量(TEQ)に換算して評価を行うことが普通であり、極めて有用な評価手段となっている。

TEFはこれまでに3種類が示されているが、1998年にWHOが新たに示したWHO-TEF(1998)を用いることが推奨されており、現在、TEF算定に用いられているが、科学的知見の充実を踏まえて定期的に再検討することが必要である。

(3) 暴露評価指標

暴露評価の指標として、1)投与量、2)AUC、3)血漿(又は組織)中濃度、4)定常状態における体内負荷量(Steady-State Body Burden)及び5)作用機序に基づく用量指標(Mechanistic Dose Metrics)がこれまでに提案されている。それぞれに利点、欠点があり、利用には限界がある。

例えば、AUCはヒトの間で暴露量を比較し、毒性発現について考察するには適しているが、寿命の差や特定の毒性について感受性の高い時期もあり、種間比較に利用するには問題がある。一方、体内負荷量(又は血中濃度)は、組織中濃度に対応するものであり、現時点ではダイオキシン類による暴露の比較をヒトと動物などの種間で行い、リスクアセスメントを行うのに最も適切な指標と考えられて

いる。これらの指標を用いる場合には、データと使用目的、および前提となる仮定をよく理解して選ぶ必要がある。

(4) ヒトや動物における発がん性

これまでUS-EPAで行ってきた職業的コホート研究など疫学的研究によれば、ある不確実性は残るものの、ダイオキシン類の暴露とがんによる死亡率の増加には相関があることが認められている。また、高レベルのPCDFsとPCBsに暴露された日本のカネミ油症でも肺がんと肝がんによる死亡の増加が認められている。セブソにおける高濃度ダイオキシン暴露事故でもがん死の増加が示唆されているが、確定的な証拠はまだ得られていない。これまでの調査により、限られた疫学データから2,3,7,8-TCDD及びその他のダイオキシン類は、ある不確実性は残るものの、高濃度で暴露されたヒト、特に男性にとって多臓器発がん物質であるとされている。職業的に暴露されたヒトの、多臓器における発がんリスクの増加は、ダイオキシン類の作用機構や、標的臓器における遺伝子発現と細胞制御への作用レベルを考えればあり得ることであろう。

しかし、限られた疫学データの中から、この結論を更に確実にするためには、将来にわたり、より長期的観察及び適切な暴露評価の研究が必要である。

実験的には、2,3,7,8-TCDDはラット及びマウスに対して非遺伝毒性発がん物質であることを示す多くのデータがあり、2,3,7,8-TCDDに対して毒性感受性の低いハムスターに対しても発がん性が示されている。さらに、2,3,7,8-TCDDは、発がんプロモーション作用を示し、他のダイオキシン様化合物にも同様なプロモーション作用がある。しかも、ある不確実性は残るものの、がんに対する疫学的結果と、ダイオキシン様化合物が多種の動物で多臓器発がん物質あるいは発がんプロモーターであるとの結果は、概して一致している。

このような根拠から、2,3,7,8-TCDDは明らかに human carcinogen (ヒトに対する発がん性がある物質) に分類できる。これは国際がん研究機関

(IARC)における結論と同様である。ダイオキシン類の混合物やその他のダイオキシン様化合物はこれまでのデータから likely human carcinogen (ヒトに対する発がん性の可能性がある物質)に分類できる。

暴露量と発がんリスクに用量相関傾向を示した研究はいくつかみられるが、疫学的データ、特に職業性暴露量以下の研究では、用量相関曲線について明確なことはいえない。

US-EPAは発がん性上限リスク値を、疫学及び発がん性試験データから計算した、 1×10^{-3} per pg-TEQ/kg/dayを用いることを勧めている。

ダイオキシン類の場合のように作用発現用量 (effective level) とバックグラウンドのレベルに近い場合、US-EPAは非発がん性影響評価には Deviation of a Reference Dose (RfD)ではなく、Margin of Exposure (MOE)を用いることを推奨しており、通常、この値として100~1000が望ましいとしている。体内負荷量の取り方と毒性指標の選び方によってはMOEが10以下になることもある。

RfDはバックグラウンドにおける暴露量が低いとき、ある特定の発生源からの暴露量を評価するときに用いられるものである。

ATSDR (US Agency for Toxic Substances and Disease Registry)はダイオキシン類の最小リスクレベル (Minimum Risk Level, MRL)を1.0 pg-TEQ/kg/dayに設定しているが、がん以外の指標を用いたこの方法の妥当性には疑問がある。

WHOが設定している耐容一日摂取量 (TDI, $1 \sim 4$ pg-TEQ/kg/day)は、リスクマネジメントの目的には妥当な数字である。

(5) 毒性メカニズムについて

ダイオキシン類の毒性の大部分は、動物、ヒト共に細胞質に存在するアрил炭化水素受容体Ahレセプターを介して生じるものと考えられる。Ahレセプターを介さない毒性影響も報告されているが、この種の毒性が生じるのは比較的多量のダイオキシンに暴露された場合であり、ヒトのリスク評価には影響しないものと考えられる。

ダイオキシンとAhレセプターの複合体は、細胞の核内でアрил炭化水素受容体核移行因子 (Arnt)とヘテロ二量体を作り、DNAの特定の領域に結合して転写活性因子として働く。このAhレセプターやArntには種差、系統差があることが動物で知られていたが、最近ヒトでもこれらの蛋白の多型が報告されている。この多型がヒトの感受性にどの程度の幅をもたらすかは今後の研究課題である。

(6) 暴露について

成人の一日あたりの PCDD/PCDFs とダイオキシン様 PCB の摂取量はそれぞれ 41 および 24pg-TEQ/day であり、総摂取量は 65pg-TEQ/day であることから、米国におけるバックグラウンド暴露レベルは、1pg-TEQ/kg/day となる。この摂取量は食物、土壌、および大気からの摂取を合わせたものである。

なお、成人血中濃度の 253pg-TEQ/g lipid から、定常状態の薬物動態モデルを用いて推定される一日あたりの摂取量は 1463pg-TEQ/day であり、摂取経路からの推定値の 2.2 倍に相当する。この相違は過去の暴露値は現在より高かったと思われることを考慮せずに、単純なモデルを当てはめたことから予想されたことである。また、摂取経路からの推定値はすべての暴露経路をとらえていない場合には過小評価になる。

また、暴露値の個人差は高いもので平均値の3倍程度であり、主として食生活の差によるものである。

(7) 小児への毒性影響

バックグラウンドレベルの暴露量において、精神行動、甲状腺機能、免疫機能、菌の発達への影響が疫学的に報告されているが、いずれも確定的でない。

母乳栄養児の甲状腺機能異常の報告が多くなされているが、成長とともにどのような影響を生ずるかについては、今後の長期観察によるデータが必要である。動物実験では、2,3,7,8-TCDDの妊娠中あるいは授乳期の単回投与実験が行われており、多くの場合、生殖器の発達、精神神経系の発達、免

疫機能などに明らかな影響が認められている。

小児期における暴露と発がんの関係は、疫学的にも実験的にも明らかではない。ダイオキシン類が発がんプロモーター作用を持つことを考えると、一時的な高濃度暴露よりは、体内負荷量の方が問題であり、従って小児期より成人後の暴露の方が問題である。また、母親から胎児への影響は、母親のそれまでの食生活などによって蓄積された量(体内負荷量)の問題である。従って、一時的な高濃度暴露も体内負荷量を有意に増加させない程度であれば問題ないであろう。

(8) 母乳栄養児におけるダイオキシン量

母乳栄養児は人工栄養児に比べて、明らかにダイオキシン量が高い(20 vs. 5 ppt TEQ)。母乳栄養児の年間ダイオキシン平均摂取量は、成人の摂取量より明らかに高い(92 vs. 1 pg-TEQ/kg/day)。しかし、乳児の急速な体重増加及び脂肪の増加、母乳中のダイオキシンの経時的減少により、体内負荷量は決して大きな差を生じない。

母乳栄養児は人工栄養児に比べて、発育に必要な一時期、高いレベルのダイオキシン類を摂取するが、母乳栄養の利点はWHO、米國小児アカデミーなどで認められており、その利益(benefit)は危険(risk)を上回るものである。

C. 考察・結論

ダイオキシン類の毒性に関して、特に問題となるのはその発がん性である。今回の、US-EPA 再評価文書においては、2,3,7,8-TCDD を明らかな human carcinogen、ダイオキシン類の混合物及びその他のダイオキシン様化合物を likely human carcinogen に分類している。そして、発がん性上限リスク値を、疫学及び発がん性試験データから計算した、 1×10^{-3} per pg-TEQ/kg/day を用いることを勧めている。この値は、データが今より少なかった当時の評価(1985年及び1994年)より、3~30倍高く、一般の人々のリスクの最高推定値(95パーセンタイル値以上)は、 10^{-3} から 10^{-2} の間になる。しかし、US-EPA の考察によれば、「実際のリスクは、

この値を超えることはまずありえないし、それよりも低いはずであり、リスクが0である人々の可能性もある」としている。すなわち、がんのリスクの程度は、暴露経路と暴露レベル、総体内負荷量、標的臓器への用量、個人の感受性、ホルモン状態に依存してきまるものである。WHO/IPCS が提示したTDII-4pg TEQ/kg/day を、US-EPA はリスクマネジメントには有用な値として結論づけている。2000年12月に開催された厚生省ダイオキシン類健康影響評価特別部会では、「以上の点から、現時点において、我が国におけるTDIを早急に再検討する必要性を示唆する知見は、この再評価ドラフト等からは得られなかった」と結論した¹²⁾。

なお、今後、我が国におけるTDIの再評価の必要性に係る検討に際して、留意すべきと考えられる点は、ヒトの感受性の個体差である。すなわち、マウスではダイオキシン感受性に大きな系統差があることが知られており、ヒトでも同様の幅広い個体差があるならば、不確実係数が10でよいのかが問題となる。なお、現時点ではヒトの感受性に10倍以上の個体差があることは確認されていない。

文献

- 1) 黒川雄二;ダイオキシン問題雑感. ファルマシア, 34;419(1998)
- 2) 黒川雄二;ダイオキシン類の毒性について. ビルと環境, 80;47-55(1998)
- 3) 廣瀬明彦, 長谷川隆一, 黒川雄二;ダイオキシン類の生体毒性. J. Toxicol. Sci., 23; App. 93-106(1998)
- 4) 黒川雄二;ダイオキシンのTDI(耐容一日摂取量)について. 食品衛生研究, 50;73-77(2000)
- 5) 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)
- 6) 黒川雄二, 井上達;ダイオキシン類のリスクアセスメント, 特に国内外の規制状況及び内分泌障害性物質としての作用. 国立衛研報告,