

20020944

厚生労働科学研究費補助金
食品・化学物質安全総合研究事業

内因性リガンドの存在を前提とするダイオキシンの
リスクの再評価に関する研究

平成 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 関澤 純

平成 15 (2003) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	
内因性リガンドの存在を前提とするダイオキシンリスクの再評価に関する研究.....	1
関澤 純	
II. 分担研究報告 (順不同)	
1 ダイオキシンリスク評価の現状および、アрилハイドロカーボン受容体の	7
生理的な役割に関する情報調査と検討	
関澤 純	
2 インディルビンの体内動態検討を目的とした高感度測定法の開発	17
宮入 伸一	
3 実験動物におけるインディルビンの臓器分布の解析	21
江馬 眞、宮入 伸一、関澤 純	
4 インディルビンと TCDD による遺伝子発現誘導の解析および細胞増殖	23
松田 知成	
5 インディルビンの免疫細胞機能獲得への影響解析	25
鈴木 和博	
6 アрилハイドロカーボン受容体内因性リガンド候補 indirubin による	27
酵素誘導とその代謝に関する研究	
北村 繁幸	
7 アрилハイドロカーボン受容体介在性遺伝子傷害に対するインディルビン	31
誘導体の抗変異原性	
佐伯 憲一	
8 インディルビン等の Ah 受容体を介する生体反応機構の解析	39
菅野 純	
9 エストロゲン受容体の転写調節機構への影響の解析に関する研究	41
加藤 茂明	
10 子宮筋腫における特異的遺伝子の検索とダイオキシン関連遺伝子の変動	45
有菌 幸司	
11 2,3,7,8-四塩化ジベンゾパラジオキシンの発生毒性とインディルビン	49
による修飾	
安田 峯生	
III 研究成果の刊行に関する一覧表	51
IV 研究成果の刊行物別刷	別添

I 総括研究報告

内因性リガンドの存在を前提とするダイオキシンリスク
の再評価に関する研究

主任研究者 関澤 純

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）

総括研究報告書

「内因性リガンドの存在を前提とするダイオキシンリスクの再評価に関する研究」

主任研究者 関澤 純 国立医薬品食品衛生研究所化学物質情報部室長

研究要旨

われわれは先に、ダイオキシンの50分の1という低濃度(EC50は0.2nM)でアрил
ハイドロカーボン受容体(AhR)経由のレポーター活性を示すリガンドとしてインディ
ルビンを見だし、このものが人体内に相当量存在することを報告した。本研究の目的
に沿って、初年度はまずダイオキシンのリスク評価の経緯とAhRの生理的な役割に関
する研究の現状を整理した。インディルビンの生体内での機能を解明する基礎として、
インディルビンを純度良く合成し低濃度で感度良く分析する手法を確立した。すなわ
ちインディルビン特異抗体を作成し酵素イムノアッセイ系および、安定同位体標識イ
ンディルビンを合成しGC-MSにおける測定条件を検討した。本法を利用しラットの
臓器別インディルビンの分布を調査した。インディルビンをマウスに経口または腹腔内
投与し用量依存的な薬物代謝酵素活性の誘導を観察したが、投与停止時に誘導は3日
でほぼ消失し代謝排泄が早いことが示唆された。本誘導がAhRを介していることを
AhR欠損マウスを用いて確認した。インディルビンはヒト肝がん細胞HepG2に対し
きわめて低濃度でCYP1A1やCYP1A2を誘導し、さらにCYP1A1により自身が代謝
・分解され、フィードバック制御の対象となっていることを明らかにした。ヒト白血
病細胞培養細胞を使いDNAマイクロアレイ解析を行い、多数のインディルビン特異的
な遺伝子発現誘導を認めるとともに誘導される遺伝子としてCYP1A1, IGFBP1ほかを
同定した。インディルビンのあるサイトカインとを低濃度で併用曝露すると細胞増殖
を抑えアポトーシスや分化を誘導した。ヒト前骨髄性白血病細胞HL-60の好中球への
分化を見る系で、インディルビンは活性酸素産生能を有意に上昇させた。エストロゲン
受容体の新規転写共役因子複合体の同定により、エストロゲン依存性乳癌の増殖機構の
一端をはじめて明らかにできた。インディルビンのハロゲン誘導体を合成し、ベンズ
ピレンと併用投与した時にその小核誘発性を阻害しAhRの部分アゴニストとしてCYP1A1
誘導阻害による抗変異原活性が示唆された。妊娠マウスにインディルビンを強制経口投与
した後、2,3,7,8-TCDDを経口投与し、胎児の口蓋裂及び水腎症を調べたが、現在のところイ
ンディルビンの顕著な修飾作用は認められていない。

研究課題主任研究者

関澤 純・国立医薬品食品衛生研究所化学物
質情報部室長

分担研究者（順不同）

菅野 純・国立医薬品食品衛生研究所安全性
生物試験研究センター毒性部部長

江馬 眞・国立医薬品食品衛生研究所安全性

生物試験研究センター総合評価室室長
鈴木和博・国立医薬品食品衛生研究所代謝生
化学部室長

松田知成・京都大学地球環境学専攻助教授
北村繁幸・広島大学医学部総合薬学科助教授
加藤茂明・東京大学分子細胞生物学研究所教

授

安田峯生・広島国際大学保健医療学部教授
宮入伸一・日本大学薬学部薬化学研究室教授
有菌幸司・熊本県立大学環境共生学部食品安全性学講座教授
佐伯憲一・名古屋市立大学薬学研究科医薬品代謝解析学講師

A. 研究目的

ダイオキシンによる健康リスクは国民の関心を呼び、行政施策に大きなインパクトを与えてきた。世界保健機関(WHO)は2003年に耐容摂取量の再評価を予定し、2001年にFAO/WHO 合同の食品添加物専門家委員会(JECFA)や欧州連合の食品科学委員会は耐容摂取量見直しを行い、わが国でも国際的な安全性評価の動向を参考に対応を必要とされる。ダイオキシンの毒性は AhR 経路で発揮されることはほぼ確立されているが、生体内における AhR の生理的役割については未解明であり、生体内の存在量や活性からいって満足すべき AhR の内因性リガンドは見いだされていなかった。われわれはインディールビンが AhR リガンドであることを見だし、インディールビンと AhR の生理的役割、および AhR 経路の反応におけるインディールビンとダイオキシンとの相互作用の解明が、ダイオキシンのリスク再評価に重要な新知見と新たな考え方を提供すると考えた。

インディールビンの生体における生成、代謝、局在と、存在形態を調べ、さらに可能な生理的機能について、生体レベルと分子レベルの両面から解析する。

ダイオキシン投与により実験動物で見られている多くの影響が、それほどかけ離れない量のダイオキシン類を体内に蓄積しているヒトにおいて必ずしも見られない理由について、ヒトと実験動物の間でのインディールビンの存在と AhR との機能的な関わりや体内動態の違いなどの関連において

検討し、ダイオキシンの影響の種差の解明を試みる。

インディールビンと、ダイオキシンとの細胞レベルでの作用、また動物における併用投与試験から、インディールビンがダイオキシンの有害作用を抑制する可能性を検討し、最終的にダイオキシンの健康リスクについて有害影響の生物学的なメカニズムに基づき、また人の生理的な実態に即し耐容摂取量を再検討するため基礎データを提供し、ダイオキシンのリスク再評価に寄与する。

B. 研究方法

以下のさまざまな研究と手法を通して、目的を達成することを企図した。

- (1)ダイオキシンのリスク評価の現状と、AhR の生理的役割に関連する情報調査と検討
- (2)インディールビンとその誘導体の合成、感度の良い分析法の確立
- (3) 特異抗体を用いインディールビンの臓器特異的な分布の解析
- (4) インディールビン投与による生理作用の用量—作用関係、細胞の増殖・分化への影響の検討
- (5) *in vivo* および *in vitro* でのインディールビン、その誘導体、ダイオキシン併用時の AhR の転写制御作用への影響、遺伝子発現や細胞周期制御への影響を比較検討
- (6) ダイオキシンとの併用投与時の生殖・発生影響抑制の可能性の検討

倫理面への配慮

ヒト試料の採取と分析に関し国立医薬品食品衛生研究所の倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果と考察

(1) ダイオキシンのリスク評価の現状と、AhRの生理的役割に関する情報調査と検討

これまでのダイオキシンのリスク評価についてレビューし、ことに耐容摂取量を設定する上で参考とされたキースタディーについて、有害性判定の根拠データを吟味し、評価上の問題点について検討した。インディルビンの生理的な役割と、ダイオキシンの有害作用メカニズムについて考察する上で重要な AhR の機能に関連する最近の知見を整理した。AhR の時期特異的発現、機能、細胞周期制御への関わり、視床下部におけるエストロゲンレセプターと AhR の相互作用および、AhR を経由しないダイオキシンの有害影響の可能性についても検討を加えた。(関澤分担研究)

(2) インディルビンとその誘導体の合成、感度の良い分析法の確立

インディルビン骨格を有する新規ハプテンを開発し特異抗体を作成、酵素イムノアッセイ系を構築する一方、安定同位体標識インディルビンを合成しGC-MSにおける測定条件を検討した。インディルビン骨格を有する新規ハプテンを開発し、ウサギを用いて特異抗体を作成した。得られた抗体を用いて酵素イムノアッセイ系を構築した。一方、本抗体のGC-MSとのハイファネイティッド測定法への適用を考え、内標準物質となる安定同位体標識インディルビンを合成するとともに、GC-MSにおける測定条件を検討した。(宮入分担研究)

(3) 特異抗体を用いインディルビンの臓器特異的な分布の解析

ダイオキシンによる急性毒性の感度が相対的に低いことが知られている Br1Han:WIST (GALAS) ラットの雄(10週令)を用いて、血清、尿及び主要器官を採取し、インディルビンの臓器分布の解析を行った。初年度末時点では分析は進行中である。(江馬分担研究、宮入、関澤協力研究)

(4) インディルビン投与による可能な生理作用の用量—作用関係、細胞の増殖・分化への影響の検討

インディルビンがヒト培養細胞株に対して、きわめて低濃度で CYP1A1 や CYP1A2 を誘導し、さらに CYP1A1 によって分解されるというフィードバック制御の対象となっていることを明らかにした。ヒト白血病細胞培養細胞を使い DNA マイクロアレイ解析を行い、インディルビンによって誘導される遺伝子として CYP1A1, IGFBP1 などを同定した。ヒト白血病細胞株に対して、インディルビンと TCDD は単独では高濃度でも増殖、分化に影響を及ぼさなかったが、インディルビンとあるサイトカインと低濃度で併用曝露すると細胞増殖を抑えアポトーシスや分化を誘導した。(松田分担研究)

ヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 を用いて、ジメチルスルホキシドおよび G-CSF (顆粒球刺激因子)により好中球に分化させる *in vitro* 細胞実験系を確立した。HL-60 細胞の好中球分化を見る系において、インディルビンの濃度を変えて共存させた結果、1 μ M の濃度で活性酸素産生能を、25%有意に上昇させる効果をもつことが明らかになった。(鈴木分担研究)

(5) *in vivo* および *in vitro* でのインディルビン、その誘導体、ダイオキシン併用時の AhR の転写制御作用への影響、遺伝子発現や細胞周期制御への影響の比較検討

インディルビン、インディゴをマウスに投与すると、用量に依存して薬物代謝酵素が誘導されるが、投与を停止すると誘導は3日でほとんど消失し代謝排泄が早いことが示唆された。本誘導はAhRを介していることをAhR欠損マウスを用いて確認した。ヒト肝がん細胞HepG2でも同様の結果を得た。(北村分担研究)

インディルビンの作用メカニズム検討のためインディルビンの5位及び5'位のハロゲン誘導体を4種合成し、5位へのFやCl置換はインディルビンのAh受容体親和性に殆ど影響を与えないのに対し、5'位Br置換により親和性が1/10〜1/100に減弱する事が明らかとなった。ベンズピ

レンと併用投与した時に小核誘発性を阻害し AhR の部分アゴニストとして CYP1A1 誘導阻害による抗変異原活性が示唆された。(佐伯分担研究)

野生型マウス由来の MEF 細胞を用い、インディルビン、TCDD、TCDF 曝露への初期応答遺伝子群を検索した。in vitro 曝露では、インディルビン曝露により TCDD、TCDF と共通する発現誘導遺伝子に加え、多数のインディルビン特異的な発現誘導遺伝子を得た。今後生理的リガンドとしてのインディルビンを特徴づける分子生物学的指標を検討が可能と考えられる(菅野分担研究)

エストロゲン受容体の転写制御機構を分子レベルで理解する目的で、受容体に相互作用する転写共役因子複合体を精製同定した。この複合体は、新規であり、さらに組織特異的な因子を含有すると期待される。(加藤分担研究)

ダイオキシンリスクおよび内在性リガンドを解析するため、人試料として子宮筋腫と正常部位、および GnRH セラピー処置を施した患者より摘出した子宮筋腫と正常部位を用いてサブトラクション法にて、共通性は認められないものの子宮筋腫部位と正常部位の間で差として認められる遺伝子を見出した。(有菌分担研究)

(6) ダイオキシンとの併用投与による生殖・発生影響抑制の可能性の検討

マウスの妊娠 11 1/4 日及び 12 1/4 日(陰栓発見日午前 0 時=妊娠 0 日)にインディルビン 100 mg/kg を強制経口投与し、12 1/2 日に 2, 3, 7, 8-四塩化ジベンゾパラジオキシンを 5, 10 または 20 µg/kg 強制経口投与した。妊娠 18 1/2 日に母体を屠殺して、胎児の口蓋裂及び水腎症を調べた。この条件下では現在のところインディルビンの顕著な修飾作用は認められていない。(安田分担研究)

D. 結論

(1) ダイオキシンのリスク評価において耐容摂取量設定の根拠に用いられた研究データの有害性評価とリスクの総合判定を中心に、

これまでのリスク評価の経過を整理した。AhR の生理的な役割についての最近の知見を整理し、AhR の細胞周期制御への関わりや、AhR を経由しないダイオキシンの有害影響の可能性についても検討した。

(2) 研究を効果的に進める前提として、インディルビンを純度良く多量合成し、GC・MS また免疫反応による低濃度で感度が高くかつ特異性の良い分析法を確立した。本法を利用してラットの臓器別インディルビンの分布を予備的に調査した。

(3) マウス (C57BL/6J) およびヒト肝がん細胞 HepG2 において、インディルビン投与による CYP 誘導の用量-作用関係とその時間的な変化について解析し、インディルビンがダイオキシンに比べて極めて低濃度で CYP1A1、CYP 1A2 を誘導するがその活性は弱く、同時に自らが代謝・分解されることにより反応は短時間に終了し、ダイオキシンが継続的な効果を示すことと大きな違いを示すことを確認した。

(4) 野生型マウス由来の胚繊維芽細胞にインディルビンを曝露し、TCDD、TCDF と共通する発現誘導遺伝子に加え、多数のインディルビン特異的な発現誘導遺伝子を得た。ヒト白血病細胞培養細胞を使い DNA マイクロアレイ解析を行い、インディルビンによって誘導される遺伝子として CYP1A1、IGFBP1 などを同定した。

(5) インディルビンのある種のサイトカインとを低濃度で併用曝露すると細胞増殖を抑えアポトーシスや分化を誘導した。

(6) ヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 の好中球への分化を見る系で、インディルビンが活性酸素産生能を有意に上昇させる効果が見られた。

(7) インディルビンの誘導体を合成し、ベンズピレンと併用投与した時にその小核誘発性を阻害し AhR の部分アゴニストとして CYP1A1 誘導阻害による抗変異原活性が示

唆された。

(8) エストロゲン受容体の新規転写共役因子複合体の同定により、エストロゲン依存性乳癌の増殖機構の一端をはじめて明らかにすることができた。初年度の研究でインディルビンの分析法を確立し、CYP 誘導や体内での分解、およびダイオキシンとの相互作用について基礎的なデータを得た。

(9) 妊娠マウスにインディルビン 100 mg/kg を強制経口投与した後、ダイオキシン (2,3,7,8-TCDD) を 5、10、20 µg/kg 強制経口投与し、胎児の口蓋裂及び水腎症を調べたが、調べた条件下では現在のところインディルビンの顕著な修飾作用は認められなかった。

以上の研究成果を踏まえて2年度は、人と動物の体内におけるインディルビンの時期および臓器特異的な発現と、インディルビンと AhR の細胞の増殖・分化の制御などにおける生理的な役割について検討する。その上で人と動物の間のダイオキシンによる有害影響の発現の機作および種差解明などに向けて研究を進める。内因性リガンドと推定されるインディルビンの生理的な役割および、ダイオキシンの有害影響発現との関わりが解明されるならば、その展開次第では今後大幅にリスク評価は書き直されるだろう。

E. 研究発表

1. 論文・図書発表

III 研究成果の刊行に関する一覧表を参照

2. 学会発表

III 研究成果の刊行に関する一覧表を参照

F. 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(データベース等)

なし

II 分担研究報告

厚生労働科学研究補助金(食品・化学物質安全総合研究事業)
分担研究報告書

ダイオキシンリスク評価の現状および、アрилヒドロカーボン

受容体の生理的な役割に関する情報調査と検討

分担研究者 関澤 純 国立医薬品食品衛生研究所化学物質情報部室長

研究要旨

本研究プロジェクトの最終目的であるダイオキシンによる健康リスクの再評価への提案の参考として、1990年以降の国内外機関による延べ10度のリスク評価の経緯を整理した。最近の評価については耐容摂取量を設定する上で参考とされたキースタディーについて、有害性判定の根拠データを吟味し、評価上の問題点について検討した。インディルビンの生理的な役割と、ダイオキシンの有害作用メカニズムについて考察する上で重要なアрилヒドロカーボン受容体(AhR)の機能に関連する最近の知見を整理した。AhRの時期特異的発現と機能、細胞周期制御への関わり、視床下部におけるエストロゲンレセプターとAhRの相互作用および、AhRを経由しないダイオキシンの有害影響の可能性についても検討を加えた。この成果は2年度において、AhRの内因性リガンドであるインディルビンの生理的な役割および、ダイオキシンの有害作用との関係を考察し、ダイオキシンによるリスクの再評価への提言をまとめる上で重要な参考となる。

A. 研究目的

- (1) 本研究プロジェクトの最終目的あるダイオキシンによる健康リスクの再評価への提言をまとめる参考として、これまでの国内外のリスク評価の経緯を整理する。特に有害性の判定、用量-反応評価、リスクの総合判定を中心にまとめる。
- (2) インディルビンの生理的な役割とダイオキシンの作用メカニズムの関連について考察する上で重要なAhRの機能に関連する最近の知見を整理する。

B. 研究方法

- (1) ダイオキシンのリスク評価の報告を収集、歴史的経緯と問題点、評価に関わる有害性の判定・用量-反応評価・リスクの総合判定に関わる内容を検討した。
- (2) AhRの機能に関連する最近の知見をMEDLINE医学文献ファイルを用いて検索し、インディルビンの可能な生理的な役割およびダイオキシンの有害作用メカニズムについて考察する上で重要と考えられたAhRの機能に関わる知見を整理した。

C. 研究結果と考察

(1) ダイオキシンリスク評価の経緯と問題点の検討

この数年間に各国や国際機関においてめまぐるしくリスク再評価の動きがあった。これは、ダイオキシンによる健康リスクへの広範な関心の存在と、研究が最近急速に進みつつあることを背景としている。

ダイオキシンのリスク評価のうち、「曝露評価」については分析を相当精緻なレベルで行うことが可能になっているので、解決すべき多くの問題がある「有害性の判定」と、「用量-反応評価」「リスクの総合判定」を中心にリスク評価の最新動向と問題点を要約する。

ダイオキシンのリスク評価の歴史的経緯を国内と海外(国際機関を含む)に分けて、表1に概観した。この内容について評価の基礎となったクリティカルなエンドポイントと、その扱いにおける考え方を中心に以下に記す。

(1a) ダイオキシンリスク評価の国際動向

- (i) World Health Organization European Centre for Environmental Health (WHO-ECEH) による評価:

1990年WHO欧州事務局が開催した専門家会議は、2,3,7,8-TCDD(Tetrachlorodibenzo-p-dioxin)を用いたラットの2年間慢性毒性試験(Kocibaら、1978)で認められた体重増加抑制、肝障害を指標とした時の無毒性量(NOEL) 1 ng/kg 体重/日に不確実性係数 100 を適用して、10pg/kg 体重/日を 2,3,7,8-TCDD の TDI (Tolerable Daily Intake : 一日耐容摂取量)として設定した(WHO/Euro, 1991)。

(ii) わが国での TDI の設定

1996年に厚生省のダイオキシンのリスクアセスメント研究班は、Kocibaら(1978)のデータに加えてラット3世代生殖試験(Murrayら、1979)で見られた子宮内死亡、同腹児の減少、生後の体重増加抑制などのデータから無毒性量を1 ng/kg 体重/日と判断し不確実性係数 100 を適用して 2,3,7,8-TCDD についての当面の TDI を 10pg/kg 体重/日に設定した(厚生省 1996)。

(iii) IARC(国際癌研究機関)の発がん性評価

1997年2月にIARCは10年前の評価の見直しを行った。2,3,7,8-TCDDがAhレセプターの関与により動物の複数器官に腫瘍を誘起し、同レセプターがヒトを含む種間に広く保存されていること、除草剤製造作業従事者の職業曝露に関する4つの重要なコホート研究で高濃度曝露時に複数器官総計の発癌相対リスクが1.4であったこと、これらの曝露レベルはラットにおいて発癌が見られたレベルに近いなどの理由から、2,3,7,8-TCDDをヒトにおける発癌物質と判定した。また他のダイオキシンおよびジベンゾフランについては、ヒトの発癌物質であるとは分類できないとした(IARC, 1997、表3)。

(iv) The International Programme on Chemical Safety (IPCS) /World Health Organization European Centre for Environmental Health (WHO-ECEH) による評価 :

1998年5月にIPCS(国際化学物質安全性計画)とWHO-ECEH(WHO欧州事務局)は合同でダイオキシンによる健康リスクの再評価を行い、1990年にWHO-ECEHが設定したTDIを見直し、1-4pg/kg 体重/日と再評価した(WHO, 1998)。ダイオキシンの発癌および非発癌影響、曝露状況、体内動態、小児への影響、作用メカニズムに関する新しい知見を基に再検討した。ダイオキシンは蓄積性が高く、かつその影響に大きな種差が認められることから毒性試験の人

への外挿に際して、一日当たりの摂取量よりも体内負荷量を用いて比較すべきとし、また人と実験動物の間で毒性影響を起こす体内負荷量に大きな種差がないと考えられたことから、注1の推算式を適用し体内負荷量をベースにしたリスク評価が行われた。さらに混合物からの影響への寄与を計算するため影響における加算性を前提としてWHOが評価した毒性等価係数(TEF)を用い、いくつかの塩素化ダイオキシンの他にダイオキシン様の影響を及ぼすと考えられるPCDFとPCBを影響評価に含めた。

(v) わが国における TDI の再設定 :

WHO(1998)の再評価を参考に1999年6月に、ヒトにおけるクロルアクネ、動物で免疫系への影響、雄性および雌性生殖器系への影響などの発現が見られたもっとも低い体内負荷量(86 ng/kg 体重前後)に対応する1日摂取量と推定された43.6 pg/kg 体重に不確実性係数 10 を適用して、4 pg/kg 体重をTDIに設定した(厚生省・環境庁、1999)。TDI算出にはTEFの考え方を導入し、ダイオキシン類としてダイオキシン様の影響を及ぼすと考えられるPCDFとPCBを影響評価に含めた。

(vi) The Scientific Committee on Food (SCF) of the European Union (EU) による評価 :

Hurstら(2000)によるラット児の性分化開始においてもっとも感受性が高いと考えられる妊娠15-16日目の母親の曝露と胎児の全負荷量に関する分析データを参考にし、かつダイオキシンの半減期がたいへん長い点を考慮して、体内負荷量から1日耐容摂取量を導くのではなく、週間摂取耐容量(TWI)に換算すべきであるとした。2001年6月欧州連合食品科学委員会(SCF/EU)は、Faqiら(1998、注1)の反復皮下投与試験におけるラット雄児の発生影響における最小毒性量(LOEL)を基に14pg/kg 体重/週をTWI(週間耐容摂取量)に設定した(SCF, 2000)。

(vii) JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)による評価 :

2001年6月にJECFA(FAO/WHO合同食品添加物・汚染物専門家委員会)は、SCF(2000)と同様の体内負荷量手法を用い、かつ試験動物の餌中のバックグラウンド汚染を考慮に入れ、Faqiら(1998)のラット雄児への発生影響のLOEL、およびOhsakoら(2001、注2)の雄児生殖器系への発生影響の無毒性量(NOEL)を

基に、70pg/kg 体重/月を暫定月間耐容摂取量 (PTMI)に設定した (FAO/WHO, 2001)。

(viii) Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment

(COT) of the United Kingdom (UK) の評価 :

COT (英国食品・消費者製品・環境中化学物質毒性委員会) はダイオキシンが遺伝子毒性を示さないことから閾値を前提とした評価を行うとし、さまざまなエンドポイントの中から Faqi ら (1998) の試験におけるラット雄児における生殖影響をもっともクリティカルな影響と考えた。発生影響における肛門生殖器間距離の減少は体重補正など標準化の問題があるためにバイオマーカーとして必ずしも有用といえず、ヒトにおける精子貯蔵がラットよりはるかに少ないことを考慮し精子生産と形態への影響がより適切なマーカーと考えた。

Faqi ら (1998) の試験における LOAEL (33 ng/kg 体重) に NOAEL への外挿のため不確実性係数 3 を適用しヒトの間のトキシコキネティクスの個人差について不確実性係数 3.2 を適用し、体内負荷量手法を用いたことから種間のトキシコキネティクスの不確実性係数は 1 とし、さらにヒトはラットよりも感受性が低いと考えられるので、もともと感受性高いヒトを保護するためでもトキシコダイナミクスの不確実性係数は 1 で良いとして、合計 10 の不確実性係数を用いてヒト母親の体内負荷量として 3.4 ng/kg 体重を導出した。データに基づく不確実性係数選択の考え方を図 1 に示した (関沢、2001)。

この値に注 3 の式を適用してヒトの 1 日耐容摂取量 (TDI) として 1.7 pg/kg 体重が算出され、この値を基に 2 pg/kg 体重を TDI とした (COT, 2001)。2001 年 10 月に公表された COT の報告によると、体内負荷量は長期にわたる蓄積がベースとなるので定常状態では TDI の 2000 倍が体内に存在することから、たとえ TDI の 10 倍量を一日に摂取したとしても体内負荷量は 0.5% 増加するに過ぎないと記している。

(ix) Environmental Protection Agency (EPA) of the USA による評価草案 :

US EPA は 1991 年にダイオキシンリスクの再評価を開始し、1994 年に外部レビューのための最初の草案をリリースし、2000—2001 年にかけて科学諮問委員会 (Science Advisory Board) による用量—反応モデリング、総合要約、リスクの総合判定部分を中心に大幅な改訂を行ったが、

2001 年 12 月現在まだ最終文書は公表されていない。US EPA の評価の特徴は、発癌をリスク評価のもっとも適切なエンドポイントと考え、彼らの発癌リスク評価指針に沿って評価を進めているところにある (USEPA, 2001)。

(x) EU の飼料中および食品中残留基準の設定

欧州委員会は食品および飼料の二つの常任委員会にダイオキシン類の摂取量を削減する目的で食品と飼料中のダイオキシン量の最大限度値 (Maximum limit) を定める内容を含む政策 (Community strategy for dioxins, furans and polychlorinated biphenyls) を提案した。2001 年 11 月閣僚理事会は、飼料中の最大限度値を定める法案を採択、同指令が成立、また食品中の最大限度値を定める法案を採択、同規則が成立した。2002 年 1 月には European Food Safety Authority 設立のための規則を採択した。

(1b) ダイオキシンリスク評価の問題点

ダイオキシンリスク評価における今後の課題を以下に整理する。

(i) ダイオキシンによるリスクは、単に混合物による健康障害という複雑さだけでなく、毒性プロファイルがきわめて多岐にわたり、また場合によっては種間で感受性に数オーダーの大きな違いが見られ、かつその感受性の違いが毒性の種類毎に異なるという難解さがある (表 2)。これまでヒトでしか報告されていない出生児性比のアンバランスの問題があり、最近類似の報告がいくつかなされたが、重要な問題を含むと考えられさらに検討を要する (Mocarelli ら、2000)。

(ii) 複雑な混合物による毒性を解釈する上では、毒性等価係数 (TEF: Toxic Equivalency Factor) という新しい考え方が導入され、影響の加算性を前提にリスクを論じることがこれまで行われている。しかし毒性等価係数の基礎となる毒性発現のメカニズムという肝心な点がまだ十分に解明されておらず、メカニズム解明次第ではリスク評価そのものが今後大きく書き換えられる可能性をはらんでいる (表 3)。TEF の考え方の有効性であるが、たとえば Ah レセプター経路の生体反応の関わりと有害作用のメカニズムの解明次第では、どの物質が、どの影響の発現に、どの程度関連しているかはまったく異なる可能性がありうる。もちろんエンドポイント毎に各物質の影響への寄与度は異なるであろう。

参考文献

- Adachi J, Mori Y, Matsui S, Takigami H, Fujino J, Kitagawa H, Miller CA III, Kato T, Saeki K, Matsuda K. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 31475-31478
- COT (2001) Statement on the tolerable intake for dioxins and dioxin-like PCBs, http://www.foodstandards.gov.uk/committees/cot/cot_dioxin_stat.pdf
- EU (2001) Proposal for a Directive amending Council Directive 1999/29/EC on the undesirable substances and products in animal nutrition; Proposal for a Regulation amending Commission Regulation (EC) No 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs
- FAO/WHO (2001) Summary and conclusions, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 57th meeting (Rome, June 2001)
- Faqi A, Dalsenter PR, Merker H, Chahoud I (1998) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 150, 383-392
- Hurst CH, DeVito MJ, Birnbaum LS (2000) *Toxicol. Sci.*, 57, 275-283
- IARC (1997) IARC monograph series, vol. 69
- JECFA (2001) Summary and conclusions, JECFA 57th meeting, Rome 5-14 June 2001, <http://www.who.int/pcs/jecfa/Summary57-corr.pdf>
- Kociba RJ, Keyes DG, Beyer J, Carreon R, Wade C, Dittenber D, Kalnins R, Frauson L, Park C, Barnard S, Hummel R, Humiston C. (1978) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 46, 279-303
- 厚生省(1996)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、1996年8月
- 厚生省・環境庁(1999)ダイオキシンの耐容一日摂取量について、中央環境審議会・生活環境審議会、http://www.mhw.go.jp/houdou/1106/h0621-3_13.html
- Mocarelli P, Gerthoux PM, Ferrari E, Patterson Jr DG, Kieszak SM, Brambilla P, Vincoli N, Signorini S, Tramacere P, Carreri V, Sampson EJ, Turner W, Needham LL (2000) *Lancet*, 355, 1858-1863
- Murray FJ, Smith FA, Nitschke KD, Humiston CG, Kociba RJ, Schwetz BA. (1979) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 50, 241-252
- Ohsako S, Miyabara Y, Nishimura N, Kurosawa S, Sakaue M, Ishimura R, Sato M, Takeda K, Aoki Y, Sone H, Tohyama C, Yonemoto J. (2001) *Toxicol. Sci.*, 60, 132-143
- SCF (2000) Opinions of the SCF on the risk assessment of dioxins and dioxin-like PCBs in food, SCF/CS/CNTM/DIOXIN/8 Final, http://europa.eu.int/com_m/food/fs/sc/scf/index_en.html
- 関沢ら(2001) 化学物質の健康リスク評価、丸善(IPCS EHC 210: 1999 の訳)
- USEPA (2001) Draft dioxin risk assessment, <http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/dioxreass.cfm/ActType=defaultDioxin>
- WHO (1998) Executive summary. Assessment of the health risk of dioxins: reevaluation of the tolerable daily intake, WHO European Centre for Environment and Health and International Programme on Chemical Safety, <http://www.who.int/pcs/docs/dioxin-exec-sum/exe-sum/final.html>
- WHO/Euro (1991) Consultation on tolerable daily intake from food of PCDDs and PCDFs, WHO European Centre for Environment and Health, EUR/ICP/CPS 030(s) 0369n
-
- (注1) Faqiら(1998)の報告の概要
- Faqi et al. : Reproductive Toxicity and Tissue Concentrations of Low Doses of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in Male Offspring Rats Exposed Throughout Pregnancy and Lactation, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 150, 383-392 (1998)
- * 曝露および観察時期： Wistar 雌ラット(交配2週間前)に 25, 60, 300 ng/kg TCDDを皮下に初期負荷投与、その後毎週1回 5, 12, 60 ng/kg を交配、妊娠、授乳期を通して維持投与、生後 2, 12, 17, 22, 36 日目に雄児への発生影響を、生後 70 (思春期), 170 (成熟期) 日目に生殖能への影響を観察。妊娠 21 日目に母獣の肝と脂肪中、離乳時に雄児の肝と精巣の TCDD を分析した。
- * 結果： 投与により対照と差が見られなかったのは、母獣の体重、児の体重、精巣・精巣上体、前立腺、精嚢重量、肛門生殖器間距離、下降精巣で、対照と差が見られたのは、25/5 ng/kg 以上で思春期・成熟期の精巣上体尾部精子数、一日精子生産数/の減少および 60/12 ng/kg 以上で精巣上体尾部通過時間の増加、25/5 ng/kg 以上で成熟期の異常精子数増加、騎乗・交尾時間間隔の延長、

300/60 ng/kg で母獣の妊娠率低下および成熟期雄児の血清テストステロン低下、精巣細胞の核濃縮・細胞残査の増加であった。

- * 考察： 交配前、交配、妊娠、授乳期連続投与による思春期・成熟期の雄児の精子形成過程への影響が TCDD による影響のもっとも鋭敏な指標

(注2) Ohsako ら(2001) の報告の概要

Ohsako et al. : Maternal Exposure to a Low Dose of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo -p-dioxin (TCDD) Suppressed the Development of Reproductive Organs of Male Rats: Dose-Dependent Increase of mRNA Levels of 5 α -Reductase Type 2 in Contrast to Decrease of Androgen Receptor in the Pubertal Ventral Prostate, Toxicol. Sciences, 60, 132-143 (2001)

- * 曝露および観察時期： Holtzman 雌ラット (妊娠 15 日目)に 12.5, 50, 200, 800 ng/kg TCDD を単回経口投与、生後 49, 120 日目に

雄児への影響を観察した。

- * 結果： 投与により、対照と差が見られなかったのは、母獣の体重、児の体重、精巣・精巣上体重量/ 一日精子生産量、貯蔵精子数/ 血清テストステロン・黄体ホルモン/精巣組織であり、対照と差が見られたのは、腹側前立腺重量減少(生後 120 日目: 200 ng/kg 以上)、肛門生殖器間距離(生後 120 日目: 50 ng/kg 以上、一見用量依存的、使用匹数と統計的有意差の関連)生後 49 日目腹側前立腺の 5 α -Reductase Type 2 およびアンドロゲンレセプター mRNA の用量依存的増加と減少であった。
- * 考察： 思春期の前立腺アンドロゲンレセプター発現低下による前立腺の発達抑制が重量減少につながったと思われる

(注3) 生涯曝露により特定の体内負荷量に達するための人の一日摂取量の推算式

$$\text{人の一日摂取量} = \text{体内負荷量} \times \text{Ln}2 (0.693) / \text{半減期}(7.5 \text{ 年}) \times \text{吸収率} (50\%)$$

表1 ダイオキシンのリスク評価の歴史的経緯

年月	国内	海外 (国際機関を含む)
1985		ドイツが TDI*を 10pg/kg 体重/日、目標値を 1pg/kg 体重/日に設定
1990		WHO 欧州事務局が TDI を 10pg/kg 体重/日に設定
1991,1992		英国、オランダが TDI を 10pg/kg 体重/日に設定
1996	厚生省 TDI を 10pg/kg 体重/日に設定	
1997年2月		IARC が 2,3,7,8-TCDD を Group1**、他のダイオキシンを Group3**に分類されると評価
1997年3月	環境庁健康リスク評価指針値を 5pg/kg 体重/日に設定	
1998年5月		IPCS / WHO 欧州事務局が TDI を 1-4pg/kg 体重/日に再設定
1999年6月	厚生省・環境庁合同会合が TDI を 4pg/kg 体重/日に再設定	
2001年5月		EU の「食品に関する科学委員会」が TWI***を 14pg/kg 体重/週に再設定
2001年6月		JECFA が PTMI**** 70pg/kg 体重/月に設定

2001年10月		英国 COT が TDI を 2pg/kg 体重/日に再設定
2001年11月		EU が飼料中および食品中残留基準の設定
2002年12月 現在		米国 EPA の SAB の最終校閲を終了したが、まだ最終報告は公表されていない

- * TDI (Tolerable Daily Intake) : 一日耐容摂取量
- ** Group1 : 人に発癌性あり Group3 : 人への発癌性の分類はできない
- *** TWI (Tolerable Weekly Intake) : 週間耐容摂取量
- **** PTMI (Provisional Tolerable Monthly Intake) : 暫定月間耐容摂取量

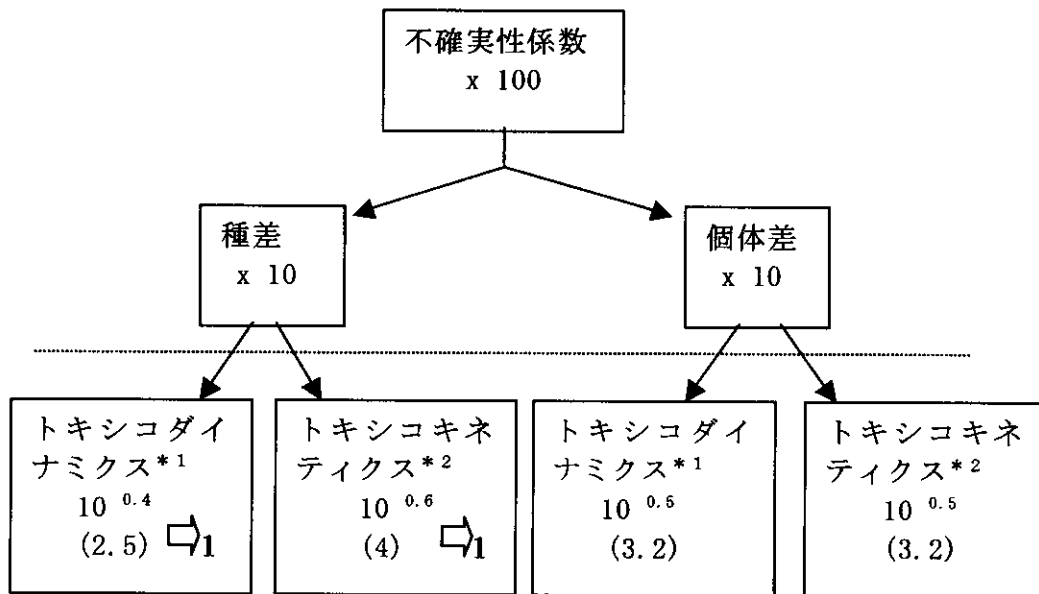


図1 データに基づく不確実性係数の適用の考え方

破線の上の種差 10 と個体差 10 に基づく 100 という不確実性係数のそれぞれをトキシコダイナミクスとトキシコキネティクスに細分化して考える手法。図に示した初期設定値はこれまでのデータの蓄積に基づく数値であるが適切な実測データがあればそれで置き換える (関沢ら、2001 より)

- * 1 トキシコダイナミクス : 感受性 (たとえば酵素やレセプターの反応性) に関する要因
- * 2 トキシコキネティクス : 体内への吸収、分布、代謝、排泄能力に関する要因

表2 ダイオキシン類による影響への種毎の感受性の違いの例

影響の種類	感受性の順
(1) 食欲不振による致死性の衰弱 (高感受性と低感受性動物では、4オーダーの違い)	モルモット>赤毛ザル>ラット(SD)>マウス>ハムスター、ヒト?
(2) 胎児死亡	赤毛ザル>モルモット>ラット>マウス>ハムスター
(3) 生殖器発達障害 (高感受性と低感受性動物では2オーダーの違い)	モルモット>ラット>ハムスター>マウス、ヒト?
(4) 出生児性比のアンバランス	ヒトのみ?

表3 毒性等価係数の前提とそぐわない、あるいは考慮されていない事実

前提に考慮されていない、あるいはそぐわない事実	例
(1) Ah レセプターが関与しないと考えられる毒性	ある種の PCB によるドパミン低下、レチノイドや甲状腺ホルモンレベル、エストロゲンレセプター結合への影響
(2) Ah レセプターに結合する他のハロゲン化合物の存在	ダイオキシン類の臭素化アナログ、ナフタレン、ジフェニルエーテル、ジフェニルトルエン、フェノキシアニソール、ビフェニルアニソール、キサントン、アントラセンのハロゲン化合物など
(3) 非ダイオキシン様 PCB によるアンタゴニスティックな影響	EROD 誘導への影響、マウス胎児の口蓋裂
(4) ダイオキシン類間の相乗的な影響の存在	CYP1A1 や甲状腺ホルモンレベルへの影響
(5) 摂取量の毒性等価量と標的用量の毒性等価量の違い	標的器官における毒性影響と標的器官濃度の関係

(2) AhRおよび関連要因の生理的な役割についての最近の知見の検討

(i) AhR の時期特異的、組織特異的発現

ヒト子宮内膜での AhR 発現は生理周期依存的であり(Kuchenhoff ら, 1999)、またラットでは日周期に依存して発現レベルが変化していた(Pollenz ら, 1998)。

(ii) AhR の生理的な役割

外因性のリガンド非存在下に AhR は構成的に活性化されていることから異物代謝に機能するだけでなく、生体の恒常性に関わる機能を有していると考えられた(Chang ら 1998)。keratinocyte や monocyte の分化過程で AhR の発現は増加した 2 Hayashi ら 1995)が、3T3 L1 fibroblast cell の脂肪分化時に AhR タンパクレベルは低下し、AhR の過剰発現により形態的分化と脂肪細胞関連遺伝子の発現は抑制された。この作用は、インドメタシンのような PPAR γ 2 のリガンド添加により回復した。AhR は pRb (網膜芽細胞腫瘍抑制たんぱく)のリン酸化を阻害し p107 発現をダウンレギュレートし、細胞増殖を阻害したが、これらの事実から AhR が 3T3 L1 fibroblast cell の脂肪分化のネガティブレギュレータとして機能していると示唆された(Shimba ら, 2001)。

(iii) 細胞周期制御への関わり

TCDD 非存在下に AhR 欠損マウス hepatoma cell(Hepa 1c1c7)は、G1 期の延長により細胞倍加時間の遅れを示したが、AhR c-DNA の導入により野生型の細胞周期に戻っ

た(Ma ら, 1996)。TCDD による AhR 経由の細胞周期 G1 期停止現象と、リガンドが結合した AhR が G1 細胞周期制御に関わる pRb (網膜芽細胞腫瘍抑制たんぱく)に結合することの関連が 5L hepatoma cell で示された(Ge ら, 1998)。TCDD は、ラット 5L hepatoma cell および培養胎児胸腺において G1 期停止に関与する cyclin/cdk inhibitor p27(Kip1)を転写を誘導し、細胞の増殖を阻害した(Kokkuri ら, 1999)。AhR 欠損マウス由来の胚繊維芽細胞は増殖が遅く、アポトーシスが増加した。G2/M 期に重要な 2 種のキナーゼ Cdc2 Plk はダウンレギュレートされ、増殖抑制因子 TGF- β は高レベルで発現していた(Elizondo ら, 2000) 肺において AhR mRNA が高発現していることが知られているが、ヒト肺胞細胞腫由来の A549 細胞 (typeII 肺胞上皮細胞の特徴を示す)に AhR 高発現ベクターを導入すると細胞増殖の促進が見られた(Shimba ら, 2002)。AhR 発現は G 1 後期から S 期早期にかけて高まる 9 Vaziri ら, 1996)が、フローサイトメトリ分析の結果、対照細胞では 90%が G1 期、10%が G2/M 期、S 期の細胞は見られなかったが、AhR 高発現細胞では 10%が S 期にあり G2/M 期の細胞は見られないことから、AhR による細胞周期促進効果は、細胞周期M期後期から S 期の短縮によることが示唆された(Shimba ら, 2002)。AhR あるいはリガンド (β -naphthoflavone) 結合 AhR は p300 に作用し DNA 合成調節に関与すると示唆されているが、細胞周期制御に関わる DP2, PCNA, RFC38, E2F の発現を誘導した。転写因子 DP2 は E2F と 2 量体を形成し、DNA ポリメラーゼ δ 活性を調節する PCNA, RFC38

など DNA 合成に関係した遺伝子の発現を制御している。RNAi により Arnt 発現をダウンレギュレートすると、AhR による細胞増殖の促進は抑制された(Shimba ら, 2002)。

(iv) 視床下部におけるエストロゲンレセプターと AhR の相互作用

乳腺細胞における AhR の活性化は抗エストロゲンのように働くが、視床下部ではエストロゲンレセプターと AhR は共在しており、ダイオキシンはエストロゲンによる排卵に必要な黄体形成ホルモンの放出を阻害する。

(v) AhR を経由しないダイオキシンの有害影響の可能性

TCDD は細胞周期 M 期に染色体の正確な分配に関わるチェックポイント因子 Mad2 タンパクの発現を抑制し、この効果は AhR 欠損マウスでも見られるので AhR を経由しないダイオキシンによる細胞増殖、発がん影響に別途のシグナル伝達経路の関与が推定された(Oikawa ら, 2001)。

参考文献

- Chang C. & Puga A. (1998) Constitutive activation of the aromatic hydrocarbon receptor. *Mol. Cell. Biol.* 18, 525-535
- Elizondo, G, Fernandez-Salguero, P, Sheikh, MS., Kim, GY, Fornace, AJ, Lee, KS, & Gonzalez FJ. (2000) Altered cell cycle control at G2/M phases in aryl hydrocarbon receptor-null embryo fibroblast. *Mol. Pharmacol.* 57, 1056-1063
- Ge, N. & Elferink, CJ. (1998) A direct interaction between the aryl hydrocarbon receptor and retinoblastoma protein. *J. Biol. Chem.* 273, 22708-22713
- Hayashi S, Okabe-Kando, J, Honma, Y, & Kawajiri K. (1995) Expression of Ah receptor (TCDD receptor) during human monocytic differentiation. *Carcinogenesis* 16, 1403-1409
- Kokkuri, SK, Weiss, C, Koff, A, & Gottlicher, M. (1999) p27kip1 induction and inhibition of proliferation by the intracellular Ah receptor in developing thymus and hepatoma cells. *Genes Dev.* 13, 1742-1753
- Kuchenhoff A, Seliger G, Klonisch T, Tschedschilsuen G, Kaltwasser P, Seliger E, Buchmann J, & Fischer B. (1999) Arylhydrocarbon receptor expression in the human endometrium, *Fertility Sterility*; 71: 354-360
- Ma, Q. & Whitlock, JP. (1996) The aromatic hydrocarbon receptor modulates the Hepa 1c1c7 cell cycle and differentiated state independently of dioxin. *Mol. Cell. Biol.* 16, 2144-2150
- Oikawa, K., Ohbayashi, T., Mimura, J., Iwata, R., Kameta, A., Evine, K., Iwaya, K., Fujii-kuriyama, Y., Kuroda, M., and Mu-kai, K. (2001) Dioxin suppresses the check point protein MAD2, by an aryl hydrocarbon receptor-independent pathway. *Cancer Res.* 61, 5707-5709
- Pollenz RS, Santostefano MJ, Klett E, Richardson VM, Necela B, Birnbaum LS, Female Sprague-Dawley rats exposed to a single oral dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exhibit sustained depletion of aryl hydrocarbon receptor protein in liver, spleen, thymus, and lung, *Toxicological sciences*, 1998; 42, 117-128
- Shimba S, Wada T, & Tezuka M. (2001) Arylhydrocarbon receptor (AhR) is involved in negative regulation of adipose differentiation in 3T3-L1 cells: AhR inhibits adipose differentiation independently of dioxin. *J. Cell Sci.* 114, 2809-2817
- Shimba S, Komiyama K, Moro I, Tezuka M (2002) Overexpression of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Accelerates the Cell Proliferation of A549 Cells, *J Biochem.* 132(5): 795-802
- Vaziri, C., Schneider, A., Sherr, D.H., and Faller, D.V. (1996) Expression of the aryl hydrocarbon receptor is regulated by serum and mitogenic growth factors in murine 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 271, 25921-25927

E. 結論

(i) ダイオキシンのリスク評価はさまざまな仮定の上に成り立っており、いくつかの基本的な問題点が残っている。クリティカルなエンドポイントの選択については、これまでの膨大な

動物試験とヒトでの疫学調査の結果の総合から考えて、生殖・発生影響あるいは免疫影響がクリティカルであろうことはおそらく間違っていないだろう。

(ii) レセプター経路の影響については本研究プロジェクトにより内因性リガンドと推定されるインディルビンの生理的な役割および、ダイオキシンの有害影響発現との関わりが解明されるならば、その展開次第では今後大幅にリスク評価は書き直されるだろう。

(iii) インディルビンと AhR の生理的な役割の解明は、複雑に制御されている生命の分子機構と細胞、オルガネラレベルでの生体制御について、新しい知見を追加する可能性がある。

E. 研究発表

1. 論文・図書発表

Sekizawa J, Suter G, Birnbaum L : **Integrated Human and Ecological Risk Assessment : A Case Study of Tributyltin and Triphenyltin Compounds**, *J. Human and Ecological Risk Assessment*. 9(1) 325-342. (2003)

Suter G, Vermeire T, Munns WR, Sekizawa J : **Framework for the Integration of Health and Ecological Risk Assessment**, *J. Human and Ecological Risk Assessment*. 9(1) 281-302. (2003)

Suter G, Munns WR, Sekizawa J : **Types of Integration in Risk Assessment and Management, and Why They Are Needed**, *J. Human and Ecological Risk Assessment*. 9(1) 273-280. (2003)

関澤 純: リスクコミュニケーションの課題、農業と経済、「食品安全性確保の考え方—リスクアナリシスとは何か」2002.12 臨時増刊号、79-90

関澤 純: 2002 年日本リスク研究学会第15回春季シンポジウム「食の安全とリスクへの対応」日本リスク研究学会誌、14(1): 3, 44-50

関澤 純: 化学物質の安全性とリスクコミュニケーション、安全工学 42(1): 36-43 (2003)

関澤 純: リスク評価の国際動向とわが国での課題、日本リスク研究学会誌、14(1): 88-95. (2002)

大竹千代子、関澤 純、杉森伸吉、安部明美、鬼武一夫、島井哲史、武井玲子: 化学品リスクの認知と行動についてのアンケートの解析、日本リスク研究学会誌、13 (2), 92-100 (2002)

関澤 純: 内分泌攪乱化学物質のリスクアセスメントとリスクコミュニケーション、

最新医学, 57,273-278 (2002)

関澤 純: リスクコミュニケーションの課題、農業と経済、2002.12 臨時増刊「食品安全性確保の考え方—リスクアナリシスとは何か」、79-90 (2002)

関澤 純: 化学物質対策とレギュラトリ・サイエンス、日本リスク研究学会誌、13 (2), 17-22, (2002)

関澤 純: 化学物質による健康のリスク評価、ケミカルエンジニアリング、47(2), 104-109 (2002)

井上 達、五十嵐勝秀、関澤 純: 内分泌攪乱物質の作用機序からみたヒトへの健康障害、日本医師会雑誌、127(2), 197-201 (2002)

2. 学会発表・講演

関澤 純、大屋幸江: 実験動物における吸入急性毒性値の他経路急性毒性値からの予測、日本動物実験代替法学会 (2002.12, 東京)

関澤 純、高橋美加: AhR の内在性リガンドを考慮に入れたダイオキシンリスクの再評価、日本内分泌かく乱物質学会 (2002.11, 広島)

関澤 純、村山武彦: 食品安全のリスクコミュニケーションはいかにあるべきか、日本リスク研究学会第15回研究発表会 (2002.11, 京都)

関澤 純: 食の安全におけるリスクアナリシスの役割、第1回リスクアナリシス・ワークショップ (2002.11, 東京)

関澤 純: 食品安全のためのリスクアナリシスとは、東京都消費者ワークショップ (2002.11, 東京)

関澤 純: 次世代リスク評価におけるバイオアッセイの役割、第8回バイオアッセイ研究会・日本環境毒性研究会合同シンポジウム (2002.9, 東京)

関澤 純: 化学物質の人への健康影響リスク、第22回農業環境シンポジウムおよび第2回有機化合物研究会合同シンポジウム (2002.9, つくば)

関澤 純: 食品安全のためのリスクコミュニケーション、日本リスク研究学会「食の安全とリスク対応」研究会 (2002.9, 東京)

Sekizawa J & Matsuda T : **Endogenous Ligands of Arohydrocarbon Receptor and Interaction with Dioxins**, 22nd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, (2002.8, Barcelona)

関澤 純: 食品安全に関わるリスクコミュニケーションはどうあるべきか、内閣府食品安全委員会設立準備室(仮称)ヒアリング (2002.7, 東京)

関澤 純: 「環境リスクの評価」、化学物質アドバイザー育成講座、環境情報科学センター主催(環境省後援) (2002.7, 東京)

関澤 純: 「化学物質・環境問題のリスクコミュニケーション」、化学物質アドバイザー育成講座、環境情報科学センター主催(環境省後援) (2002.7、

東京)

関澤 純:食品とリスクコミュニケーション、国立保健医療科学院「平成14年度特別課程食肉衛生検査コース」講義(2002.6、和光)

関澤 純:環境問題とリスクコミュニケーション、千葉大学総合研究プロジェクト「環境健康科学センター」公開シンポジウム(2002.6、千葉)

関澤 純:「環境ホルモン物質」による人の健康リスクを考える、環境リスクに関する水俣国際シンポジウム、みなまたシンポジウム実行委員会(2002.3、水俣)

関澤 純:食品のリスクアナリシス、日本生活共同組合連合会主催・自由民主党議員勉強会(2002.3、東京)

3. 編・著書

関澤 純:「食品安全のリスクアナリシス」5食品の安全性と衛生管理、国立健康栄養研究所監修「健康・栄養食品アドバイザースタッフ・テキストブック」、第一出版株式会社、東京(編集中)

関澤 純 監修「リスクコミュニケーションの最新動向を探る」化学工業日報社、東京(編集中)

F. 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(データベース等)

なし

厚生労働科学研究補助金(食品・化学物質安全総合研究事業)

分担研究報告書

インディルビンの体内動態検討を目的とした高感度測定法の開発

分担研究者 宮入 伸一 日本大学薬学部

研究要旨

オーファン受容体に分類され、外来のダイオキシンなどに高い親和性を示すアシルハイドロカーボン受容体の内因性リガンドの候補としてインディルビンが注目されている。インディルビンの生体作用を解析するうえで、その体内動態や生体内分布に関する知見は重要である。そこで、インディルビンの高感度測定法の開発を企て、まず新たに調製した抗体を用いた酵素イムノアッセイ法を開発した。また、より高い精度が期待されるガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC-MS) の開発も考慮して、インディルビンの安定同位体 (重水素、炭素-13) 標識体を合成し、GC-MS における挙動など基礎的検討を行った。

A. 研究目的

ダイオキシン受容体に高い親和性を示すインディルビンの生体機能・動態に興味をもたれている。そこで、インディルビンの高感度測定法の開発を企て、特異抗体を用いた酵素イムノアッセイ系の構築およびガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC-MS) 構築のための安定同位体の合成を試みた。

B. 研究方法

酵素イムノアッセイ (EIA) 系の確立: まず、アニリンの 4-カルボキシメチル (C2) 体と 4-カルボキシプロピル (C4) 体を出発原料としてハプテンを合成した。アニリン誘導体を常法に従いイサチン誘導体へと変換し、酢酸インドキシリルと縮合させて 5-C2-インディルビンおよび 5-C4-インデ

イルビンを製した。次いで、ハプテンをカサ貝ヘモシアニンとの結合体へと導き、家兎を感作して抗インディルビン抗血清 (C2-Ab, C4-Ab) を得た。なお、EIA の酵素標識抗原には、ブリッジヘテロロジーにおいて高感度系の構築に有利とされる、より短いブリッジを有した 5-C2-インディルビンの β -ガラクトシダーゼ結合体を用いた。

安定同位体標識インディルビンの合成: $[2,3,4,5,6-^2\text{H}_2]$ アニリンおよび $[1,2,3,4,5,6-^{13}\text{C}_6]$ アニリンを出発原料として、常法に従ってイサチンに誘導し、先と同様に縮合反応により $[4,5,6,7-^2\text{H}_4]$ インディルビンおよび $[3a,4,5,6,7,7a-^{13}\text{C}_6]$ インディルビンを合成した。

C. 研究結果

要約: ウサギを感作して抗インディルビン抗体を作成し、感度に優れるインディルビンの EIA 系を