

「内分泌かく乱物質」
平成10年度採択研究代表者

遠山 千春

(国立環境研究所 環境健康研究領域長)

「リスク評価のためのダイオキシンによる内分泌かく乱作用の解明」

1．研究実施の概要

ダイオキシンがヒトの健康に及ぼす影響とそのメカニズムに関する研究成果の日本からの発信は極めて少なかった。リスク評価のためには、ダイオキシンが内分泌かく乱作用を通して生殖機能、脳機能・行動、免疫機能に及ぼす作用とメカニズムの解明が不可欠である。我々は、マウスやラットなどの実験動物を、受精卵から出生までのもっとも感受性が高い期間にダイオキシンを曝露し、内分泌かく乱作用のメカニズムの解明を行うことを目指して研究を進めている。

特定の妊娠時期にTCDDに曝露された母動物から生まれた仔ラットにおいて感受性の高い反応として判明したことは、前立腺の発育遅延とアンドロゲン受容体の感受性低下、雄の甘味嗜好と交尾行動の脱雄性化の促進、甲状腺ホルモンの恒常性のかく乱と甲状腺濾胞細胞の過形成、仔の免疫臓器（脾臓）における細胞数減少などであった。このほか、成獣へのTCDD曝露実験により、これまでのインフルエンザウイルスへの感染抵抗性の低下の知見とは異なり抵抗性は観察されないこと、アトピー自然発症マウスへのTCDD曝露により、免疫はむしろ抑制されることなども判明した。メカニズムについて、マウス受精卵及び精巣器官培養系、胎盤細胞系、神経細胞培養系、胸腺器官培養系、初代培養T細胞を用いて、それぞれ、検討を進めている。妊娠時期の特定に時期にTCDDに対して感受性が高いCritical Windowがあることを示すデータが報告されている。今年度に得られた研究結果から判断すると、一般環境で特別にダイオキシンに曝露していないヒトの集団と同等から数十倍の体内負荷量のレベルで、鋭敏な影響が観察されることが明らかになった。

今後、我々の保有する多彩な実験系を活用して、TCDD曝露により変化を受ける遺伝子/タンパク質の解析を行い、TCDDの体内負荷量と毒性発現のメカニズムの解明と毒性評価をさらに進めていきたい。

2．研究実施内容

本研究課題は、生殖機能、脳機能・行動、免疫機能という3つの独立したサブテーマ、ならびにこれらに共通するサブテーマとしてリスク評価の計4つのサブテーマから構成され、それぞれが独立した研究グループを構成している。すなわち、対象

とする生体反応は様々であるが、可能な限り、ダイオキシンを曝露した共通の動物を共用すること、また、共通の実験技術などはグループを越えて研究者の相互協力体制の元に遂行すること、また、研究結果については、それぞれのグループの独自の研究課題ごとにとりまとめると同時に、リスク評価グループを中心に総合的に研究成果のとりまとめができるように構想されている。以下に本年度に得られた成果の一部を紹介する。

(1) 生殖機能への影響

受精卵、初期胚への影響

ダイオキシンの胚発生と胚内における遺伝子発現への影響を解析する目的で、マウス受精卵を体外培養し、8細胞期胚を24時間100nM TCDDに曝露して分化率を測定した。その結果、胚盤胞への分化はTCDDによって影響されないことがわかった。また、各培養胚からRNAを抽出し、CYP1A1の発現を半定量的RT-PCRで測定したところ、2および8細胞期においては対照群と変化はないものの、胚盤胞に有意な発現の上昇が観察された。

雄性生殖細胞系列に対する影響

ダイオキシン類の雄配偶子（精子発生）への影響が、直接的なものであるのか、個体レベルの内分泌攪乱作用によるものか検討するため、出生直後のICRマウス精巣を摘出し、co-PCB（0, 10, 100, 1000 nM）及び10%子牛血清を含む培地で48時間器官培養し、生殖細胞増殖率、CYP1A1および生殖細胞分化マーカーの発現を解析した。その結果、CYP1A1 mRNAの発現はco-PCBの用量依存的に上昇した。半数体特異的分化マーカーであるHsc70t mRNAは、100nM co-PCBを添加した場合にのみ8, 12日間培養したいずれの精巣においても対照群にくらべて有意に高い傾向を示した。また、細胞増殖率に有意差は認められなかった。

雄性生殖器官発生に及ぼす影響

ダイオキシン類の胎仔期曝露によりもっとも顕著な変化を示すとされる雄の外部生殖器・副生殖腺の発生影響における作用メカニズムの解明を目的に、関連する遺伝子の発現変化と、最も影響の現れやすい投与時期を検討した。妊娠15日（GD15）のラットにTCDDを単回経口投与、産仔の成熟後、腹側前立腺内5 α -reductase mRNAの発現は用量依存的に上昇したが、androgen receptor mRNAは逆に減少し、そのLOELは12.5 ngTCDD/kgであった。またGD15, GD18, PND2に1 μ gTCDD/kg投与したところ、GD15投与でAGDと腹側前立腺の減少、androgen receptor mRNAの前立腺内での減少が見られたが、GD18とPND2投与群では変化がなかった。この結果より、TCDD胎仔期曝露による腹側前立腺重量の減少は、ARの減少（アンドロゲン感受性の低下）によることが

示唆された。また前立腺重量の減少は、GD15より後の妊娠期間中における曝露では引き起こされないこと、すなわちクリティカルウィンドウの存在が示された。

胎盤・妊娠子宮機能に及ぼす影響

ダイオキシンによる胎仔死産のメカニズムとその感受性時期を実験動物レベルで確定する目的で、TCDD投与による妊娠子宮と胎盤機能の変調を解析した。ラットのGD15に1.6 μ gTCDD/kgを投与すると、GD20における胎仔死亡が増加し、胎盤構成の一種であるグリコーゲン細胞と胎盤内グリコーゲン濃度の上昇が認められた。また、GD8, 9, 10に総量2 μ gTCDD/kgを投与したところ、GD12において母体子宮の子宮筋層の薄層化が観察された。また、ラット胎盤由来細胞であるRcho-1を用い、TCDDを曝露によって発現の増加するタンパク質を二次元電気泳動法とアミノ酸配列解析で同定したところ、その一つが、低分子量型熱ショックタンパクの一種であるHsp27であることが判明した。

(2) 脳機能・行動に及ぼす影響

脳における性決定機構へのダイオキシンの影響とそのメカニズム解析

新生仔の脳アロマターゼ活性と性成熟後の性行動に対するTCDDの影響についてHoltzman系ラット妊娠15日目にTCDDを投与して検討した。TCDDが雄産仔ラットのアロマターゼ活性を選択的に抑制することを明らかにした。甘味嗜好に対して雄の雌型への変化が認められた。また、雄の交尾（性）行動に対して抑制的な影響を及ぼし、性行動に影響が認められたラットの大脳皮質では、性行動刺激において発現する遺伝子が抑制されることが認められた。

ダイオキシン類の甲状腺における毒性発現機構の解析

妊娠15日にTCDDを経口一回投与し、生まれてきた仔の甲状腺ホルモン、甲状腺組織への影響およびそのメカニズムについて検討を行った。血清中T4濃度は、生後21日齢のTCDD 200ng/kg及び800ng/kg投与群ラットにおいて対照群に比べて有意な低下が認められたが、49日齢ラットでは対照群のレベルであった。血清TSH濃度は生後21および49日齢ラットの800ng/kg投与群で有意に上昇した。生後21日齢及び49日齢で、TCDD 200ng/kg投与群からCYP1A1 mRNAの顕著な誘導が認められた。生後21日齢のTCDD 200ng/kgおよび800ng/kg投与群でUGT1 mRNAレベルの有意な上昇が認められたが、49日齢では対照群のレベルであった。このことは肝に蓄積されたTCDDによる肝UGT-1の誘導とそれによるT4排泄促進によるものと考えられた。血清及び臓器中TCDD濃度は生後21日齢で最高値を示したが、49日齢ラットでは著しく減少した。組織病理所見で生後49日齢800ng/kg投与群で甲状腺過形成が観察され、PCNA陽性の甲状腺濾胞細胞の著しい増加が認められた。これまで成獣に

対する繰り返し慢性投与実験で甲状腺腫瘍が生じるとの報告があったが、妊娠期における低用量のTCDDの単回投与によって、仔ラットの血清T4レベルの低下および血清TSHの上昇を引き起こし、その後に甲状腺過形成を起こすことが初めて明らかとなった。

ダイオキシン類の甲状腺における毒性発現機構の解析

C57BL/6系マウスを用いてTCDDの胎生期曝露による遺伝子発現の影響を解析したところ、胎生18 5日目、新生21日目の脳において、Secreted Frizzled-Related Protein 2 (SFRP2)の発現が上昇することを明らかにした。この結果から、TCDDがWntシグナル伝達系を介して脳神経における毒性を発現する可能性が示唆された。

神経系細胞へのダイオキシン類の影響

C6 glioblastomaを用いてTCDDがアストロサイト様分化を阻害するかどうか調べた。分化に伴って誘導されるアストロサイトマーカー・グリア繊維酸性蛋白質 (GFAP) の発現が、TCDDにより用量依存的に抑制され、さらに、分化型アストロサイト様細胞の形態変化にもTCDDが抑制的に働くことを明らかにした。

(3) 免疫機能への影響

TCDDの低用量の経胎盤・授乳期曝露が仔の免疫臓器に及ぼす影響

TCDDの低用量経胎盤・授乳期曝露の免疫機能への影響に関する基礎的知見を得るために、妊娠したHoltzmanラットに12.5 - 800 ng/kgのTCDDを一回経口投与し、生まれた仔(雄)の免疫臓器について臓器重量、細胞構成、TCDD含量、およびCYP1A1 mRNAの誘導を生後5, 21, 49, 120日に測定した。主な結果として、脾臓で生後49日のみにTCDDの用量依存的な細胞数の減少が観察され、低用量TCDDの経胎盤・授乳期曝露が思春期前後に特異的に免疫臓器に影響を及ぼすことが示された。このことは、TCDDの経胎盤・授乳期曝露の影響がある時期特異的に発現する影響として生体に残されるという点で特に留意が必要と考えられた。

アトピー性皮膚炎自然発症マウス (NC/Nga) におけるアレルギー反応の誘導に対するTCDDの影響

6週令のNC/Ngaマウスを卵白アルブミン(OVA)で免疫すると同時に、0, 5, 20 μ g/kgのTCDDを一回経口投与し、追加免疫の後、血中のIgE値、免疫臓器のリンパ球亜集団の変動、サイトカイン産生について測定した。その結果TCDD投与マウスにおいて、抗原刺激した脾臓細胞からのインターロイキン(IL)4とIL-5産生の低下や、血清中の抗原特異的IgEの低下が観察され、TCDDはアトピー性皮膚炎の発症に関わるアレルギー反応に対しては抑制的に作用すること

が示唆された。

低用量TCDD曝露が感染抵抗性に及ぼす影響

先にBurlesonらは、10 - 100 ng/kgというごく低用量のTCDDの一回経口投与が、B6C3F1マウス（メス）のインフルエンザウイルス感染による死亡率を高めることを報告している（Fundam. Appl. Toxicol. 29, 40, 1996）。この結果を追試するため、B6C3F1マウスのメスについて、Burlesonらと同じスケジュールでTCDDおよびインフルエンザウイルスを投与し、死亡率を観察した。すなわち、0、5、20、100または500 ng/kgのTCDDを一回経口投与し、1週間後に約30%致死量のインフルエンザウイルス（A/PR/8/34）を経鼻投与し、その後20日間死亡率の変化を調べた。その結果、いずれの用量においてもTCDDによる明らかな死亡率の増加は認められなかった。

TCDDによる胸腺細胞分化の変化誘導のメカニズム

TCDDを動物に曝露すると、胸腺の細胞数が減少し、CD4⁺CD8⁺ double positive（DP）胞からCD4またはCD8 single positive（SP）細胞への分化がCD8 SP細胞側へ偏ることが報告されている。マウス胎仔胸腺器官培養系（FTOC）にTCDDを加えて培養することにより、これらの*in vivo*の変化を再現することができる。この系を用いてTCDDによるCD8 SP細胞の分化促進のメカニズムを検討した。MAPKKスーパーファミリーのメンバーであるMKK1/2の阻害剤を用いた実験から、TCDDによるCD8 SP細胞の分化促進にはMKK1/2の活性化が必要であることが示唆された。

Tリンパ球（T細胞）のTCDD反応性の検討

従来、細胞株を用いた実験でT細胞のAhレセプター（AhR）にはxenobiotic responsible element（XRE）に対する結合活性がないことが報告され、TCDDによるAhR依存的な免疫抑制においてT細胞はTCDDの直接の標的とならないと考えられていた。一方、我々の最近の実験結果では、TCDDがT細胞由来のサイトカイン産生を抑制し、これらがTCDDによる抗体産生抑制に関与することが示唆された。そこで正常なT細胞（初代培養細胞）においてもTCDDはAhR依存的な遺伝子誘導を起こさないかどうかを確認するため、CYP1A1の誘導を指標にT細胞のTCDD反応性をB細胞と比較検討した。その結果、初代培養T細胞ではB細胞と同様にTCDD存在下培養することによってCYP1A1遺伝子が誘導されることが明らかとなり、TCDDによる免疫抑制においてT細胞がTCDDの直接の標的となりうることを示された。

(4) 内分泌攪乱作用に基づいたダイオキシンのリスク評価手法の提示

妊娠15日のラットにダイオキシン（TCDD）を一回経口投与し、経時的にと殺し、母親および仔の臓器中濃度をGC-MSにより測定した。妊娠16日目（投与1日

後)、20日目(投与5日後)ともに、どの臓器においても用量依存的にTCDD濃度は増加し、脂肪を除き経時的にTCDD濃度は減少していた。脂肪では妊娠20日目の方が16日目よりもTCDD濃度が高く、脂肪組織へのTCDDの移行には他臓器に比べ時間を要することが明らかとなった。TCDD濃度は特に肝臓で高く、次いで脂肪、肺、腎臓の順であった。また、用量が高いほど肝/脂肪比が大きくなり、肝臓への蓄積傾向が高まることが確認された。胎仔のTCDD濃度は、50ng/kg投与群において、妊娠16日目と20日目で、それぞれ8および5pgTCDD/wet-gであった。さらに、母親血清中TCDD濃度と臓器中のTCDD濃度の相関をみたところ、脂肪を除き良好な相関関係が見られ、臓器中濃度は血中濃度に依存し、血液を介し比較的短い時間で各臓器にTCDDが分布することが明らかとなった。また、脳や胎仔のTCDD濃度は血清中濃度よりも低く、その移行に際し何らかの障壁が存在することが示唆された。

体内負荷量の観点から見ると、本年度の観察結果のうち悪影響であるかどうかは不明であるが、感受性が高いエンドポイントは、腹側前立腺におけるAhR発現の低下であった。50ng/kgの単回経口投与によって胎仔の体内負荷量は5 - 8 pg TCDD/wet-gとなり、この数値は、特別の曝露がないヒトにおける体内負荷量5pgTEQ/gに匹敵する量となる。腹側前立腺重量、肛門生殖突起間距離をはじめ、脳行動、免疫関連のエンドポイントは、高々10倍から数十倍のレベルで変化が認められたことから、ヒトの曝露量と影響との間のゆとりは小さい。

3. 主な研究成果の発表(論文発表)

Ohsako S., Miyabara Y., Nishimura N., Kurosawa S., Sakaue M., Ishimura R., Sato M., Aoki Y., Sone H., Tohyama C., and Yonemoto J. 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. Sci*, 60; 132-143, 2001.

Nohara K., Fujimaki H., Tsukumo S., Ushio H., Miyabara Y., Kijima M., Tohyama C. and Yonemoto J. The effects of perinatal exposure to low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on immune organs in rats, *Toxicology*, 154: 123-133, 2000.

西村典子、宮原裕一、鈴木純子、佐藤雅彦、佐藤巳喜夫、米元純三、誘導と重金属の変動。BIOMEDICAL RESEARCH ON TRACE ELEMENTS Vol.11 No.4, 2000.

Ohsako S., Ishimura R., Aoki Y., Tohyama C., and Yonemoto J. Decrease of androgen sensitivity in the ventral prostate of male rats exposed maternally to

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD)Organohalogen Compounds 49 : 401-403, 2000.

Nishimura N., Miyabara Y., Suzuki J S., Sato M., Yonemoto J., Satoh M., Aoki Y., Tohyama C. Metallothionein as a marker of TCDD-induced oxidative stress in the rat. Organohalogen Compounds ; 49, 162-165,2000.

Tsukumo S., Tohyama C. and Nohara K. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)stimulates the positive selection of CD4⁺CD8⁺ thymocytes through the activation of MKK1/2 and PKC, Organohalogen Compounds , 2000.

Fujimaki H., Nohara K., Kobayashi T., Tsukumo S., Kijima M. and Tohyama C. Effect of a single oral dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on immune function in NC/Nga mice, Organohalogen Compounds, 2000.

池田雅彦、犬飼直美、三井哲雄、曾根秀子、米元純三、遠山千春、富田多嘉子。Effects of TCDD on Sexual Diflerentiation Influence of the *in utero* Exposure on Fetes Brain Aromatase Activity in Rats. Organohalogen Compounds, 2000.

遠山千春、大迫誠一郎、石村隆太。内分泌攪乱物質の健康リスクアセスメント。日本臨床。Vol.58(12) 2393-2400, 2000.

米元純三、曾根秀子。ダイオキシンと性ホルモンとの相互作用。廃棄物学会誌 ; 11, 162-172(2000)

西村典子、宮原裕一、鈴木純子、佐藤雅彦、佐藤巳喜夫、米元純三、青木康展、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と重金属の変動。Biomed. Res. Trace Elements ; 11, 387-388(2000)