

< 解説 >

最新成果:内分泌攪乱物質による環境リスク研究

松井 三郎

京都大学大学院地球環境学堂*

平成 13-15 年度 科学研究費補助金 特定領域研究「内分泌攪乱物質の環境リスク」班代表

Saburo Matsui

Ph.D Professor, Kyoto University Graduate School of
Global Environmental Studies Department of Technology & Ecology

1 内分泌攪乱物質の研究課題

環境ホルモンすなわち内分泌攪乱物質の環境汚染について、余りたいした問題ではない、という誤解が広がりつつあることに筆者は危機感を持っている。研究の進展により環境ホルモンを考える重要な視点が見つかり、今後の研究の方向性が明らかになったと考えている。

文部科学省の特定領域研究班が行った組織的研究活動は「内分泌攪乱物質の環境リスク」(松井三郎代表)で、総括班のもとに6班で構成されている。それはA01班「内分泌攪乱物質の人体汚染」(森千里代表, 千葉大学), A02班「内分泌攪乱物質による野生生物の汚染と影響」(田辺信介代表, 愛媛大学), A03班「内分泌攪乱物質の毒性メカニズム」(井口泰泉代表, 岡崎共同研究機構), A04班「内分泌攪乱物質の代謝機構」(吉原新一代表, 広島大学), A05班「内分泌攪乱物質の汚染評価法(バイオアッセイ, バイオマーカー)」(有園幸司代表, 熊本県立大学), A06班「内分泌攪乱物質のリスク管理」(森澤眞輔代表, 京都大学)である。この研究班に加わったチームは、3年間で100を超えていて、多くの新しい発見解明があった。ここでは紙面の都合上ハイライトを紹介する。

2 内分泌攪乱物質とは何か?

アメリカEPAが提起し、疑われている物質は約70種類である。それらのうち指摘されている環境ホルモン物質は、ダイオキシン類, PCB類に加えて船の船底に塗布

して牡蠣や貝類の付着を防止する有機スズ, 非イオン界面活性剤のオクチルフェノールが下水処理場で途中まで分解されてできるノニルフェノール, フタル酸エステル類の可塑剤, ビスフェノールAなどのプラスチック原材料, 農薬のDDT, 植物由来のホルモンで大豆食品に含まれるジェニスタイン, ダイゼイン等である。これらの物質が野生生物に影響を及ぼしていたり, 人にも影響を与えることが明らかになってきた。今後物質数は, 増加することが予想される。ここで, 重要な点は, 人工化学物質に加えて, 植物ホルモンも問題となっていることと, 人や動物が排泄する天然ホルモンも場合によって, 環境汚染問題になる可能性がある。

これら内分泌攪乱物質は, 化学的には脂溶性であり, 水にもよく溶ける性質を持っている。そのため容易に細胞膜を通過したあと細胞内にあるホルモン受容体(蛋白質=転写制御因子と呼ぶ)に, 受け止められて, 複合体を形成する。野球のボールのようなホルモン(リガンドとも呼ぶ)がグラブのような受容体(転写制御因子)に捕球される。本来のホルモンであるボールを受けて止めるばかりでなく, 少し変形した環境ホルモンも受け止め複合体を形成する。ここに環境ホルモンの攪乱が生じる。複合体はその後核内に移動し, 染色体の特定位置に結合し, その下流の染色体2重螺旋が開いて遺伝子群が, RNAに読み取られ, 核外にある小胞体で特定の酵素などの蛋白質群が生産される。ホルモン物質は情報伝達物質であり, 情報は蛋白質群を生成することで伝達が達成する。このように環境ホルモンは, 誤った情報伝達で蛋白質群を生成するような攪乱を行う。また, 受容体をブロックして正しいホルモンの複合体形成を阻害することもある。

*〒606-8501 京都市左京区吉田本町
TEL:075-753-5151 FAX:075-753-3335
E-mail:matsui@eden.env.kyoto-u.ac.jp

3 女性ホルモン攪乱

ヒトの女性ホルモン受容体は、 $ER\alpha$ 、 $ER\beta$ の 2 種類ある。この受容体に間違っ受容される化学物質がかなりの数になる。とりわけ工業生産量が多く下水、工場排水、農業排水から河川に流入する物質で、研究対象とされたものが非イオン界面活性剤のオクチルフェノール等とそれが下水処理場で分解されてできるノニルフェノール、プラスチック原材料のビスフェノール A である。

ビスフェノール A は、食器類の素材であるポリカーボネート樹脂の原料であり、歯科治療用のシーラントとしても使用されている。A04 班、広島大学の吉原新一助教授はビスフェノール A が体内摂取後の異（薬）物代謝酵素により、元のビスフェノール A よりも千倍以上強力なエストロンゲン活性を示す活性代謝物が生成することを突き止めた。A01 班、京都大学霊長類研究所の浅岡一雄助教授のグループは、日本サルを用いた環境ホルモン研究で、大豆食品に含まれるジェニスタイン、ダイゼイン等が、大きな影響を与える可能性をしめした。日本サルは、遺伝子の種類でヒトと共通性が高いことが証明され、胎盤の構造がヒトのそれと解剖学的に似ていることから、研究対象として優れている。フタル酸エステルやジェニスタイン、ダイゼイン等はサル母体から胎盤を透過して胎児に移行した。サルの雌群を使い、食事に大豆を多く含む群と含まない群では、初潮の開始時期に明確な差が生じた。また閉経したメスサルに大豆を多く与えると、メンスの再開が見られた。大豆や豆類に含まれるイソフラボン類の重要性が指摘されていることをサルを使った実験で証明した。大豆を食品として利用することの注意を、ミズリー大学の F. vom Saal 教授も指摘している。マウスを使ったビスフェノール A 実験で、餌に蛋白質としてカゼインを使った場合と、大豆を使った場合では、ビスフェノール A の影響に顕著な違いが生じている。カゼインの場合、明らかな影響が生じたが、大豆の場合、影響が隠れた。このことは、食品と環境汚染物質の複合性を考慮する必要性が、明らかになってきた。大豆のジェニスタイン、ダイゼイン等植物女性ホルモンの影響をヒトに当てはめると、周産期（生まれる数週間前と生まれて数週間の期間）の男児について注意をする必要性を示している。母親から男児に大豆のジェニスタイン、ダイゼイン等植物女性ホルモンが、与えられると男児がちょうど脳形成を活発に行うときに影響を与える心配が指摘されている。一方、大豆食品は女性にとって良い健康影響をあたえ、男性では前立腺がんの場合、癌増殖抑制として治療的影響がある。

したがって内分泌攪乱物質の摂取による影響は、ヒトの受精、胎児、周産期、児童成長期、思春期、結婚、出産、閉経、老年期とライフステージによりクリティカルな時期が違っている。

4 ダイオキシンの環境汚染

A02 班、愛媛大学農学部岩田久人助教授のグループは、ダイオキシン類による水鳥および水棲哺乳動物の汚染と影響を調査している。琵琶湖のカワウや北太平洋のクロアシアホウドリ、バイカル湖のバイカルアザラシといった野生動物から高濃度のダイオキシン類が検出された。例えば琵琶湖から採集したカワウの肝臓中のダイオキシン類濃度は、最高で 50,000 pgTEQ/g（脂肪中当たり）にも達していた。その濃度は一般のヒトの汚染と比べ数百倍も高かった。ダイオキシン類の生体影響をみるため、異物代謝酵素であるチトクロム P450 の発現量を肝臓で調べたところ、この酵素の発現量は体内ダイオキシン類の濃度が高い個体ほど高いことがわかった。また、ダイオキシン類の一部はチトクロム P450 の発現量が増えることによって選択的に代謝されるが、ほとんどのダイオキシン類はそのまま体内に残留し、慢性的なチトクロム P450 発現量の増加に関与していることがわかった。このチトクロム P450 はダイオキシン類のみならず、エストロゲンなどのホルモンを代謝する役割も担っているので、ダイオキシン類によるこの酵素量の慢性的な増加は、ホルモンの恒常性の攪乱を引き起こしていると予想された。

5 ダイオキシン、PCB、多環芳香族物質の毒性影響

ダイオキシン類、PCB 類、多環芳香族物質類は子宮や乳腺などの女性器官や多くの部位に、胎児では脳を含む多くの部位に取り込まれることが、日本サルの研究でわかった。ダイオキシン類とりわけ 4 塩素ダイオキシン (TCDD) は、AhR (多環芳香族物質類受容体) と呼ばれる受容体に極低濃度で受け止められダイオキシン複合体を形成する。その場合複合体にはそれを補助する Arnt と Hsp90 転写制御因子も一緒になって複合体が形成され、染色体の遺伝子 XRE に結合する (Fig.1 参照)。Fig.1 は、ダイオキシンの代わりに、Benzo(a)pyrene を使って説明している。左側で複合体形成のモードが示され、左下で CYP1A1 遺伝子が代表的に活性化されることを示している。これは、チトクロム P450 の 1 種で、Benzo(a)pyrene

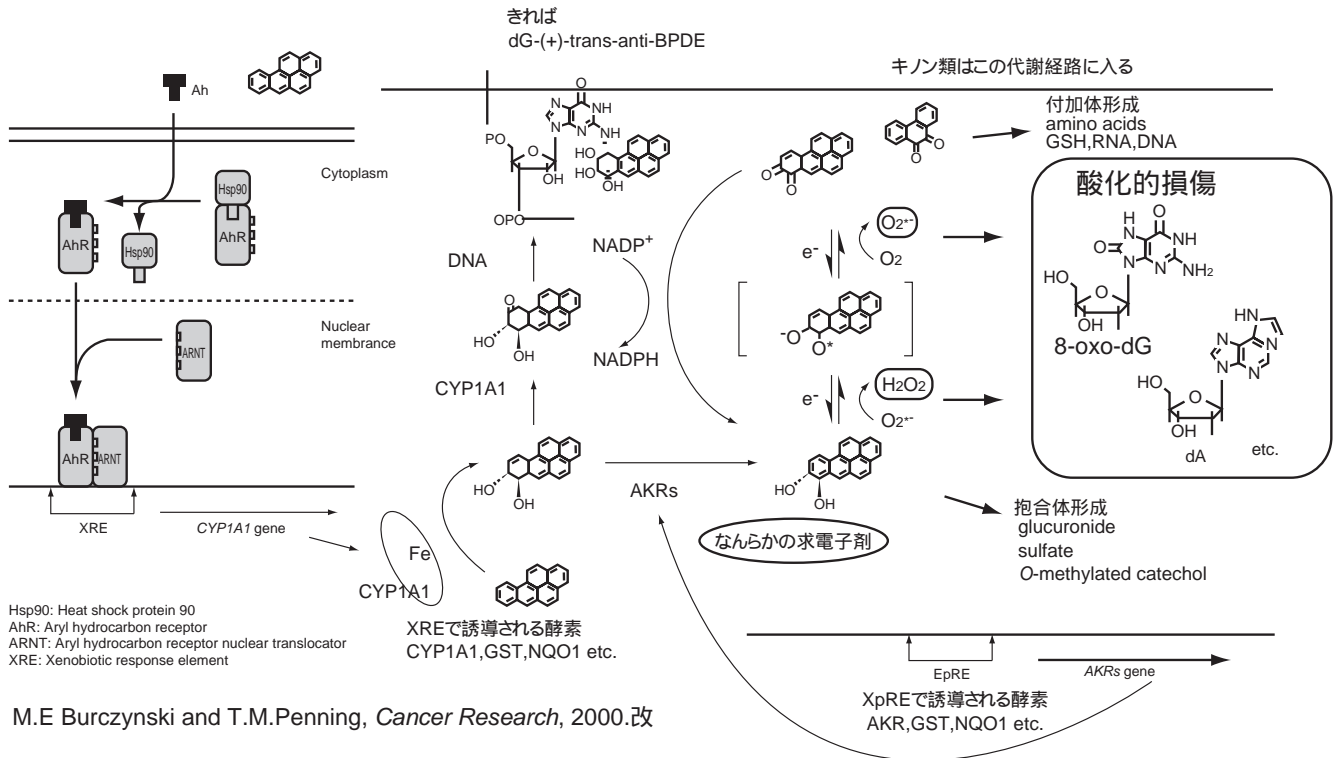


Fig.1 Benzo[a]pyrene の DNA 損傷と酵素誘導メカニズム

など多環芳香族物質類を酸化し、OH 基を形成する酵素である。他に GST, NQO1 等が活性化される。OH 基の付加形成は、Benzo(a)pyrene など多環芳香族物質類を水に溶解しやすくする。まだ、詳しく解明されていないが、二つの毒性経路が提示されている。一つは、中央の経路で、酸化された Benzo(a)pyrene が DNA のグアニン塩基に付加結合して遺伝子損傷となる。損傷したグアニン塩基とデオキシリボース糖が、すっぱり切れると dG-(+)-trans-anti-BPDE となつてはずれ、尿中に排泄される。このような損傷遺伝子が起こると正常遺伝子を挿入する修復を強制するがその過程で、修復間違いにより突然変異が起こり、さらに発癌遺伝子に偶然このことが起これば、発癌遺伝子が活性化する。

もう一つの経路は、Fig.1 の右下側で、まだ、詳しく解明されていないが、チトクローム 450 の一つであるアルドーケト還元酵素-AKRs 酵素群 (AKR, GST, NQO1 等) が XpRE 遺伝子の誘導で活性化 (この分野が未だ十分に解明できていない) すると、右側下に示した抱合体 (グルクロン酸抱合、硫酸抱合、メチルカテコール抱合など) を形成して尿中に排泄される。この経路は解毒経路であり、毒性効果を回避するものである。ところがこの解毒経路に乗らず別の経路に誘導されると、第2の毒性

効果を与えることになる。抱合体形成ができないと細胞内の過酸化物質 (H_2O_2 , O_2^{*-}) の酸化が進行し、過酸化物質はグアニン塩基を 8-oxo-dG, アデニンを ϵ dA の酸化的損傷物質に変える。これも遺伝子損傷、発癌に進行する経路である。さらに酸化が進んだ Benzo(a)pyrene はキノン類になり、アミノ酸, GSH, RNA, DNA 等に付加体として損傷を起こす。

4塩素ダイオキシン (TCDD) は、AhR で受容され、チトクローム p450CYP1A 酵素を大量に生産させるが、酸化して OH 基を付加させることができない。またグルクロン酸、硫酸抱合体の形成ができず、解毒できないことから細胞内に留まり続ける。ヒトの場合、体内残留半減期間は 7.5 年と推定される。細胞内においてチトクローム p450CYP1A など多くの遺伝子を動かし、多くの不必要な酵素群を生成させ、本来、バランスよく生成し反応し、消滅する酵素群の動きを攪乱している。チトクローム p450 群の酵素は、ステロイドホルモンの合成に必要な酵素であり、女性ホルモン、男性ホルモン、黄体ホルモン、ストレスホルモンは、ヒトや多くの高等動物の生命活動と生殖活動、脳活動の根本ホルモンである。PCB 類もダイオキシン類と同じで、ステロイドホルモン生成に重大な影響を与える。特に高濃度暴露を受けると脳形成

と脳活動に影響がある。台湾で発生した、台湾カネミ油症事件の追跡調査で、児童のIQ低下が疑われている。このことから、アメリカ五大湖周辺で、PCB濃縮が高い、鮭、鱒の摂取により、多食集団に脳活動に影響が出ていないかどうかの研究が進められている。

しかし、ダイオキシンの攪乱機構はもっと複雑であることをA03班の東京大学分子細胞生物学研究所の加藤茂明教授グループが発見した。ダイオキシン-AhR-Arnt-Hsp90転写制御因子複合体が、同時に存在する女性ホルモン受容体複合体をハイジャックするかのよう合体して、女性ホルモン複合体の情報伝達を阻害する可能性が示された。この研究は、細胞内に存在するArntやHsp90など転写制御因子が、どのような機構で生産され、活動し消滅するのか、未だ未解明の分野を解明しなければならないことを明らかにした。

6 内分泌攪乱物質研究の今後

筆者の研究室は、ヒト尿中にダイオキシンの排泄量を測定しようとしたが、失敗に終わった。つまりダイオキシン類の殆どは、チトクロームp450CYP1Aに始まる解毒代謝を受けないことから、尿中には排泄されず、糞排泄と皮膚から分泌によって、また母親が胎児に移して排泄している。しかし、尿中にダイオキシンより、50分の1の低濃度でAhR-Arnt-Hsp90転写制御因子複合体を形成するインディルビン、ほぼ同じ濃度で形成するインディゴを発見した。インディルビン(紫色)、インディゴ(青色)は、藍の染料物質で二つの染料が重なって藍色の深みが染色される。ヒトは、必須アミノ酸としてトリプトファンを食品から摂取している。肉、大豆中に含まれている。2個のトリプトファンから腸内細菌の助けと肝臓内で、インドールの1種であるインディルビン、インディゴを毎日生成して尿中に排出している。そもそもAhR(多環芳香族物質類受容体)と呼ばれる受容体は、本来どの物質を受け止めるのか?女性ホルモンや男性ホルモンの受容体は、それぞれホルモンを情報伝達物質として受け止めることは明らかであるが、AhRの本来の情報伝達物質が未解明であった。ダイオキシンは、今まで最も低濃度でAhRに結合するリガンドとして認識されてきた。筆者の研究室の発見により、AhRの本来の情報伝達物質-リガンドはインディルビン、インディゴではないかと仮説を提唱している。これは、動物がなぜ進化の過程でAhRが必要となったかを、明らかにすることにも繋がる。

重要なことは、インディルビン、インディゴと4塩素ダ

イオキシン(TCDD)を毒性比較することで、TCDDの毒性を解明することである。現在、分かっている点は、次のようになる。インディルビンはヒト尿中で0.2nM、牛血清中0.007nMである。チトクロームp450CYP1A11A2の誘導能をヒト肝臓癌細胞で調べた。インディルビンは1pM、TCDDは100pM以上で誘導した。ヒトでは、インディルビンが、十分高濃度で存在しTCDDよりはるかに、重要な役割をはたしている。インディルビンとTCDDをEROD活性阻害効果比較した。インディルビンは、CYP1A1と結合した後に容易に酸化され、AhRリガンド活性を消失し硫酸抱合体などになり尿中排泄される。TCDDCYP1A1と結合しない。

ヒト肝臓癌細胞株HepG2の遺伝子マイクロアレイを用いて、インディルビンとTCDDによるヒト遺伝子の活性化を調べた結果、両者は殆ど同じ遺伝子を活性化あるいは抑制化した。これらの遺伝子は、薬物代謝酵素群、サイトカインや細胞内シグナル伝達、ステロイドホルモンや性分化、細胞周期制御、細胞接着、転写、DNAの複製修復、コレステロール、グルコースの輸送に係わる遺伝子である。そこで、ヒトにTCDDが汚染で侵入しても、その濃度が極低濃度では、自然に生成しているインディルビンの濃度より低いと、TCDDの影響が現れない可能性が出てきた。TCDDがインディルビンを超えて影響を示す培養液濃度は、100pMであった。これ以下では、血液中濃度のインディルビンが、遺伝子を主に制御している。この濃度から推定できることは、現在設定されているダイオキシン類の耐容摂取量と比較すると、耐容摂取量は、血液中TCDDは100pMの濃度にはならない低い値である。ただし、これはダイオキシン類の基準のみについての判断であるが、ヒトは、ダイオキシン類以外に無数の多環芳香族物質類を毎日摂取している。他の無数の多環芳香族物質類の総合的な複合影響については、まだ判断できない。特にタバコによる摂取量は、注意する量のレベルである。個別に低濃度であっても環境汚染物質による人体汚染が、内分泌攪乱する可能性は、十分高い。その場合、食品からも摂取する攪乱、あるいは良い影響を与える天然物質の影響を考慮する研究が、次の重要な課題である。その場合の注目すべき点は、1)ヒトのクリテイカルライフステージの安全性の評価。2)生態系食物連鎖におけるクリテイカルな動物の保護である。

[参考文献]

- 1) 内分泌攪乱物質の環境リスク-研究成果報告会要旨集、領域代表者 松井三郎、2004年1月23, 24日京大会館