

論文内容の要旨

論文題目 化学物質の複合影響に関する研究

～ヒメダカへのエストロゲン作用に関する化学物質の複合影響～

氏名 川原 志郎

1. 緒言

現在環境中には膨大な量の化学物質が存在し、ヒトや野生生物は常に複数の化学物質に曝露されている。これは実際に野生生物の体内からは複数の外因性の化学物質が検出されていることからわかる。複数の化学物質に曝露された場合の生体への影響は単独の化学物質に曝露された場合とは異なると予想されるが、現在のところその知見は限られたものとなっている。環境基準をはじめとする化学物質の規制値などは単独化学物質曝露時の毒性値を基に安全係数を掛けた値に設定されており、化学物質が複合的に曝露した場合の影響については必ずしも考慮されていない。今後、より安全な環境を構築するためには複数の化学物質に曝露された場合の影響の変化を考慮した化学物質の管理が必要である。

化学物質の複合影響を検討するにあたり、バイオアッセイを用いることが有効であると考えられる。バイオアッセイは、対象とする生物が棲む環境中から受ける全ての影響を総合的に評価できるという利点があり、現在までに環境調査に用いた報告は多くなされている。しかしながら、化学物質の複合影響を評価するという観点から行われた研究報告は少ない。ここで、本研究では化学物質の複合影響を検討するにあたり、バイオアッセイの有用性を検証した。

また、本研究では水生生物であるヒメダカを用い、エストロゲン作用のバイオマーカーである血中 VTG 濃度を指標として、作用機序の異なる複数の化学物質に曝露された場合に、その影響に変化があるのか、またあるとしたらどのように変化するのかを明らかにすることを目的とした。

化学物質の複合影響と一言に言ってもその組み合わせは無数にあり、影響を予測し、化学物質の管理をしていくためにはある程度の仕分けが必要と考えられる。そこで本研究では化学物質の曝露影響を変化させるひとつの主要な生理メカニズムである薬物代謝酵素活性に着目した。

2. 実験

2.1.1 エストロン (E1) と β -naphthoflavone(β NF) および α -naphthoflavone(α NF) の複合曝露

水環境中の総エストロゲン活性には天然のホルモンである estrone(E1)が大きく寄与している。一方、環境中の代表的汚染物質として多環芳香族炭化水素 (PAHs) がある。多くの PAHs は体内に取り込まれた後、アリルヒドロカーボンレセプター (AhR) に結合し、薬物代謝酵素 CYP1A (EROD 活性) を誘導する。

薬物代謝酵素が誘導されている状態で E1 が体内に取り込まれた場合、代謝が促進されることにより体内からの排泄速度が増すため、その影響は小さくなる可能性がある。一方で E1 は体内において 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase により E2 に変化することも知られおり、代謝の過程における水酸基の導入位置により、エストロゲン活性を大幅に上昇させる可能性を有していると考えられる。これらのことより、E1 の曝露時に体内において酵素系になんらかの異常が起きていれば E1 の生理作用は大きく変化する可能性がある。

環境中の代表的汚染物質である PAHs の生理活性面から見たモデル物質として広く用いられている物質に β NF および α NF がある。 β NF および α NF はどちらも AhR-ligands (AhR に結合する化学物質) である。 β NF は AhR に結合した後、CYP1A を強く誘導する。一方、 α NF は AhR には結合するものの、 β NF や TCDD などの CYP1A の強い誘導剤と共存した場合には CYP1A の誘導を阻害し、自身は CYP1A を誘導しない、あるいは僅かに誘導すると報告されている物質である。ここで本実験では E1 と β NF あるいは α NF を複合曝露し、VTG 生成への影響を検討した。曝露影響の指標として血中 VTG 濃度と EROD 活性を測定した。

2.1.2 結果および考察

本実験では環境中でのエストロゲン作用に及ぼす化学物質の複合影響を考慮して、E1 と β NF あるいは α NF を複合曝露した。その結果、E1 によって誘導される血中 VTG 濃度は β NF あるいは α NF との複合曝露により影響を受け、どちらも E1 のエストロゲン作用は抑制されることが明確に示された。

一方で、 β NF の曝露時には EROD 活性の有意な誘導が確認できるのに対して α NF の曝露時には EROD 活性に有意な変化が見られなかったことから、VTG の誘導抑制には EROD 活性は直接関係がないことが明らかとなった。

β NF および α NF がどちらも AhR-ligands であること、また既往の研究において AhR-ligands に抗エストロゲン作用があることが多く報告されていることを考慮すると、本実験において示された血中 VTG 濃度の誘導抑制は“AhR と結合すること”と関係しているとする説を支持するものとなった。一方で、 β NF および α NF では AhR へのアゴニスト活性に差があることが報告されていることから、AhR とは直接関係のないメカニズムも存在する可能性が示唆された。

本実験における化学物質の複合曝露影響は拮抗的な作用となったが、単独の化学物質の曝露と比較して明確な差が検出されており、化学物質の複合影響を検討するにあたりバイオアッセイが有用なことを示した。一方で、化学物質の管理にバイオアッセイを用いる場合、その環境中に存在する化学物質どうしが拮抗的な作用をしていることにより、汚染を見逃す危険性があり注意すべきことが示された。

2.3.1 トランススチルベン (t-S) と β NF の複合曝露

化学物質が体内に取り込まれた場合、体外に排泄させやすくするために薬物代謝酵素が誘導される。この薬物代謝酵素の働きにより化学物質は構造変化を起こすが、その過程で本来の構造よりも強い生理作用を獲得することがある。これを代謝活性化という。現在までに、S9（薬物処理をした肝臓ホモジネートを9000gで遠心分離した上清）や薬物処理をしたラットやヒトなどの肝ミクロソーム区画を用いた代謝活性化試験に於いて、基の化学物質と比較してエストロゲン活性が増加する化学物質がいくつか報告されている。それらの物質の中でも基の構造ではエストロゲン活性を持たないにもかかわらず、代謝生成物のエストロゲン作用が特に強いものとして **trans-stilbene (t-S)** がある。t-S はヒトおよびラットの CYP1A1/2 によりエストロゲン活性を持つ代謝物が生成することが報告されている。

ここで、本実験では CYP1A の誘導剤である β NF と、CYP1A による代謝の結果エストロゲン作用が増加する可能性のある t-S を複合的に曝露し、エストロゲン活性への影響を検討した。

2.3.2 結果および考察

t-S と β NF を複合曝露した結果、t-S の単独曝露でも血中 VTG 濃度の上昇が確認され、同時に EROD 活性の誘導も確認された。t-S 自身は ER に結合しないことがレセプターバインディングアッセイにおいて示されており、t-S はヒメダカの体内において構造変化を起こしエストロゲン活性を獲得したものと考えられた。また、同時に EROD 活性の誘導も確認できることから、t-S 自身が誘導した EROD 活性により、t-S が代謝活性化されたものと考えられた。

一方、t-S は β NF と複合曝露した場合、 β NF によって誘導されるはずの EROD 活性を抑制するとともに、t-S によって誘導される血中 VTG の誘導が抑制される結果となった。t-S と β NF を複合曝露した場合に β NF が AhR に結合し、正常に転写が行われれば EROD 活性の上昇が確認されるはずであることから、 β NF は AhR に結合しなくても、あるいは転写まで行かずとも血中 VTG 濃度の誘導を抑制する作用を示す可能性が考えられ、AhR とは関連のないところにも、血中 VTG 濃度の誘導を抑制するメカニズムがあることを示唆するものとなった。

3. 総括

本研究においては、ヒメダカを用いて血中 VTG 濃度の変化をエンドポイントとして、化学物質の曝露影響に変化をもたらす主要な因子のひとつである薬物代謝酵素活性を考慮しつつ、化学物質の複合影響について検討した。

本研究においては、作用機構の異なる化学物質の複合曝露によりそれぞれ単独の曝露によるエストロゲン作用に変化が起り得ることが明確に示すことが出来た。また、抗エストロゲン作用に関しては新たなメカニズムの存在の可能性を掘り起こすことが出来た。生体内では様々な機能が働いており、化学物質の複合影響を評価するにあたり、個別のメカニズムのみではなく、生体の反応をより統括的に考えるべきことを明らかにした。