

内分泌攪乱物質の免疫機能に及ぼす影響に関する研究

総括研究者 山崎 聖美 国立公衆衛生院栄養生化学部主任研究官

研究要旨

現在、内分泌攪乱物質として疑われている物質は、我々が日常生活で使用しているものにも多く含まれ、70種にのぼる。これらの物質は、野生生物のみならず、人においても生殖器ガンや精子数の減少につながる事が指摘されている。しかし、内分泌攪乱物質の人の健康に対する影響についてはまだ研究が進んでおらず、早急にこの問題に対処する必要がある。内分泌系は免疫系と密接に関係しており、内分泌攪乱物質は免疫機能を低下させていると考えられ、特に、最近増加したアレルギーや化学物質過敏症との関連も危惧されている。そこで、内分泌攪乱物質が、免疫機能を低下させるか否か、アレルギー発症に関わっているか否か調べることを本研究の目的とし、まず内分泌攪乱物質がヒトリンパ球の反応性に及ぼす影響について調べた。その結果、ノニルフェノール、ビスフェノールA、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジシクロヘキシルはTリンパ球及びBリンパ球の反応性を低下させることが明らかになった。Tリンパ球系培養細胞及びBリンパ球系培養細胞を用いても同様の結果が得られた。また、内分泌攪乱物質および植物エストロジェンをヒト正常ケラチノサイト培養系に添加するとSS-A/Ro自己抗体の増加が見られることを見いだした。

分担研究者

久松 由東 国立公衆衛生院
地域環境衛生学部長
香山不二雄 自治医科大学
衛生学助教授
岡田由美子 国立公衆衛生院
衛生獣医学部研究員

ず、人においても生殖器ガンや精子数の減少につながる事が指摘されているが、内分泌攪乱物質の人の健康に対する影響についてはまだ研究が進んでおらず、早急にこの問題に対処する必要がある。内分泌系は免疫系と密接に関係しており、内分泌攪乱物質は免疫機能を低下させていると考えられ、特に、最近増加したアレルギーや化学物質過敏症との関連も危惧されている。そこで、内分泌攪乱物質が免疫機能を低下させるか否か、アレルギー発症に関わっているか否か調べ、内分泌攪乱物質が

A. 研究目的

現在、内分泌攪乱物質として疑われている物質は、我々が日常生活で使用しているものにも多く含まれ、70種にのぼる。これらの物質は、野生生物に影響を及ぼすのみなら

内分泌攪乱物質が免疫機能に及ぼす影響に関してそのメカニズムを解明することを本研究の目的とする。

B. 研究方法

1. ヒトリンパ球の反応性に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

ヒト末梢血よりリンパ球を調製し、リンパ球のマイトジェンに対する反応性に内分泌攪乱物質が及ぼす影響について調べた。対象とした内分泌攪乱物質は、ノニルフェノール、ビスフェノールA、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジエチル、フタル酸ジシクロヘキシルである。Tリンパ球に対してはコンカナバリンAを、Bリンパ球に対してはスタフィロコッカスオーレウスコーエンIをマイトージェンとして用いた。これらマイトージェンをリンパ球を内分泌攪乱物質存在下で4時間培養したのち添加し、2日間、37度、5%二酸化炭素中で培養し、トリチウム標識チミジンを加えてさらに一晩培養し、ハーベストし、細胞核内とりこまれたトリチウム標識チミジンを液体シンチレーションカウンターを用いて測定し、細胞内におけるDNA合成能を比較した。

2. リンパ球系培養細胞の反応性に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

Tリンパ球系培養細胞としてはJurkat細胞を用い、A23187とホルボルミリスレートアセテートで刺激、Bリンパ球系培養細胞としてはRaji細胞を用い、スタフィロコッカスオーレウスコーエンIで刺激し、1と同様の実験を行った。これらの刺激は、細胞を0時間から24時間ま

での様々な時間内分泌攪乱物質存在下で培養した後に加えた。

3. ケラチノサイト培養系に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

内分泌攪乱物質および植物エストロジェンをヒト正常ケラチノサイト培養系に添加するとSS-A/Ro自己抗体にが見られる変化かどうか調べた。

C. 研究結果

1. ヒトリンパ球の反応性に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

ヒト末梢血から調製したリンパ球を4時間ノニルフェノール存在下で培養した後、コンカナバリンAを加えて刺激した場合を、ノニルフェノール非存在下で培養して刺激し活性化したものと比較すると、10(-8)MではコンカナバリンAによる活性化に変化は見られず、ノニルフェノール非存在下で培養した場合と同程度活性化されたが、10(-7)MでコンカナバリンAによる活性化が一部抑制され、10(-6)Mではほとんど活性化がみられなかった。ビスフェノールAでは、10(-8)M及び10(-7)Mでは活性化に変化はみられなかったが、10(-6)Mではほとんど活性化がみられなかった。フタル酸ジ-2-エチルヘキシルでは、10(-7)M及び10(-6)Mでは活性化に変化はみられなかったが、10(-5)Mではほとんど活性化がみられなかった。フタル酸ジ-n-ブチルでは、10(-7)M及び10(-6)Mでは活性化に変化はみられなかったが、10(-5)Mでは活性化が一部抑制され、10(-4)Mでは活性化がみられなかった。フタル酸ブチルベンジルでは、10(-7)Mでは活性化に変

化はみられなかったが、 $10(-6)$ M及び $10(-5)$ Mでは活性化が一部抑制され、 $10(-4)$ Mでは活性化がみられなかった。フタル酸ジエチルでは、 $10(-4)$ Mでも活性化に変化はみられなかった。フタル酸ジシクロヘキシルでは、 $10(-7)$ M及び $10(-6)$ Mでは活性化に変化はみられなかったが、 $10(-5)$ Mでは活性化が一部抑制され、 $10(-4)$ Mでは活性化がみられなかった。次に、ヒトBリンパ球の反応性に対する内分泌攪乱物質の影響について調べた。ヒト末梢血から調製したリンパ球を4時間ノニルフェノール存在下で培養した後、スタフィロコッカスオーレウスコーエンIを加えて刺激した場合を、ノニルフェノール非存在下で培養して刺激し活性化したものと比較すると、 $10(-6)$ MではスタフィロコッカスオーレウスコーエンIによる活性化に変化は見られず、ノニルフェノール非存在下で培養した場合と同程度活性化されたが、 $10(-5)$ MではスタフィロコッカスオーレウスコーエンIによる活性化はほとんどみられなかった。ビスフェノールA、フタル酸ジ-n-ブチルでは、 $10(-6)$ M及び $10(-5)$ Mでは活性化に変化はみられなかったが、 $10(-4)$ Mではほとんど活性化がみられなかった。フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジシクロヘキシルでは、 $10(-7)$ M及び $10(-6)$ Mでは活性化に変化はみられなかったが、 $10(-5)$ Mでは活性化が一部抑制され、 $10(-4)$ Mでは活性化がみられなかった。フタル酸ブチルベンジルでは、 $10(-7)$ M、 $10(-6)$ M及び $10(-5)$ Mでは活性化に変化はみられなかったが、 $10(-4)$ Mでは活性化が一部抑制された。フタル酸ジエチルでは、

$10(-4)$ Mでも活性化に変化はみられなかった。

2. リンパ球系培養細胞の反応性に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

Jurkat細胞を用い、A23187とホルボルミリステートアセテートで刺激した場合の反応性に対する内分泌攪乱物質の影響について調べた。4時間内分泌攪乱物質存在下で培養した後刺激した場合の反応性は、ノニルフェノール、ビスフェノールA、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ブチルベンジルでは、 $10(-7)$ M及び $10(-6)$ M、 $10(-5)$ Mでは活性化に変化はみられなかったが、 $10(-4)$ Mでは活性化がみられなかった。フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジシクロヘキシルでは、 $10(-7)$ M及び $10(-6)$ Mでは活性化に変化はみられなかったが、 $10(-5)$ Mでは活性化が一部抑制され、 $10(-4)$ Mでは活性化がみられなかった。フタル酸ジエチルでは、 $10(-4)$ Mでも活性化に変化はみられなかった。これらの濃度では、内分泌攪乱物質と同時に刺激を加えても同様の結果が得られた。また、内分泌攪乱物質存在下で24時間培養した後、刺激した場合では、さらに低い濃度で活性化が抑制された。次に、Raji細胞を用い、スタフィロコッカスオーレウスコーエンIで刺激した場合の反応性に対する内分泌攪乱物質の影響について調べた。4時間内分泌攪乱物質存在下で培養した後刺激した場合の反応性は、ノニルフェノールでは $10(-7)$ M及び $10(-6)$ Mでは活性化に変化はみられなかったが、 $10(-5)$ Mでは活性化がみられなかった。ビスフェノールA、フタル酸ジシクロヘキシルで

は10(-7)M及び10(-6)Mでは活性化に変化はみられなかったが、10(-5)Mでは活性化が一部抑制され、10(-4)Mでは活性化がみられなかった。フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジ-n-ブチルでは10(-7)M及び10(-6)M、10(-5)Mでは活性化に変化はみられなかったが、10(-4)Mでは活性化がみられなかった。フタル酸ブチルベンジルでは10(-4)Mで一部活性化が抑制された。フタル酸ジエチルでは、10(-4)Mでも活性化に変化はみられなかった。

3. ケラチノサイト培養系に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

内分泌攪乱物質および植物エストロジェンをヒト正常ケラチノサイト培養系に添加すると、SS-A/Ro自己抗体の増加が見られることを見いだした。

D. 考察

リンパ球のマイトジェンに対する反応性及び内分泌攪乱物質存在下でのリンパ球のマイトジェンに対する反応性は、個人により若干の差が見られたが、概ね研究結果に述べたような結果が得られた。この個人差が何によるものかは推測の域を出ないが、遺伝的素因、男女差等様々考えられるが、血液中における内分泌攪乱物質レベルの違いも影響している可能性があると考えられる。

培養細胞を用いた系では、ヒトリンパ球を用いた場合の反応性と同様の傾向を示し、内分泌攪乱物質のリンパ球の反応性に対するアッセイ系として用いることが十分可能と考えられる。

また、内分泌攪乱物質の曝露によ

りアレルギー疾患や自己免疫疾患の罹患率上昇との関連性に対して示唆を与えていると考えられる。

また、用いた内分泌攪乱物質では、フタル酸ジエチルを除き、全てにTリンパ球及びBリンパ球のマイトジェンに対する反応性を抑制する作用がみられたが、現在その機構について、細胞・分子レベルで解析中である。さらに、インビボでの実験を行う目的で、この結果をもとに、マウスに内分泌攪乱物質を投与しているところである。

E. 結論

ノニルフェノール、ビスフェノールA、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジシクロヘキシルはヒトTリンパ球及びBリンパ球のマイトジェンに対する反応性、及びTリンパ球系培養細胞及びBリンパ球系培養細胞の刺激に対する反応性を抑制する作用があることが明らかになった。また、フタル酸ジエチルではそのような作用はみられなかった。

内分泌攪乱物質および植物エストロジェンをヒト正常ケラチノサイト培養系に添加するとSS-A/Ro自己抗体の増加が見られることを見いだした。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yamazaki T., and Aoki Y. Cathepsin G enhances human natural killer cytotoxicity. *Immunology*. 1998; 93 : 115-121

Horikoshi S., Serpone N., Hisamatsu Y., Hidaka H., Photocatalyzed degradation of polymers in aqueous semiconductor suspensions. 3.

Photooxidation of a solid polymer : TiO₂-blended poly (vinylchloride) film, Environ. Sci. Technol. 1998; 32 : 4010-4016

Enya T., Suzuki H., Hisamatsu Y., Reaction of Benzantrone(7H-Benz [d, e] anthracene-7-one) with nitrogen dioxide alone or in admixture with ozone. Implication the atmospheric formation of genotoxic 3-nitrobenzantrone, Bull. Chem. Soc. Jpn. 1998; 71: 2221-2228

Enya T., Kawanishi M., Suzuki H., Matsui S., Hisamatsu Y., An unusual DNA adduct derived from the powerfully mutagenic environmental contaminant 3-nitrobenzantrone, Chemical Research in Toxicology, 1998; 11 (12) :1460-1467

Sakabe K., Okuma M., Yamaguchi T., Yoshida T., Furuya H., Kayama F. and Fresa KL., Estrogenic xenobiotics affect protein kinase C induction of the intracellular activation signal in mitogen-stimulated human peripheral blood lymphocytes. Int. J Immunopharmacol. 1998; 20 (4-5): 205-212

Sakabe K., Yoshida T., Furuya H., and Kayama F., Environmental estrogens increase expression of SS-A/Ro autoantigen in normal human epidermal keratinocytes. Internat J Dermatol .1998;25(8):558-560

山崎聖美. 顆粒球中性プロテアーゼのNK細胞に対する作用. 侵襲と免疫. 1998; 7(4) : 107-110

2. 学会発表

Yamazaki. T., Okada. Y., and Hisamatsu. Y. Effects of endocrine disruptors on lymphocyte functions, Endocrine Disruptors, Keystone Symposia, California, 1999. p.48.

Aoki Y., Yosida Y., Watanabe A., and Yamazaki T. Effect of exercise and nutrition on the activity of anti-cancer proteases in granulocytes. Proceedings of proteases and protease inhibitors in cancer. Denmark. 1998; A-3

山崎聖美、青木洋祐. 顆粒球中性プロテアーゼのNK細胞に対する作用について. 第3回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター研究会、名古屋.1998;54

青木洋祐、吉田幸代、渡辺朗子、山崎 聖美. 顆粒球中性プロテアーゼ活性に対する運動の影響. 第3回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター研究会、名古屋.1998;54

山崎聖美、青木洋祐. カテプシンGがNK細胞に与える影響について. 第71回日本生化学会大会、名古屋. 1998 ; 70 : 999

久松由東、三輪孝雄、寶田 聡、日高久夫、金属酸化物共存下におけるポリ塩化ビニルの熱分解・燃焼反応生成物の変異原性、第39回大気環境学会年会、1998, 9

石井聡子、大曾根美紀、稲津晃司、
秋鹿研一、久松由東、トリフェニレンと二酸化窒素の反応による変異原物質の生成、第39回大気環境学会年会、1998, 1

八向真帆、工藤善之、古谷圭一、久松由東、高橋千太郎、地下鉄構内と地上大気中の多環芳香族炭化水素量の比較、第39回大気環境学会年会、1998, 9

久松由東、大気環境中におけるニトロアレーンの生成とその変異原性、日本環境変異原学会第27回大会、1998、11 (シンポジウム)

久松由東、三輪孝雄、寶田 聡、日高久夫、ポリ盤化ビニルの熱分解、燃焼反応生成物の変異原性、日本環境変異原学会第27回大会、1998、11

Okada. Y. Effect of NaCl in medium on virulence of *Listeria*. XIII International Symposium on Problems of Listeriosis, 1998. 6. 28- 7. 2, Halifax, Nova Scotia, Canada.