

厚生科学研究費補助金（生活安全総合事業）
分担研究報告書

内分泌攪乱物質の免疫機能に及ぼす影響に関する研究

分担研究者 久松 由東 国立公衆衛生院地域環境衛生学部室長

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る。そこで、Tリンパ球系及びBリンパ球系培養細胞を用い、内分泌攪乱物質が免疫機能を低下させるか否か調べる目的で、内分泌攪乱物質が培養細胞の反応性に及ぼす影響について調べた。その結果、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リンパ球系及びBリンパ球系細胞の反応性を低下させるが、この低下はエストロゲンレセプターアンタゴニストによっても回復しないことが明らかになった。

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調べ、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

対象とした内分泌攪乱物質は、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、o,p'-DDE、p,p'-DDEである。

Tリンパ球系培養細胞としては、Jurkat細胞を用い、A23187とホルミリスレートアセテートで刺激した。Jurkat細胞を内分泌攪乱物質存在下でフェノールレッドフリー、無血清、低蛋白溶液を加えたRPMI 1640培地で4時間培養したのち刺激し、3日間、37度、5%二酸化炭素中で培養した。ハーベストする8時間前にトリチウム標識チミジンを加えてさらに培養し、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。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 (SAC)で刺激し、同様の実験を行った。

エストロゲンレセプターアンタゴニストであるICI182,780を加える場合は内分泌攪乱物質を添加する1時間前に加えた。

LDH活性はプロメガ社のキットを用いてプロトコールに従って測定した。

C. 研究結果

1. Jurkat細胞の反応性に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

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、フタル酸ジエチル、o,p'-DDE、p,p'-DDEがJurkat細胞の反

応性を半分に抑制する濃度を調べたところ、それぞれ、 $0.6 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 $0.5 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 $0.9 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 $0.2 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 $0.2 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 $0.8 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 $0.2 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 $0.2 \times 10^{-4} \text{M}$ であった。

また、LDH活性を測定した結果、ノニルフェノールは 10^{-4}M で5%、ビスフェノールAは 10^{-4}M で3%、フタル酸ジ-n-ブチルは 10^{-4}M で2%上昇したが、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジエチル、o,p'-DDE、p,p'-DDEでは顕著な上昇はみられなかった。

さらに、さきのJurkat細胞の反応性を半分に抑制する濃度を用いてICI182,780存在下で抑制から回復するか調べたところ、全く回復しなかった。

2. Raji細胞の反応性に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

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、フタル酸ジエチル、o,p'-DDE、p,p'-DDEがRaji細胞の反応性を半分に抑制する濃度を調べたところ、それぞれ、 $0.8 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 $0.5 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 $0.4 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 $0.5 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 10^{-4}M 、 10^{-5}M 、 10^{-5}M 、 10^{-5}M であった。

また、LDH活性を測定した結果、ノニルフェノールは 10^{-5}M で25%、 10^{-4}M で70%、ビスフェノールAは 10^{-4}M で33%、フタル酸ジシクロヘキシルは 10^{-4}M で37%、フタル酸ジ-n-ブチルは 10^{-4}M で10%、

o,p'-DDEは10(-4)Mで60%、p,p'-DDEは10(-4)Mで50%上昇したが、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジエチルでは顕著な上昇はみられなかった。

さらに、さきのRaji細胞の反応性を半分に抑制する濃度を用いてICI182,780存在下で抑制から回復するか調べたところ、全く回復しなかった。

D. 考察

昨年度の結果と合わせると、Raji細胞の反応性の内分泌攪乱物質による低下はLDH活性の上昇と関連しているという結果が得られたが、Jurkat細胞の反応性の低下はLDH活性の上昇を示す濃度より低濃度であらわれ、内分泌攪乱物質がTリンパ球の機能に影響を与えていると考えられる。また、Jurkat細胞、Raji細胞共に、エストロジェンレセプターを発現していることをRT-PCRにて確認したが、エストロジェンレセプターアンタゴニストにより内分泌攪乱物質による反応性の低下は回復せず、エストロジェンレセプターを介さない、あるいは介したとしても一般に知られている核内転写因子をリクルートする系とは異なる新たな経路によるものと推察される。

E. 結論

Jurkat細胞、Raji細胞共に内分泌攪乱物質によりマイトージェンに対する反応性が低下したが、エストロジェンレセプターアンタゴニストによっても反応性の低下から回復せず、新たな経路によるものと推察される。

F. 研究発表

1. 論文発表

Tahara S, Kitada Y, Nakazawa H and Hisamatsu Y, Enantiometric separation of atropine in Scopolia extract and Scopolia Rhizome by capillary electrophoresis using cyclodextrins as chiral selectors, J. Chromatograph. A, 1999, 848:465-471.

Ishii S, Hisamatsu Y, Inazu K, Kadoi M and Aika K, Ambient measurement of nitrotriphenylenes and possibility of nitrotriphenylenes formation by atmospheric reaction, Environ. Sci. Technol., in press.

Ishii S, Hisamatsu Y, Inazu K, Kobayashi T and Aika K, formation of mutagenic nitro oxygenated benzo(a)pyrene derivatives from reaction of benzo(a)pyrene with nitrogen dioxide in the presence of O₃ and under light irradiation, Chemosphere, in press.

2. 学会発表

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

山崎聖美、岡田由美子、久松由東、内分泌攪乱化学物質のリンパ球の反応性に及ぼす影響について、第72回日本生化学大会、1999、p.897.

山崎聖美、岡田由美子、久松由東、香山不二雄、内分泌攪乱化学物質のリンパ球の反応性に及ぼす影響について、第2回日本内分泌攪乱化学物質学会、1999、p.157.