

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 岡田 由美子 国立公衆衛生院衛生獣医学部研究員

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、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、o, p'-DDE、p, p'-DDE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、サイトカイン産生を抑制させること、またこれらの作用を示す濃度より高濃度でLDH活性を増大させること、これらの作用はエストロゲンレセプターアンタゴニストによって完全には抑制されなかったことが明らかになった。さらに、NK細胞のNK活性への影響について調べた結果、今回用いた条件では低濃度では顕著な影響は認められなかった。

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

### 1. ヒト末梢血リンパ球の

pokeweed mitogen(PWM)に対する反応性への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、フェノールレッドフリー、無血清、低蛋白溶液を添加したRPMI1640培地にて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PWMを添加し、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晚培養し、ハーベストし、細胞核内に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. ヒト末梢血リンパ球のサイトカイン産生能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、フェノールレッドフリー、無血清、低蛋白溶液を添加したRPMI1640培地にてリンパ球を内分泌攪乱物質存在下で4時間培養したのちコンカナバリンA(Con A)を添加し、24時間、37度、5%二酸化炭素中で培養し、培養上清中のIL-2、IFN- $\gamma$ の濃度を測定した。

### 3. ヒト末梢血リンパ球のLDH活性への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、フェノールレッドフリー、無血清、低蛋白溶液を添加したRPMI1640培

地にてリンパ球を内分泌攪乱物質存在下で3日間培養し、培養上清中のLDH活性をキット(プロメガ社)を用いて測定した。

### 4. ヒト末梢血リンパ球のマイトージェンに対する反応性へ及ぼす内分泌攪乱物質の影響に対するエストロジェンレセプターアンタゴニストの効果

ヒト末梢血よりリンパ球を調製し、フェノールレッドフリー、無血清、低蛋白溶液を添加したRPMI1640培地にてリンパ球をエストロジェンレセプターアンタゴニスト(タモキシフェン、ICI182,780)非存在下あるいは存在下で1時間培養した後、内分泌攪乱物質を添加し、さらに4時間培養したのちマイトージェン(Con A、スタフィロコッカスオーレウスコーエンI(SAC)、PWM)を添加し、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晚培養し、ハーベストし、細胞核内に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。

### 5. NK活性に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

ヒト末梢血より得られたリンパ球をフェノールレッドフリー、無血清、低蛋白溶液を添加したRPMI1640に浮遊させ、内分泌攪乱物質を加えて37℃、24時間インキュベートした。そして、target cellとしてK562細胞、あるいはMolt-4細胞を予め $^{51}\text{Cr}$ ラベルしておき、96穴マイクロプレート1ウェルあたりそれ

ぞれ  $1 \times 10^4$  ずつ加え、effector cellとして内分泌攪乱物質を加えたリンパ球をtarget cellに対して10:1、20:1、40:1になるように加え、4時間、37℃でインキュベートし、遠心して得られた上清のカウントを測定した。ここでは、spontaneous releaseとしてmediumのみ加えた場合の値を0%とし、max releaseとして10% Triton中にtarget cellを加えた場合の値からspontaneous releaseの値を差し引いた値を100%になるようにして% specific lysisを算出した。

### C. 研究結果

#### 1. ヒト末梢血リンパ球のPWMに対する反応性への内分泌攪乱物質の影響

ノニルフェノールは $10^{-5}$ Mで、ビスフェノールAは $10^{-4}$ Mで、フタル酸ジ-2-エチルヘキシルは $10^{-5}$ Mで、フタル酸ジ-n-ブチルは $10^{-4}$ Mで完全にリンパ球のPWMに対する反応性を抑制した。また、フタル酸ブチルベンジルは $10^{-4}$ Mで70%抑制した。フタル酸ジシクロヘキシルは $10^{-5}$ Mで70%、 $10^{-4}$ Mで完全に抑制した。o, p'-DDEは $10^{-5}$ Mで80%、 $10^{-4}$ Mで完全に抑制した。p,p'-DDEは $10^{-5}$ Mで50%、 $10^{-4}$ Mで完全に抑制した。フタル酸ジエチルは $10^{-4}$ Mまで影響を及ぼさなかった。

#### 2. ヒト末梢血リンパ球のサイトカイン産生能に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

##### (1) IL-2産生に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

ノニルフェノールはリンパ球の

Con A刺激によるIL-2産生を $10^{-6}$ Mで10%、 $10^{-5}$ Mで完全に抑制した。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-ブチルは $10^{-5}$ Mで50%、 $10^{-4}$ Mで完全に、フタル酸ブチルベンジルは $10^{-6}$ Mで20%、 $10^{-5}$ Mで50%、 $10^{-4}$ Mで完全に、フタル酸ジシクロヘキシルは $10^{-5}$ Mで70%、 $10^{-4}$ Mで完全に、フタル酸ジエチルは $10^{-4}$ Mで50%、o, p'-DDEは $10^{-5}$ Mで70%、 $10^{-4}$ Mで完全に、p,p'-DDEは $10^{-5}$ Mで40%、 $10^{-4}$ Mで完全に抑制した。

##### (2) IFN- $\gamma$ 産生に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

ノニルフェノールはリンパ球のCon A刺激によるIFN- $\gamma$ 産生を $10^{-5}$ Mで完全に抑制した。ビスフェノールA、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジシクロヘキシル、o, p'-DDE、p,p'-DDEは $10^{-4}$ Mで完全に抑制した。フタル酸ジ-2-エチルヘキシルは $10^{-4}$ Mまで顕著な影響はみられなかった。フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジエチルは $10^{-4}$ Mで40%抑制した。

##### 3. ヒト末梢血リンパ球のLDH活性への内分泌攪乱物質の影響

3日間の内分泌攪乱物質存在下におけるリンパ球の培養で、ノニルフェノールは $10^{-5}$ Mで6.6%、ビスフェノールAは $10^{-4}$ Mで6.6%、フタル酸ジ-2-エチルヘキシルは $10^{-5}$ Mで6.2%、 $10^{-4}$ Mで13.7%、フタル酸ジ-n-ブチルは $10^{-4}$ Mで10.2%、フタル酸ブチルベンジルは $10^{-4}$ Mで4.0%、フタル酸ジシクロヘキシルは $10^{-5}$ Mで4.0%、 $10^{-4}$ Mで10.2%、o, p'-DDEは $10^{-4}$ M

で11.4%、p,p'-DDEは $10^{-4}$ Mで13.3%のLDH活性上昇がみられた。フタル酸ジエチルには $10^{-4}$ MまでLDH活性の上昇はみられなかった。

#### 4. ヒト末梢血リンパ球のマイトーゲンに対する反応性へ及ぼす内分泌攪乱物質の影響に対するエストロゲンレセプターアンタゴニストの効果

エストロゲンレセプターアンタゴニストである4-ヒドロキシタモキシフェンを添加した場合、ヒト末梢血リンパ球のマイトーゲンに対する反応性を単独で抑制した。そこで、同じくエストロゲンレセプターアンタゴニストであるICI182,780( $10^{-6}$ M)を使用した。マイトーゲンとしてCon Aを用いた場合、ノニルフェノール( $10^{-7}$ M)、ビスフェノールA( $0.5 \times 10^{-6}$ M)、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル( $0.5 \times 10^{-5}$ M)、フタル酸ジ-n-ブチル( $10^{-5}$ M)、フタル酸ブチルベンジル( $10^{-5}$ M)、フタル酸ジシクロヘキシル( $10^{-5}$ M)、o, p'-DDE( $0.5 \times 10^{-4}$ M)、p,p'-DDE( $0.5 \times 10^{-4}$ M)

によるCon Aに対する反応性の抑制作用はICI182,780によっても回復しなかった。次にマイトーゲンとしてSACを用いた場合、ノニルフェノール( $0.5 \times 10^{-5}$ M)、ビスフェノールA( $0.5 \times 10^{-5}$ M)、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル( $10^{-6}$ M)、フタル酸ジ-n-ブチル( $0.2 \times 10^{-4}$ M)、フタル酸ブチルベンジル( $0.5 \times 10^{-4}$ M)、フタル酸ジシクロヘキシル( $10^{-5}$ M)、o, p'-DDE( $10^{-5}$ M)、p,p'-DDE( $10^{-5}$ M)によるSACに対する反応性の抑制作用はICI182,780によっても回復しなかった。

次にマイトーゲンとしてPWMを用いた場合、ノニルフェノール( $0.5 \times 10^{-5}$ M)、ビスフェノールA( $0.2 \times 10^{-4}$ M)、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル( $0.5 \times 10^{-5}$ M)、フタル酸ジ-n-ブチル( $0.2 \times 10^{-4}$ M)、フタル酸ブチルベンジル( $0.5 \times 10^{-4}$ M)、フタル酸ジシクロヘキシル( $10^{-5}$ M)、o, p'-DDE( $10^{-5}$ M)、p,p'-DDE( $10^{-5}$ M)によるPWMに対する反応性の抑制作用はICI182,780によっても回復しなかった。

なお、ICI182,780存在下と非存在下ではLDH活性に変化はみられなかった。

#### 5. NK活性に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

ノニルフェノールは $10^{-5}$ Mで、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、o, p'-DDE、p,p'-DDEは $10^{-4}$ MでNK活性が完全になくなった。

#### D. 考察

昨年度の本研究により、ヒト末梢血リンパ球のうちのTリンパ球の反応性及びBリンパ球の反応性が、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、o, p'-DDE、p,p'-DDEにより減少することが、マイトーゲン(Con A及びSAC)を用いた実験により明らかになった。今年度はTリンパ球とBリンパ球の相互作用に及ぼす影響を調べる目的で、マイトー

ジェンとしてPWMを用いたところ、これら内分泌攪乱物質はPWMに対するリンパ球の応答性を減少させることが明らかになった。また、個々の内分泌攪乱物質によってTリンパ球の反応性をより低濃度で減少させるもの、Bリンパ球に対する反応性をより低濃度で減少させるものがあったが、PWMに対する反応性の結果はそれらの間の値で減少を示し、これら内分泌攪乱物質はTリンパ球、Bリンパ球、さらに両者の相互作用に影響を及ぼしていると考えられる。

また、昨年度の研究結果により得られたマイトージェンに対する反応性を完全に抑制する濃度で、細胞の生死をLDH活性により調べたが、最大で13%程度であった。この結果から、細胞が細胞毒性により死ぬ濃度より低濃度でリンパ球の機能に内分泌攪乱物質が影響を及ぼしていると考えられる。これは、サイトカイン産生が、やはり細胞が細胞毒性により死ぬ濃度より低濃度で抑制されたことから裏付けられる。

以上明らかになった内分泌攪乱物質によるリンパ球の反応性の抑制が、エストロゲンレセプターを介しているものかどうか調べる目的でエストロゲンレセプターのアンタゴニストであるICI182,780の存在下で同様の実験を行ったが、リンパ球の反応性の抑制は回復しなかった。この結果から、内分泌攪乱物質はリンパ球内において、通常のエストロゲンレセプターを介して核内転写因子を動員する系ではなく、他の経路を介して作用しているものと考えられる。

また、今年度の条件による研究、すなわちNK細胞が全体の15~20%

を占める場合ではNK活性に低濃度で影響は認められなかったが、NK細胞系の培養細胞株を用いた研究で17 $\beta$ -エストラジオールによりNK活性に影響がみられたという報告もあり、よりNK細胞の純度を高めて研究する必要があると考える。

## 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、o, p'-DDE、p, p'-DDEはTリンパ球とBリンパ球の相互作用による反応性を減少させた。また、細胞が内分泌攪乱物質の細胞毒性により死ぬ濃度より低濃度でリンパ球の機能に影響を及ぼしていることが明らかになった。また、ICI182,780の存在下でもリンパ球の反応性の抑制は回復せず、内分泌攪乱物質はリンパ球内において、通常のエストロゲンレセプターを介して核内転写因子を動員する系ではなく、他の経路を介して作用しているものと考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Yamazaki T, Okada Y, Hisamatsu Y and Kayama F: The effects of endocrine disruptors on human lymphocyte responses. 投稿中

### 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.