

ダイオキシン類のリスクアセスメント,  
特に国内外の規制状況及び内分泌障害性物質としての作用

黒川雄二<sup>#</sup>・井上 達

Risk Assessment of Dioxins and the Effect as the Endocrine Disrupters

Yuji Kurokawa<sup>#</sup> and Tohru Inoue

In 1990, WHO recommended the TDI (Tolerable Daily Intake) of 10 pg/kg bw/day for dioxin. Since then, industrialized countries have set TDIs or exposure limits based on their own evaluation of the exposure levels and the toxicity of dioxin. In Japan, the MHW announced 10 pgTCDD/kg bw/day as the temporary TDI in 1996. WHO reevaluated the TDI in May 1998 and announced the TDI in the range of 1-4 pg TEQ/kg bw/day including coplanar PCBs, which will definitely have a big impact all over the world. Moreover, dioxins, as endocrine disrupting chemicals, are reviewed on their hazards on health and the mechanism of actions.

**Keywords:** dioxins, TDI, Ah-receptor

## 1. はじめに

ダイオキシン類がヒトの健康に重大な影響を及ぼすことは、1980年代から世界的に大きな問題となってきた。日本では、1984年に「廃棄物処理に係るダイオキシン等専門家会議」を設置し、評価指針として100 pg/kg bw/dayをまず提示した。その後、WHO/EURO (欧州地域事務局)は1990年に、TDI (Tolerable Daily Intake, 耐容一日摂取量)として、10 pg/kg bw/dayを公表し、世界的に多大なる影響を与え、各国での規制値設定を促した。厚生省でも、1990年に「ダイオキシン類発生防止等ガイドライン」を決め、さらに調査研究班を設けて、「ダイオキシンの毒性発現機構に関する調査研究」(1992-94年度)<sup>1)</sup>、「ダイオキシンのリスクアセスメントに関する研究」(1995-97年度)<sup>2)</sup>を行ってきた。1996年6月には、当面のTDIとして10 pg/kg bw/dayを中間発表している。本稿では、その間に国内外で設定された規制値等について、その設定根拠などを概略する。なお、1998年5月にWHO/EUROにより開催された「TDI再評価会議」の結果、TDIがWHO-TEF\*を用いて、1-4 pg TEQ/kg bw/dayとなり、世界的に特に日本に大きな影響を与えた。一方、ダイオキシン類の毒性に関しては、発がん性、生殖発生毒性、免疫毒性等数多くの

問題点があるが、本稿では最近特に注目されているダイオキシン類の内分泌障害性物質としての作用の観点から述べることにする。本稿では、ダイオキシン類とはポリ塩化ダイベンゾダイオキシン (PCDD) 及びポリ塩化ダイベンゾフラン (PCDF) を意味する。2,3,7,8-テトラクロロジベンゾダイオキシンは、ダイオキシン又はTCDDと記した。

\*TEF (Toxic Equivalency Factor, 毒性強度)は、TCDDの毒性を1としたときの、他のダイオキシン類の毒性を比較するために設定されている。従って、他のダイオキシン類の暴露量がわかればそれらを乗算して、総合的な毒性をTEQ (Toxic Equivalent, 毒性等量)として求められる。なお以前の、I (International)-TEFはコプラナーPCBを含んでいない。

## 2. リスクアセスメントにおけるTDI等について

周知の如く、リスクアセスメントは、有害性確認に始まり、用量反応評価、暴露評価、リスク判定などの段階を経て行われている<sup>3)</sup>。用量反応評価の段階における目的は、適切な毒性試験ないし疫学データからNOAEL (No-Observed-Adverse-Effect-Level, 無毒性量) ないしNOEL (No-Observed-Effect-Level, 無影響量)を導き出すことにある。勿論、NOAELが求められないときには、LOAEL (Lowest-Observed-Adverse-Effect-Level, 最小無毒性量)を用いることになる。その場合、どの種類の毒性をエンド

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed: Yuji Kurokawa, Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-1564; FAX: 03-3700-2348; E-mail: kurokawa@nihs.go.jp

ポイントにするかによって同じデータからでも異なった値が得られるが、通常、安全性を考慮して、低濃度で鋭敏に現れ、且つ重篤な症状を呈する毒性を採用する。その後、用量反応評価の段階で、NOAEL をヒトに外挿するための不確実係数 (UF, Uncertainty Factor) で割ることにより、TDI を算出する。なお、TDI とは、「健康影響の観点から、一生摂取しても、一日当たりこの量までの摂取が耐容されると判断される量。本来混入することが望ましくない環境汚染物質 (ダイオキシン類は最適の例) などの場合に用い、摂取する利益がないことから、一般に、暴露は最小限に抑えられることが望ましい」と定義されている。一方、ADI (Acceptable Daily Intake, 許容一日摂取量) は、「健康影響の観点から、一生摂取しても、一日当たりこの量までの摂取が許容されると判断される量。それを使用することによる利益があり、意図的に使用される物質 (例、食品添加物、農薬) の場合に用いられる」という定義であり、不確実係数と同様な根拠ではあるが、安全係数 (SF, Safety Factor) が通常用いられる。

不確実係数の値は、通常、動物とヒトの種差を考慮した係数10にヒトの個体差を考慮した係数10を掛けた100である。しかし場合によっては、毒性の重篤性、実験内容の質的因子、LOAEL のみのとき、短期試験データのみのとき等を考慮して、それぞれ最大10の不確実係数を付加することもある。

以上は、毒性発現に閾値ありと判断された場合であるが、一方、遺伝子毒性を示す発がん物質のように閾値なしとした場合には、数理モデルを使って VSD (Virtually Safe Dose, 実質安全量) を算定することになる。通常は、発がん危険度を  $10^{-6}$  として計算している。

### 3. 国内外のダイオキシンに関する TDI 等の規制値

#### 3. 1. 設定根拠の概要

これまでのところ、疫学調査及び文献においてヒトへの暴露量の算出が正確に行えるものがほとんどないということから、各機関におけるダイオキシン類暴露規制あるいは許容濃度の算出には、全て動物実験のデータが使用されている。実験としては、TCDD による雌ラットの肝発がん性または生殖発生毒性が、多くの機関で採用されている。

肝毒性をエンドポイントとする場合は、雌ラットの肝臓の過形成結節を基に得られた Kociba らの実験の NOAEL である  $1 \text{ ng/kg bw/day}$  という値が主として採用されている<sup>4)</sup>。生殖発生毒性をエンドポイントする場合は、Murray らによる生殖機能異常の NOAEL である  $1 \text{ ng/kg bw/day}$  という値が採用されている<sup>5)</sup>。しかし最近になって、TCDD を用いた Rier らによるアカゲザルの慢性毒性試験における子宮内膜症発症にかかる NOAEL ないし LOAEL を取り入れる傾向もある (これらの実験概要は後述)<sup>6)</sup>。

また、同じ動物実験データを用いる場合でもヒトへの外挿に対して異なったモデルを用いれば、機関ごとの規制値にばらつきが生じる。各国・機関での規制値は、「閾値あり」または「閾値なし」の算出モデルをとっており、この両者のモデルのうちどちらを選択するかによって、その値に大きな隔たりを生じている。

“閾値あり”の用量相関関係モデルを採用する各国・機関は、ダイオキシン類がヒトにおいて遺伝子毒性がないという前提に立っており、Kociba らまたは Murray らの報告による NOAEL または NOEL 値を不確実係数 (又は安全係数) で割ることにより、規制値を算出している。不確実係数 (又は安全係数) は、実施機関によって算出法が異なるが、結果的には  $100 \sim 1000$  の値が採用されている<sup>7,8)</sup>。

ダイオキシン類による発がん性に“閾値なし”とし、低用量でも直線性が存在するとする用量相関モデルを採用した機関は米国のみであり、Kociba らの報告をもとに線形多段階計算モデル (Linearized Multi-stage Model, LMS model) 法により算出している (Table 1, 2)。

#### 3. 2. “閾値あり”モデルを採用した規制値

##### 3. 2. 1. WHO の TDI

1990年に WHO では、TCDD は動物で発がん性をもつが、ヒトでは結論はでないとした。そして、この化合物にはプロモーター作用があるが、遺伝子毒性はないと考え、一般毒性を示すものと同等にとらえて規制値を算出した<sup>9)</sup>。様々な種の動物で実験された生殖発生毒性及び免疫毒性データに基づき、NOEL を  $1 \text{ ng/kg bw/day}$  であると結論づけた。そして、過去のリスクアセスメントにおける不確実性を大きく軽減する新しい方法を取り入れている。即ち、ヒトと動物での組織内濃度を比較することが可能だとして、薬物動態学的解析により、この NOEL 値  $1 \text{ ng/kg bw/day}$  は、ラット肝濃度では  $540 \text{ ng/kg bw}$  であり、ヒト一日摂取量として  $100 \text{ pg/kg bw}$  に同等であるとした。不確実係数は、ヒトにおける生殖発生毒性に関する十分な知見がないことから、10の値を採用し、TDI として  $10 \text{ pgTCDD/kg bw/day}$  を提案した。一方、母乳からの摂取が TDI を上回るという事実にふれて、TDI は一生摂取量に関するものであり、乳児には適用すべきではないと述べ、計算上6ヶ月の授乳期摂取量は、一生摂取量の5%以下であるとしている。

##### 3. 2. 2. 各国・機関の規制値

ドイツでは、1985年と早くから規制値を設定している。ラットにおける Kociba と Murray の実験から NOAEL 値として  $1 \text{ ng/kg bw/day}$  を採用し、安全係数  $100 \sim 1000$  を使用して、TDI を  $1 \sim 10 \text{ pg/kg bw/day}$  と安全係数  $100 \sim 1000$  を使用して、TDI を  $1 \sim 10 \text{ pg/kg bw/day}$  と幅を持たせている。この中で、 $1 \text{ pg/kg bw/day}$  は安全サイドに立った目標としての値であり、 $10 \text{ pg/kg bw/day}$  は、これを超えると緊

Table 1. “閾値あり”モデルを採用した各国・機関の規制値

		採用文献	NOAEL (pgTCDD/kg bw/d)	不確実 (安全)係数	規制値 (TDI) (pg TEQ/g)
ドイツ	1985	Kociba ら Murray ら	1,000 (NOEL)	100-1000	10,1 (目標値)
北欧4カ国	1988	Kociba ら Murray ら	1,000 (NOEL)	200	5(0-35/W) (TWI)
WHO/EURO	1990	Kociba ら Murray ら	1,000 (NOEL)	100	10
カナダ	1990	Murray ら	1,000	100	10
オランダ	1991	WHOの提案を採用	1,000	100	10
オランダ	1996	Rier ら	100 (LOAEL)	100 (5×10×2)	1 (答申値)
英国 COT	1991	WHOの提案を採用	1,000	100	10
スイス	1993	WHOの提案を採用	1,000	100	10
日本厚生省	1996	Kociba ら Murray ら	1,000	100	10
日本環境庁	1996	Kociba ら Rier ら	1,000	200 (10×10×2)	5 (健康リスク評価指針値)
ニュージーランド	1991	WHOの提案を採用	1,000	100	10
オーストラリア	1994	WHOの提案を採用?	1,000	100	10 (提案値)

Table 2. “閾値なし”モデルを採用した各機関の規制値

規制機関	採用文献	外挿 モデル	許容リスク	q1* (mgTCDD/kg bw/d) <sup>-1</sup>	規制値 (pgTCDD/kgbw/d)
米国 EPA1994	Kociba ら	LMS	1×10 <sup>-6</sup>	1.56×10 <sup>5</sup>	0.006
米国 FDA	Kociba ら	LMS	1×10 <sup>-6</sup>	1.75×10 <sup>4</sup>	0.057

\*投与量 1mg/kg 当たりの腫瘍発生率 Coulston(1994)

急に行政措置がとられるべき値とされている。

北欧諸国（スウェーデン，ノルウェー，フィンランド，デンマーク）では，ラット発がん性及び生殖発生毒性試験の報告より NOEL 値は，1 ng/kg bw/day であるとしたが，この NOEL 値が全く疑いのないものとしては，確立していないとして安全係数を200として，5 pg/kg bw/day という値とした。さらに，ダイオキシン類の毒性が組織濃度に依存し，steady state に至るまで長時間を要すること等を考慮し，1週間当たりの規制値 TWI (Tolerable Weekly Intake) として，35 pg/kg bw/week という値を推奨している。これは，魚を多食することからたまたま一日当たりのダイオキシン類摂取量が5 pg/kg/day を上回るとしても，1週間単位で35 pg/kg/day をこえなければよいという発想でもある。なお，WHO の TDI における不確実係数に対しては，種差を考慮してさらに2を加え，200にすべきとの見解を表明し，同時に北欧での200を正当化している。

カナダ厚生省では，1990年に Murray らの生殖発生毒性試験から，NOAEL を1 ng/kg bw/day とし TDI 10 pg/kg bw/day としている。不確実係数は100であるが，それは通例の考え方ではなく，個体差とダイオキシンの重篤な毒性を加味しているもので，ヒトは動物よりダイオキシン類への毒性感受性は低いとして種差を考慮していない点が

注目される。しかし州によっては，TDI を1-2 pg/kg bw/day としているところもある。

オランダでは，1982年に Kociba らの実験で NOAEL とされている1 ng/kg bw/day でもまだ有害性影響が見られるとし不確実係数250を適用して，4 pg/kg bw/day を規制値に決めていたが，1991年に WHO の提案を受け入れて，10 pg/kg bw/day の規制値を取り入れた。しかし1996年になって，その10 pg/kg/day の基になった実験で見られた影響はやはり有害性を有すると考えた。そして，Rier らのサルの実験での100 pg/kg bw/day を幼弱動物での精神発達障害，雌での子宮内膜症発現等を理由から LOAEL とし，不確実係数100（種差5，個体差10，LOAEL から NOAEL への変換2）を適用して，1 pg/kg bw/day という数字を出した。しかしこれは，オランダの国家保健審議会からの答申値であって未だ規制値ではないということである。

英国 COT (Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment) では，その値を超えたときに，環境中のレベルを下げるための調査と方策を始めるという意味合いで，TDI ではなくガイドラインレベルという値を最初に設定した。Kociba らのデータから発がん性に対する NOAEL 値は10 ng/kg bw/day とし，安全係数1,000（発がん性を加味し，10を付加係数）を使

って10 pg/kg bw/day という値を算出した<sup>10,11)</sup>。一方、アカゲザルを用いた生殖毒性試験の結果より、NOAEL 値を0.12 ng/kg bw/day とし、一般毒性に対する安全係数100を用いて、1 pg/kg bw/day を算出している。結局、ガイドラインレベルとしては、1 pg/kg body wt/day を採用しているが、これをTDIとして採用すれば、リスクを過大評価することになるとしている。しかし、最終的には1991年に上記のガイドラインレベルを廃し、WHOの提案したTDI 10 pg/kg bw/day を採用している。

### 3. 2. 3. 厚生省のTDI

日本においては厚生省がまず1984年に、ダイオキシン類の評価指針として、油症患者からNOAELを1 ng/kg bw/day とし、安全係数10を用いて、100 pg/kg bw/day を提示した。その後、1995年からは、規制値設定を目標として、厚生科学研究「ダイオキシンのリスクアセスメントに関する研究」班を発足させ調査研究に当たった。その際、原則として、ダイオキシン類のうち最も実験的・疫学的データの豊富なTCDDについて、特に経口暴露条件でのものについて、国際的な総説(WHO, EPA等)を用いて調査することとした。その結果、1996年6月に当面のTDIとして10 pg/kg bw/day を提案し食品衛生調査会に答申後、公表した。規制値設定の前提として、①ダイオキシン類は非意図の生産物であり、環境経由で摂取するものであること、ADIよりもTDIをもちいること、②実験動物で発がん性はあるが、遺伝子毒性はなくプロモーター作用物質であることから、閾値が設定できること、③従って一般毒性評価と同様にNOAELを基にTDI設定をすることができること等の3点を明確にした。根拠とするデータとして、Murrayらの生殖発生毒性試験及びKocibaらの慢性毒性試験等を用い、総合的に判断してNOAEL 1 ng/kg bw/day とし、これに不確実係数100を適用して、TDIを設定した。ただし、これらは既存データを基としたもので、国内外の日進月歩の研究状況を考慮し、今回のTDIを当面のものとするのが適当と判断した。

### 3. 2. 4. 環境庁の健康リスク評価指針値

環境庁では1996年5月にダイオキシンリスク評価検討会を設置し、調査・研究を開始して、同年11月には、TDI等とは異なる健康リスク評価指針値として5 pg/kg bw/day を公表した<sup>12)</sup>。この独自の指針値の定義は、①ダイオキシン類に係る環境保全対策を講ずるに当たっての目安となる値、②人の健康を維持するための許容限度としてではなく、より積極的に維持されることが望ましい水準として人の暴露量を評価するために用いる値である、としている。この指針値の設定根拠に用いたのは、Kocibaらの発がん性試験であり、肝過形成結節を指標としたNOAEL 1 ng/kg bw/day に不確実係数100(種差10, 個体差10)、または肝がんを指標としたNOAEL 10 ng/kg bw/day に不確実係数

1000(種差10, 個体差10, 影響の重大性10)をそれぞれ適用して、10 pg/kg bw/day という数字をまず算出した。さらにRierらのアカゲザルの実験における子宮内膜症発生に用量相関関係があること、発症にホルモン・免疫作用の関与が想定されること等から、付加係数として2を加え健康リスク評価指針値として5 pg/kg bw/day を導き出したものである。最近オランダにおいてアカゲザルの実験におけるLOAELからTDIを設定した事実に影響されたと推察されるが、実際のLOAEL値を用いることはしていない。

### 3. 3. 閾値なしモデルを採用した規制値

低用量でも直線性が存在するとする用量相関モデルを採用した機関は米国のみであり、線形多段階計算モデル(Linearized Multi-stage Model, LMS model)法により $1 \times 10^{-6}$ の発がんリスクにおける上限値を示すものとしてRsD(Risk Specific Dose)値を算出している。しかしRsD値における実際のリスクは $1 \times 10^{-6}$ 以下でゼロになる可能性もある。さらにこれらの値は直接許容量などを示すものではなく、各種化学物質の $1 \times 10^{-6}$ 発がんレベルにおける量の比較に役立つものである。米国EPA及びFDAでは、Kocibaらの用量相関関係のある雌ラット肝腫瘍の実験データを基に、それぞれ0.006 pg/kg bw/day, 0.057 pg/kg bw/day という値を導き出している<sup>7)</sup>。また米国CDC(Center for Disease Control)では、0.028 pg/kg bw/day を下限値として算出している<sup>13)</sup>。同じKocibaらのデータを基に計算しているにもかかわらず各機関で結果が違うのは、計算に組み入れる危険率(q1)などのファクターの解釈の仕方に依存している結果である。

### 3. 4. 米国ATSDRにおけるMRL

現在米国ATSDR(Agency for Toxic Substances and Disease Registry)発行のToxicological Profileにおいて再評価が進行中である<sup>14)</sup>。そこでは、新しくMRL(Minimal Risk Level)という値が示されている。これは、「特定された期間において、がん以外の特に問題となる健康影響が見られないであろう、有害化学物質に対するヒト一日暴露量」と定義されている。従って、MRLは動物実験によるがん以外の健康影響のみ(ただし、不可逆性の肝、腎傷害と発生毒性を除く)に基づき、NOAELと不確実係数により算出されている。ATSDRでは、これらを有害廃棄物の特定及び有害廃棄物処理場における健康影響を検討するためのスクリーニングレベルとして用いており、規制値としては用いられていないが、一般論としてヒトは動物に比べて毒性に感受性が高く、さらにヒトにおいても、小児、老人、栄養・免疫不良などを考慮して、MRLの値は動物のNOAELより極力低く設定している。

現在、MRLとして急性(1-14日)、亜慢性(15-364日)及び慢性(365日以上)が、経口と吸入暴露に対して出されている。慢性暴露におけるMRLは、Schantzらのデー

タをもとに、1 pg/kg bw/day という値が出されている。この実験では、食餌中濃度5ppt (WHO 計算方式120 pg/kg bw/day に相当) の TCDD を摂取した母親アカゲザルから生まれた子ザルに社会的行動異常が認められるというもので、LOAEL として位置づけられている<sup>15)</sup>。したがって、不確実係数としては、データが最小 LOAEL ということで3を、さらに種差3と個体差10をあわせて約100を用いている。その他、急性経口 MRL として、B6C3F1 マウスにおける感染症に対する抵抗力低下から、200 pg/kg bw/day<sup>16)</sup>、亜慢性経口 MRL として、モルモットにおける胸腺重量低下から20 pg/kg bw/day<sup>17)</sup> が示されている。

### 3. 5. 非発がん性影響に対する RfD と MoE

EPA ではこれまで発がん性以外の毒性に対しては、RfD (Reference Dose) を用いてきた。RfD とは、この値以下のレベルでは、一切の毒性が発現しないとされる量であるが、許容量を設定するためではなく、上述の RsD の如く、各種化学物質の毒性を比較するに役立つ。しかし問題点として、発がん性におけるような用量相関曲線が、多くの非発がん性影響では得られないことと、特にダイオキシン類の場合には RfD がバックグラウンド値の10ないし100分の一になることであり、実用的ではない。1996年に EPA は MoE (Margin of Exposure) という概念をダイオキシン類の安全性評価に取り入れた。これは平均的なバックグラウンド値と有害性影響の発現を比較するものであり、MoE を約10とした。即ち、バックグラウンドレベルの10倍に達しない場合には、動物実験又はヒト集団において有害性影響は見られていない。MoE は発がん性と非発がん性の影響を比較するには極めて有用だと考えられているが、EPA ではまだ協議中である。

## 4. 規制値の基となった実験概要とその評価

### 4. 1. ラット慢性毒性・発がん性併合試験

Kociba らは、一群50匹の雌雄 SD ラットに TCDD を0.001, 0.01, 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw/day の用量 (餌中濃度, 22, 210, 2200 ppt) で105週間混餌投与した<sup>4)</sup>。雌雄それぞれ86匹の対照ラットには溶媒のみを含む餌を与えた。死亡率の増加は雌の0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw/day 群でのみ認められた。0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  最高用量群で雌雄とも6ヶ月以降投与終了時まで体重増加抑制が認められ、0.01  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw/day 群の雌でも程度は弱い体重増加抑制が認められた。試験中頃に0.001  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw/day 群でも体重が時折対照群より低い値を記録したが、後期には対照群と同じレベルであった。雌の0.01及び0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw/day 群で、尿中コプロプロフィリンとウロポルフィリン量の増加が認められたが雄では認められなかった。最終解剖時の血清生化学検査で、0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群の雌で肝障害に関連した酵素活性の増加が認められた。投与終了時の剖検では、肝への影響が雌雄とも最も共通の

変化として観察された。病理組織学的には、非腫瘍性変化として、肝臓に多数の退行性、炎症性、壊死性変化が特に雌で強く認められた。また、多核肝細胞と胆管過形成も認められた。肝障害は0.1, 0.01  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw/day 投与群で用量相関性を示したが、0.001  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw/day 群では変化は認められなかった。腫瘍性変化としては、いずれも0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw/day 群において、雌で肝細胞癌および肺扁平上皮癌、雄で舌扁平上皮癌、雌雄で硬口蓋及び鼻甲介の扁平上皮癌の発生率が有意に上昇した。これらの結果から、NOAEL は0.001  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw/day と考えられる。なお、この最低用量での、実験終了時における脂肪組織と肝臓の TCDD 濃度は540 ppt であった。

### 4. 2. ラット三世代繁殖試験

Murray らは、TCDD を0.001, 0.01, 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw/day の用量 (餌中濃度, 22, 210, 2200 ppt) で SD ラット (F0 世代総計, 雄52, 雌104) に与えて三世代繁殖試験を行った<sup>5)</sup>。0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw/day では受胎率が著しく低下し、0.01  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw/day では子宮内死亡、同腹児数の減少、生後の体重の増加抑制などの生殖毒性を認めている。そして、0.1及び0.01  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  用量はラットの生殖に悪影響を及ぼすと結論するとともに、0.001  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  は、受胎率、出生後体重、新生児生存率に影響を示さないことから、NOAEL であると推定した。しかし、著者らはその後、異なる統計モデルを用いて試験データを再解析し、各世代のデータを全て合わせて解析すると、0.001  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  用量では統計学的に有意差が認められることから、これが必ずしも NOAEL とは言えないと報告している<sup>18)</sup>。しかし、各世代の毒性変化を世代別に解析すると0.001  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  は NOAEL と推定しても問題はないという意見も認められる<sup>18)</sup>。即ち、0.001  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw/day 群で、子宮内生存率は F2 でのみ有意な低下を示し、出生後生存率は F1a 世代では有意に低下しているが、F1b 世代では逆に増加し、F2 世代と F3 世代では有意な変化を示していない。さらに、同群で見られた出生児での軽度の腎盂拡張頻度は、F1 世代では有意に増加したが、F2 と F3 世代では増加せず、最高用量の0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw/day 群ではいずれの世代でも増加を認めていない。事実、WHO、スウェーデン、デンマーク、カナダではこの値を NOAEL として規制に用いている。したがって、0.001  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  が NOAEL として推定できるか、あるいは LOAEL であるかという点については、統計手法の問題もあり、必ずしも結論にはいたっていないが、現時点では生殖に及ぼす影響に関する NOAEL としては、この Murray らのラット三世代試験データに基づく0.001  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  が唯一の情報であろう。

### 4. 3. アカゲザルの慢性毒性試験

Rier らは、TCDD を飼料に5 ppt (実測値126 pg/kg bw/day, WHO 計算方式180 pg/kg bw/day に相当) 及び25

ppt (実測値 630 pg/kg bw/day, WHO 計算方式 900 pg/kg bw/day に相当) の割合で添加し, 約4年間与えたのち, その後は TCDD 非投与の状態にて飼育した<sup>6)</sup>. そのうち25 ppt 群の3匹が重篤な子宮内膜症により死亡したことを観測した Rier らは, TCDD 投与終了10年後に残りの生存サル全例の腹腔鏡検査法を行い, 子宮内膜症の有無及びその程度の調査研究を行った. その結果, TCDD の添加濃度に依存して, 子宮内膜症を有するアカゲザルの頻度が有意に増加するとともに, rAFS (the revised American Fertility Society classification system) スコアに基づいて評価した子宮内膜症の重篤性も有意に増大することを認めた. 即ち, 対照群及び5 ppt 群, 25 ppt 群に子宮内膜症がそれぞれ33%, 71%, 86%の頻度で見られ, 重篤度で分類すると中程度以上の子宮内膜症は対照群では見られなかったのに対し, 5 ppt 群, 25 ppt 群でそれぞれ43%, 71%で対照群より有意に高いという結果が得られた.

Rier らによる上記の実験においては, LOAEL が126-180 pg/kg bw/day であり, この値が慢性毒性影響とした場合の毒性値として最小になる. しかし, 厚生省研究班の中間報告では, 用いているこの種類のサルでは子宮内膜症の発生率が高いこと, 例数が少ないこと, 十分に管理された実験ではないこと, の理由から, この実験結果を根拠に TDI を設定することは適切ではないと判断している.

その後, 直ちにその問題に対応すべく「子宮内膜症等に及ぼすダイオキシンの評価に関する研究」班が設立された. これは, Rier らによる一連のアカゲザルへのダイオキシン暴露の実験, 特にその子宮内膜症を初めとする生殖器, 内分泌臓器障害にかかる知見及びその周辺の情報を整理し, Rier の原報告の現段階における科学的知見としての妥当性の如何を検討評価することを目的としたものである. 検討の結果は最終結論に達していないが, 1. TCDD に由来する何らかの影響があった可能性は, 否定できない. 2. Rier の論文には科学的に見て不確実な要素が複数存在するの2点が指摘されている. 特に, 第2点に関しては, ① TCDD 非投与の10年間の空白期間中の飼育条件が不明であること, ②25 ppt 投与群には2種類の異なった処置を受けたサルが含まれるが, この事に関する記載・説明がこの論文には無いこと, ③統計処理に一貫性を欠く部分があること, が指摘された. よって, Rier の論文には複数の科学的に不確定要素が存在しており, 現在の所, その論文の中で示されている絶対的数値に関しては, 科学的データとして採用するには無理があることから, 当該班の結論としては Rier 論文の主旨は棄却できないが, 科学的な数値データとしては採用できず, よって, 総合的には評価はできないものと判断した.

## 5. WHO/EURO における TDI 再評価

98年5月25日から29日まで, ジュネーブ WHO 本部において, ダイオキシン TDI の再評価が行われた. 前述の如く (3. 2. 1. 参照), 90年の最初の TDI 評価・設定においては, ラットの生殖毒性・免疫毒性試験から NOEL 1000 pg/kg を求め, さらに薬物動態的にラット肝 TCDD 濃度540 ng/kg が, ヒト一日摂取量100 pg/kg にあたるとし, それに不確実係数10 (ヒトでの生殖毒性に関する知見が充分でないこと) を適用して, 10 pgTCDD/kg bw/day と計算した.

今回はまず, 参考資料として, 暴露, 動物実験, 疫学, 毒性発現機構, 定量的リスク評価, TEF・TEQ, 各国の規制値等に関する11の文書に基づき討議した. その結果, ダイオキシン類による影響は, 最近のノックアウトマウスによる実験からほとんどが Ah-receptor を介するものであり, その結合能・反応が直接 Ah-receptor の活性化に依存していることから, ダイオキシン類への感受性はヒトと動物でほとんど同じ(生化学的変化)か, ヒトが低い(有害性影響)であろうことが, 現時点での共通の認識となった. 従って今回は90年以降に発表された動物実験における LOAEL を用い, さらに薬物動態学的見地に基づいた体内蓄積量\* (body burden) が最も種差の影響を受けにくいので, 評価に相当と考え, TDI を設定することとした.

TDI 再評価に用いるため, 最も低い用量・体内蓄積量 (10-100 ng/kg) で発現している明らかな有害性影響として, ラット, アカゲザルでの生殖・発達への影響, アカゲザルでの子宮内膜症, マウスでのビールス感受性増加が取り上げられた. 一方, 上記の毒性発現より低い用量・体内蓄積量 (1-10 ng/kg) で, 肝 P450酵素等の生化学的変化が認められているが, 常にそれらが有害性であることが明確でないとして, 取り入れていない. 一方, 疫学調査から有害性影響を示す場合の体内蓄積量は, 20-100 ng/kg である.

従って, 上記試験の中で最も低い LOAEL を示したマウス試験を使って, 下記の式\*\* からヒトの一日摂取量を求めると, 2.4-200 TEQpg/kg/day となる. しかし, このマウスの試験は, その毒性発現に用量相関性が明確でないとして, 会議では評価が二転三転した経緯がある. さらにこの試験が妥当だとしても, それが妊娠中に高濃度を単回経口投与したものであり, 体内蓄積量を用いても, TDI の概念である長期間の安全性を担保するか否かには問題点もあると考えられる. 不確実係数に関しては, 体内蓄積量を用いたことから種差を考慮しないが, LOAEL を用いたこと, ヒトが動物より感受性が低い場合もあること, ヒトと動物の半減期の違い等を含めて, 総合的に見て1-10が必要とされ, TDI は1-4 TEQpg/kg/day と計算された. なお,

この数字は97年の新しいWHO-TEFに基づくTEQを用いていることから，コプラナーPCB（この会議では，dioxin-like PCBと呼んでいる）をも含むものである。今回のTDIが，通常のものであり幅を有していることは，その解釈を難しくしているが，当面の値と目標値とも理解してよいであろう。

現在の先進諸国におけるダイオキシン類平均ヒト一日摂取量は，2-6 pg WHO-TEQ/kg/day（体内蓄積量2-6 ng/kg/day）とされており，一部には既にTDIを上回るレベルもある。しかし，たとえこの摂取量を短期間超えたとしても，動物（10-40日）とヒト（7-11年）の半減期の違いから，steady stateに至る時間には大きな差があることは事実である。しかしながら，当然ダイオキシン類削減対策を今後も強力に推し進め，最終的には暴露が出来うる限り低いレベルになるよう，あらゆる努力を払うことが提案されたことは，正しい指摘である（なお，98年7月上旬の脱稿時点では，未だWHO/EUROから最終文書が出されておらず，変更点もありうる）。

\*体内蓄積量；吸収，代謝，排泄に基づいて計算した物質の体内濃度

\*\*ヒト摂取量＝体内蓄積量 (ng/kg) × ln(2) / ヒト半減期 (7.5年) × ヒト吸収率 (50%)

## 6. 内分泌障害物質としての作用

ダイオキシン類の毒性はプレイオトロピックであり，“齧歯類などで顕著な低濃度レベルの致死性”，“CYP1A1・CYP1B1などの薬物代謝酵素の誘導”，これに引き続く“肝毒性や肝がん性”とともに，“口蓋裂などの催奇形性”や“液性ならびに細胞性の免疫不全”などが知られている<sup>19)</sup>。そしてその傍ら，このものの毒性に特異な内分泌障害性があることも早くから注目されてきた。結果として，コプラナーPCBを含むダイオキシン類，とくにTCDDの内分泌障害性研究は各国で盛んに進められており，特に高い比率を占めている。EPAの内分泌障害性化学物質研究テーマ登録でも，ダイオキシン類（87件）の研究はPCB（109件）とならび，3位のエストロジェン（42件）を大きく引き離している。このダイオキシン類の内分泌障害の発生機序は，通常ホルモン・レセプターを介したそれとは異なって特異な位置付けにある。すなわちダイオキシン類の障害性にはいわゆるダイオキシン・レセプター（アリアル炭化水素受容体，以下“Ahレセプター”）の関与が知られているが，このものはオーファン・レセプターであり，エストロジェンやアンドロジェンの作用に対する修飾機序もその詳細な研究は始まったばかりである。そこでこの項では，ダイオキシン類の内分泌障害性にしばって，現在までに明らかになっている事柄を整理してみる。

### 6. 1. 内分泌障害性に関連する諸所見

ダイオキシン類に内分泌障害性を疑わしめた代表的な事象は，TCDDの産業中毒者に，塩素ざ瘡や多毛が認められたことによる<sup>21)</sup>。その後蓄積されている多数の実験の中から，内分泌障害性と思われる主な所見を列挙すると以下のようなになる。

#### 6. 1. 1. 雄性生殖器関連障害

〔精巣形成などアンドロジェン依存性性徴への影響〕まず目につくのは雄性性腺に関連した障害である。ウイスコンシン大学のRichard Petersonらのグループは，胎齢15日のHoltzmanラットに0.064～1.0 mg/kgのTCDDを単回経口投与して，出生直後の雄の仔の生殖機能に見られる影響を報告した。検索にはアンドロジェン依存性のパラメータとして，生殖器・肛門間距離（anogenital distance），精巣などの重量，および精子形成を検討の対象とし，一連の報告を行った<sup>22,23,24)</sup>。その結果によれば，いずれも極めて低レベル（64 ng/kg）から影響が認められ，胎生期でのTCDDの暴露は，雄の性行動の脱雄性化（＝demasculinization，あるいは雌性化＝feminization）を生ずるものと結論された。

EPAのLinda Birnbaumのグループは対象動物を別系統のラット（Long-Evans）とハムスターに拡張してPetersonらの実験を追試した。0.5 mg/kgを胎齢6～15日に投与されたLong Evansラットでは，精巣上体での精子数が，性成熟期で58%，成熟期で30%に減少していた他，程度は小さいながらも，生殖器・肛門間距離の短縮が投与量1 mgレベルでも観察されたので，Mablyらの見た現象はほぼ追認された形となった。尚，半数致死量がラット（25～60 mg/kg）に較べて約60倍ほど高いハムスター（>3000 mg/kg）では，同じ用量でのそうした所見は認められなかった<sup>25,26)</sup>。

〔血漿テストステロン・雄性ホルモン・レセプター数などの変化〕Petersonらのグループは，前記の結果に対して，同時に測定した血漿テストステロンに変化が見られたので，観察された雄の性行動の脱雄性化やLH分泌パターンの雌性化を，このテストステロンの変動で説明した。しかし先のEPAのLong-Evansラットではテストステロン値に変化は見られず，精細管，前立腺，精巣上体のアンドロジェン・レセプターの数でも変化がなかった<sup>25,26)</sup>ので，発症機構についての両者の判断は乖離した結果となった。これに引き続いてBjerkeらによって発表された，妊娠経過中に0.7 mg/kg以上のTCDDを暴露して出生仔を観察した追試の結果は，Petersonらのそれに一致していた<sup>27)</sup>。Bjerkeらはこの結果から胎内もしくは哺乳経路で仔にTCDDを暴露すると，生殖器官のテストステロンに対する反応性が変化すること，その結果オスの行動の一部脱雄性化（雌性化）が引き起こされるものとの推論を導きだ

した。

[前立腺重量への影響] 胎齢期の暴露や授乳による暴露を調べた Roman らによれば、この他に、前立腺重量への影響も認められたとしている<sup>28)</sup>。

### 6. 1. 2. 雌性生殖器関連障害

つぎに雌性生殖器関連では、尿生殖管の異常、妊娠率の低下、および流産などの発生がおもな障害となっている。なお前述の通りアカゲザルを用いて観察された子宮内膜症に関する実験の評価は特異な位置を占めている。

[受胎率の低下] ダイオキシン類が、受胎率の低下、出生仔の低体重および性周期の変調などを惹起するという実験結果は Murray らによって系統的に研究された<sup>5)</sup> (4. 2 参照)。これに前後して生殖・発生過程での影響に焦点を当てた試験ではないが、Kociba らは、13週ならびに2年間にわたる0.001および0.01 mg/kg/day の条件での TCDD 投与の結果を報告しており、それによればこれらの濃度での雌の生殖器系統への影響は見られていない<sup>4,29)</sup>。実験の目的が異なるので Murray らと Kociba らの結果の正確な意味での比較は難しいが、ダイオキシン類の繁殖への影響が非常に強いことだけは確かである。こうした影響には投与期の胎齢によるクリティカル・ポイントがあることが知られているが、C57BL マウスの胎仔死亡の場合、胎齢6日にピークが見られる<sup>30)</sup>。雄性生殖の項で先にも述べた Long - Evans ラットを用いた EPA の Gray らの実験における雌では、膣の開口遅延を含む尿生殖管 (urogenital tract) の形態異常が観察されている。かれらの結果では性周期や血中エストラジオール値に変化がないなど、用量レベルや個々の影響にやや差異が見られるが、齧歯類における妊娠・受胎率への影響が0.01 mg/kg/day 程度のレベルから観察されるという点では、ほぼ一致した結果であったと考えられる。

[流産の増加] 雌性生殖器関連の障害で次に顕著な影響は流産であるが、これは一般に齧歯類では観察が難しい。McNulty はアカゲザルで、1 mg/kg を9回に分けて投与したとき4匹中3匹で流産、0.2 mg/kg では4匹中1匹が流産であったことを報告している<sup>31)</sup>。これを支持する結果は複数あり、TCDD 50 ng/kg の飼料で7ヶ月飼育した雌で、8匹中6匹が妊娠、その内4匹が流産したこと、出産した2匹中1匹は未熟児で1匹のみ正常出産であったこと<sup>15,32,33,34)</sup>などが知られている。Bowman らの、5 ng/kg および25 ng/kg の低レベル投与の長期暴露実験では、25 ng/kg の TCDD を含む飼料で7ヶ月飼育した結果、健康な仔を産んだのは8匹中1匹のみであった。5 ng/kg の飼料では、8匹中7匹が妊娠し、うち6匹は健康な仔を、1匹は未熟仔を産んだが、こちらの方は対照群と有意差がなかった<sup>10,11)</sup>。流産については25~50 ng/kg のレベルで確認されたと考えられる。

[子宮内膜症] 流産の惹起が比較的明瞭であるのに対して、子宮内膜症については、そのデータの信頼性の如何と相俟って、結果に対する判断が一定していない (4. 3章を参考)。一般に月経を伴わない齧歯類では内膜症は観察されない。アカゲザル (*Maccaca muratta*) を用いた研究の意義はここにあるが、前述のごとき実験内容及び評価に関する種々の問題点があり、事態は未だ流動的と云わねばならないが、ダイオキシンによる子宮内膜症の惹起の如何については、近く根本的な見直しを求められることになるものと思われる。

### 6. 1. 3. 甲状腺関連障害

内分泌障害性化学物質の障害標的臓器として甲状腺機能が注目される理由は、一個の内分泌臓器としての意義にとどまらず、このものが両生類などで変態過程を制御することをはじめ、爬虫類での脱皮、鳥類での換羽など広範な生物影響をもつことが古くから知られていることによる。しかも次項に見るように甲状腺ホルモンの哺乳綱での作用は高次系の発生に関与しており、次元を異にした重要性を持っているので、その双方を睨んで EPA ではこのもののダイオキシン類暴露下での消長を重視している。

多くの動物実験の結果が、TCDDの甲状腺機能での影響を示している<sup>35)</sup>。従ってダイオキシンや PCB が、甲状腺ホルモンと3次元的に類似構造を含む<sup>36,37)</sup>ことは、示唆的な事実と受け止められた。その後しかし、甲状腺ホルモン結合タンパク質や甲状腺ホルモン・レセプターとの競合性を直接示した報告は見られない。両者の関連は、ダイオキシンの UDP- グルクロノシルトランスフェラーゼ (GT) 活性の誘導を伴った、血漿中の T4 レベル減少の惹起<sup>38)</sup>の報告に依拠している。その例としては、雌の Sprague-Dawley ラットに混餌で0.2~20 mg/kg の TCDD を13週間投与した Van-Birgelen らの実験があり、T4 は TCDD の用量に応じて減少し、UDP-GT との間に負の相関が見られた<sup>39)</sup>。胎生期を観察した Seo らの実験に依れば、胎齢10-16日の Sprague-Dawley ラットに TCDD を経口投与して離乳時に T4 および UDP-GT を測定したところ、0.10 mg/kg/day で T4 の有意な減少(79.6%)とこれに相反する UDP-GT 活性の有意な増加が見られた<sup>40)</sup>。

### 6. 1. 4. 神経系への影響

神経系は、内分泌障害性化学物質の障害標的臓器の中で、高次系への影響の一環として、筆者らが力点を置いている対象である。ここでいう高次系とは、内分泌系、免疫・血液系、および神経系を代表組織として、それらの作用は網の目状のネットワークをなし、相互に関連を持ちつつ、それぞれ生体の恒常性を維持する機能を持っている。胎生期や生後早期の塩素化芳香族炭化水素への暴露は、広範・多彩な影響を高次系へ起こす。こうした現象に対する考え方は、それらの暴露によって発生期の脳に、正常と異なった

内分泌感受性体系を作り上げられることにある<sup>41,42)</sup>。TCDDの神経系への直接的な影響に関する研究は、まだ知見が乏しいが、このことは、次項の甲状腺ホルモンを介した影響との関連では確かなことと思われる。

TCDDの高次系への影響の中で、脳の発生と分化に果たす甲状腺ホルモンへの影響を介した障害ルートが注目されている。発生段階でのラットの知見では、甲状腺ホルモン(T<sub>4</sub>, T<sub>3</sub>)は、様々な神経細胞の分化やミエリン形成に関わっており<sup>43)</sup>、さらにミエリン・タンパクの発現<sup>44)</sup>や、NGF1-Aの発現<sup>45)</sup>を制御していることが知られている。その調節様式は周産期に確立し、この時期の一時的な甲状腺ホルモンのレベルの変化は、甲状腺機能の不可逆的な変化をもたらすものと推定されている<sup>44)</sup>。TCDDによるT<sub>4</sub>レベルの低下は先に見たとおりであり、TCDDやPCBのそうした発生段階での脳における、甲状腺ホルモンの影響を介した神経発育への影響は、かなりの低レベルでも惹起される可能性があるということである<sup>46,47,48)</sup>。

## 6. 2. 内分泌障害発生のメカニズム

ダイオキシン類の毒性がAhレセプターを介して生ずることは、以前からかなりのデータで明らかになっていた<sup>49)</sup>。ダイオキシン類のチトクローム系代謝酵素P450の誘導は、同酵素遺伝子上流にある生体異物応答配列(XRE: xenobiotic responsive elements)への結合を通じた発現調節に基づく<sup>50)</sup>。口蓋裂などに代表される催奇形性との関連では、発生期における口蓋上皮での限局性のAhレセプターの発現が観察されている。ダイオキシン類は、体液性と細胞性の免疫能の低下を引き起こすが、これとの関連ではTリンパ球細胞に同受容体の発現が見出され<sup>51)</sup>、調節に何らかの機構が働いていることが想定されるに至っている。こうした背景にあってダイオキシンの内分泌障害機構も、Ahレセプターがエストロジェン・レセプター遺伝子上流域の応答配列にArnt(Ah-receptor nuclear translocator)とともに結合し、その発現を調節するという特異な作用様式を持つことが示されている<sup>52)</sup>。

この程米国保健省から刊行されたPCDDに関するモノグラフ<sup>14)</sup>によれば、Ahレセプターの役割についてさらに詳細が明らかになっている。ダイオキシン類感受性の異なることで知られているC57BLとDBAの各系統のマウスでも、受容体の結合親和性の違いが明らかになっており、そうした遺伝子多型が、ヒトを含む様々な種にある可能性が現実性をもって示唆されている。

### 6. 2. 1. アリール炭化水素(Ah)レセプター

Ahレセプターの存在は古くから予測されていたようであるが、そのクローニングの報告は、1991-2年のことである<sup>53,54,55)</sup>。このものの作用機構については、前項でも引用したAllan B. Okeyらの総説<sup>49)</sup>および、実際にクローニングに携わった藤井らの総説<sup>56)</sup>にゆずることとし、こ

での記載は概略にとどめる。Ahレセプターは、通常、熱ショック蛋白(Hsp90)と結合している。ダイオキシン類やメチルコラントレンとの結合により、Hsp90を解離し、Ahレセプター核内移行因子(Ah Receptor Responsive Elements)と会合する。会合したAhR-Arntのヘテロ・ダイマーは、DNA上のXREに結合する。このXREは藤井らによってCYP4501A1遺伝子上に見出されたCAC-GCNA/Tをコンセンサス配列としており<sup>50)</sup>、その後、CYP1A2、グルタチオンS-トランスフェラーゼなど種々の薬物代謝酵素の転写調節領域に見出されたとされている。ダイオキシンが薬物代謝酵素系の発現制御を行っている証拠はこのようにして発見された。興味深いことに、このコンセンサス配列は、Ahレセプターとの結合に際して、エストロジェン・レセプター遺伝子上位からとれたDRE(dioxin responsive elements)\*と特異的・競争的であった<sup>52)</sup>。Ahレセプター-Arnt複合体は、EREの制御領域のエンハンサーへのエストロジェン・レセプターの結合をブロックする<sup>57,58)</sup>という。ダイオキシンのエストロジェン抑制作用の少なくとも一部を説明する所見と考えられる。

\*DRE(dioxin responsive elements)とも呼ばれる。このドメインは、AhレセプターとArntの両方のタンパクの結合によって、転写を昂進する機能をもつ<sup>59,60,61)</sup>。

### 6. 2. 2. アリール炭化水素レセプター(Ah)のノック・アウト動物

Ahレセプターの発現が胎生期の口蓋上皮に観察され、口蓋裂の発生との関連が示唆されていることは前述の通りであるが、Ahレセプターの生体内でのリガンドは明らかでなく、この受容体は依然としてオーファン・レセプターである。このためノック・アウト動物の作製が精力的に行われ、現在までに3系統が報告されているが、生体内機能は依然として不明である。ダイオキシン類の内分泌障害機構が直接エストロジェンや他のホルモン・レセプターを介するものではなく、Ahレセプターを介するものと理解される根拠ともなった点は、Ahレセプターのノック・アウトマウスは、ダイオキシン投与の影響がその毒性を含めて殆ど観察されなかった事に基づいている<sup>62)</sup>。Ahレセプターノック・アウトマウスは、ゴンザレスらの作製した最初のそれ<sup>63)</sup>と、その後作製された2種<sup>64,65)</sup>とで、相互に多少の表現型の違いがあるが、基本的にはAhレセプターを欠失した動物では、ダイオキシン投与による口蓋裂など知られる限りの奇形に関する影響も全く認められなかった。しかしながら、これらの欠失マウスに何らかの付加を与えた状態での影響の如何などにさらに検討されなければならない事柄があるので、ダイオキシン類のAhレセプターを介さない作用の存否については結論が出来ない。

### 6. 2. 3. Ahレセプターとダイオキシン類の共同作用

ダイオキシン作用にAhレセプターを介さない未知の部

分がある可能性については前述の通りであるが、既知の Ah レセプターとダイオキシン類の共同作用について明らかな事項を整理してみる。

TCDD は Ah レセプターを介して、その作用を発現する。その他、Ah レセプターに対して親和性を持つ化合物には、PCBs, PCDDs, PCDFs などが知られている。TCDD が Ah レセプターを介して、その作用を発現するとき、そのタンパク質は、前述のようにリガンドによって賦活化される転写活性化因子 (ligand activated transcriptional enhancer) として機能する<sup>60)</sup>。Ah レセプターは、細胞質内でもチロシンのリン酸化など 2 次メッセンジャーの制御因子として作用している<sup>67,68,69)</sup>。TCDD は Ah レセプターを介して核内エストロゲン受容体レベルを下げて、エストロゲン作用機構を抑制することが知られている<sup>70,71)</sup>。そしてこれらに一連の相乗作用が加わる可能性を考慮に入れた研究も行われている<sup>72,73)</sup>。さらに TCDD の反応は多方面に拡大し、Ah レセプターと結合して、転写促進因子として機能し、p450 遺伝子やプラスミノゲン・アクチベータ・インヒビター-2 やインターリューキン 1 $\beta$  などの炎症や分化に関与する遺伝子にも作用することが報告されている。

### 6. 3. Ah レセプターの生物活性の場における三次元定量的構造活性相関 (3D-QSAR)

数多く認識されている内分泌障害性化学物質をそれらの化学構造の面から分類することの難しさの基礎となっている未解決の要因は、結局、内分泌ホルモン類似作用のメカニズムが明らかでないことにあり、その中でもこのことが受容体の機能研究のホットな領域に重なり合っていることにある<sup>74)</sup>。同一物質がレセプターや補助因子 (co-factors) の状態に応じてまったく異なった反応性を示すことの知られるレセプター・リガンド系にあっては、化学構造面から見た時、構造活性相関 (SAR=structure activity relationship) が極く狭い範囲に限ってしか成立しないといたことが少なくない。そこでこの領域でも、単なる SAR でなく、三次元 (3D) 空間での反応の定量性 (quantitative) を考慮した 3D-QSAR で、しかもレセプターの反応性を変化させてレセプターとリガンドの双方の面から相互関係を検討する、生物活性の場 (Comparative Biological Field Analysis) における 3D-QSAR によるダイオキシン類作用機構研究の機運が充まっている<sup>75,76)</sup>。もとより CBFA・3D-QSAR は、本来バイオ医薬品などの創薬領域に登場した、分子生物学と有機合成にまたがる創薬の為の新しい境界複合領域であるが、これが安全科学の領域で新たな役割を果たすことが求められつつあるということである。

米国 EPA は、ED-STAC (Endocrine Disruptor Screening & Testing Advisory Committee) なる委員会を作って諮問を行った中で、酵母のレセプター結合試験によるプレ・スクリーニングを重視しているが、これはその答申にもあ

る通り、上記の三次元レベルでの構造活性相関情報が決定的に不足していることに対する抜本的な対策が必要との認識に立脚している。レセプターを様々に変異させてその三次元構造と、リガンドとなる化学物質の相互関係を求めるといった生物活性の場を考慮した 3D-QSAR を推進する研究母体は現在のところまだ整ってはいないが、筆者等の安全性生物試験研究センターでも此の領域に最重点をおいた研究の立ち上げに精力を注いでいるところである。

## 7. おわりに

WHO によるダイオキシン類の毒性再評価がなされ、TDI がこれまでより低い値に設定されたことは、規制面のみならず安全性評価の面でも、世界的に多大の影響を与えらると思われる。規制面に関しては、今回の TDI がコプラナー PCB を含むことから、日本では現状のままでは WHO の規制値を超える暴露量が想定される。また、今回の評価に際し、これまでの NOEL・NOAEL と不確実係数による方法から、薬物動態に基づいた体内蓄積量と不確実係数を用いたことが特記され、今後他の種々の化学物質安全性評価への波及効果が予想される。毒性データに関しては、TEF の数字に、より科学的正確さを与えるために、他の多くのダイオキシン類についての *in vivo* 中期・長期実験が必要と思われる。このことは、IARC の発がん性評価において、データ量の問題でダイオキシン類の中で TCDD のみが対象となり、Group 1 とされたことから分かる (ちなみに、IARC/EHC の評価文書は、これまで TCDD に関してのみであり、最近 PCDD・PCDF について作成中である)。アカゲザルの子宮内膜炎に関しても、評価の定まらぬところがあり、現在進行中のカナダ保健省における実験結果が待たれる。

毒性発現機構については、Ah レセプター・ノックアウト動物の開発により、ダイオキシン類の生体影響が通常暴露レベルの影響の範囲では同レセプター依存性とみなすべき根拠が明らかになったことに触れた。このことにより、ダイオキシン類を巡る研究の今後の方向性と課題は一挙に明確になったように思われる。それはふたつ有り、先ず、同レセプターを介する様々のダイオキシン類ならびに PCBs の同レセプターとの結合・解離などの特性パラメータについての基本データ・ベースを整備することであり、次いで、その結合産物の転写活性調節物質としての種々の遺伝子に対する機能上の詳細を個々のダイオキシン類毎に明らかにすることである。そしてひいてはその両者を総合した、分子毒性学的な TEF を確立することである。従来用いてきた個体レベルの生物尺度による TEF の、そうした新しい TEF への移行は、将来のトキシコロジーに predictivity の高い飛躍的な科学的合理性を賦与する基盤を形成し、それが環境と生体に調和のとれた産業と生活を

切り開く為の力強いツールとして発展してゆくことを保証するものとなるに違いない。

### 謝 辞

本稿の作成に際しての安全性生物試験研究センター・北條美伸，木村智秋さんの編集協力に深謝する。

### 文 献

- 1) 生活環境調査研究事業「ダイオキシンの毒性発現機構に関する調査研究」報告書，平成4～6年度
- 2) 厚生科学研究費「ダイオキシンのリスクアセスメントに関する研究」中間報告書，平成7～8年度
- 3) 国立医薬品食品衛生研究所「化学物質のリスクアセスメント」編集委員会編，厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修：化学物質のリスクアセスメント，現状と問題点，薬業時報社，東京，pp.101-114(1997)
- 4) Kociba, R. J., Keyes, D. G., Beyer, J. E., Carreon, R. M., Wade, C. E., Dittenber, D. A., Kalnins, R. P., Frauson, L. E., Park, C. N., Barnard, S. D., Hummel, R. A., and Humiston, C. G. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **46**, 279-303 (1978)
- 5) Murray, F. J., Smith, F. A., Nitschke, K. D., Humiston, C. G., Kociba, R. J. and Schweta, B.A.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **50**, 241-252 (1979)
- 6) Rier, S. E., Martin, D. C., Bowman, R. E., Dmowski, W. P. and Becker, J. L.: *Fund. Appl. Toxicol.*, **21**, 433-441 (1993)
- 7) Coulston, F. and Kolbye, A. C. Jr.: *Regul. Toxicol. and Pharmacol.*, **20**, (1) Part2 of 2 Parts, S960-S1029 (1994)
- 8) Environmental Protection Agency (EPA), Health Assessment Document for 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds. (1994)
- 9) WHO Summary Report of "Consultation on Tolerable Daily Intake from Food of PCDDs and PCDFs" EUR/ICP/PCS 030 (S) 0369n (1991)
- 10) Bowman, R. E., Schantz, S. L., Gross, M. L. and Ferguson, S. A.: *Chemosphere*, **18**, 235-242 (1989a)
- 11) Bowman, R. E., Schantz, S. L., Weerasinghe, N. C., Gross, M. L. and Barsotti, D. A.: *Chemosphere*, **18**, 243-252 (1989b)
- 12) ダイオキシンリスク評価検討会報告書，環境庁(1997)
- 13) Kimbrough, R. D., Falk, H., Stehr, P. and Fries, G. F.: *J.Toxicology and Environmental Health*, **14**, 47-93 (1984)
- 14) Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR): Toxicological Profile for Chlorinated dibenzo-p-dioxins (Update, Draft for Public Comment) (1997)
- 15) Schantz, S. L., Barsotti, D. A., Allen, J. R.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **48**, A180, (1979)
- 16) Burleson, G. R., Lebrech, H., Yang, Y. G.: *Fund. Appl. Toxicol.*, **29**, 40-47 (1996)
- 17) DeCaprio, A. P., McMartin, D. M. and O'Keefe, P. W.: *Fundam. Appl. Toxicol.*, **6**, 454-463 (1986)
- 18) Nisbet, I. C. T. and Paxton, M. B.: *Am. Stat.*, **36**, 290-298 (1982)
- 19) Health Effects Assessment for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. (US) EPA, EPA/540/1-86/044 (1984)
- 20) Environmental Protection Agency : "EPA Re-evaluating Dioxin, Science advisory board's review of EPA's reassessment of dioxin and dioxin-like Compounds. EPA-SAB-EC-95-021" , 1-98 (1995)
- 21) Jirasek, L., Kalensky, J., Kubec, K., Pazderova, J. and Lukas, E.: *Hautarzt*, **7**, 328-333 (1976)
- 22) Mably, T. A., Moore, R. W. and Peterson, R. E.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **114**, 97-107 (1992a)
- 23) Mably, T. A., Moore, R. W. and Peterson, R. E.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **114**, 108-117 (1992b)
- 24) Mably, T. A., Moore, R. W. and Peterson, R. E.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **114**, 118-126 (1992c)
- 25) Gray, L. E. Jr., Kelce, W. R., Monosson, E., Ostby, J. S. and Birnbaum, L. S.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **131**, 108-118 (1995)
- 26) Gray, L. E. Jr. and Ostby, J. S.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **133**, 285-294 (1995)
- 27) Bjerke, D. L., Sommer, R. J., Moore, R. W. and Peterson, R. E.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **127**, 250-257 (1994)
- 28) Roman, B. L., Sommer, R. J., Shinomiya, K. and Peterson, R. E.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **134**, 241-250 (1995)
- 29) Kociba, R. J. and Schwetz, B. A.: *Drug. Metab. Rev.*, **13**, 387-406 (1982)
- 30) Couture, L. A., Harris, M. W. and Birnbaum, L. S.: *Fundam. Appl. Toxicol.*, **15**, 142-150 (1990)
- 31) McNulty, W. P.: *Environ. Health Perspect*, **60**, 77-88 (1985)
- 32) Allen, J. R., Basotti, D. A., Van, Miller, J. P. et al.: *Food Cosmet. Toxicol.*, **15**, 401-410 (1977)
- 33) Allen, J. R., Barsotti, D. A., Lambrecht, L. K. et al.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **320**, 419-425 (1979)
- 34) Barsotti, D. A., Abrahamson, L. J., Marlar, R. J. and Allen, J. R.: *J. Reprod. Fertil.*, **59**, 15-20 (1980)
- 35) Neal, R. A., Beatty, P. W. and Gasiewicz, T. A.: *Endocrinology*, **101**, 292-296 (1979)
- 36) McKinney, J. D., Chae, K., Oatley, S. J. and Blake, C. C.: *J. Med. Chem.*, **28**, 375-381 (1985)
- 37) McKinney, J. D., Fawkes, J., Jordan, S., Chae, K., Oatley, S., Cleman, R. E. and Briner, W.: *Environ. Health Perspect*, **61**, 41-53 (1985)
- 38) Sewall, C. H., Flagler, N., Vanden-Heuvel, J. P., Clark, G. C., Tritscher, A. M., Maronpot, R. M. and Lucier, G. W.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **132**, 237-244 (1995)
- 39) Van-Birgelen, A. P., Smit, E. A., Kampen, I. M., Groeneveld, C. N., Fase, K. M., Van-der-Kolk, J., Poiger, H., Van-den, Berg, M., Koeman, J. H. and Brouwer, A.: *Eur. J. Pharmacol.*, **293**, 77-85 (1995)
- 40) Seo, B. W., Li, M. H., Hansen, L. G., Moore, R. W., Peterson, R. E. and Schantz, S. L.: *Toxicol. Lett.*, **78**, 253-262 (1995)
- 41) MacLusky, N. J., Brown, T. J., Schantz, S., Seo, B. W. and Peterson, R. E.: *Toxicol. Ind. Health*, **14**, 185-208 (1998)
- 42) Gray, L. E. Jr. and Ostby, J.: *Toxicol. Ind. Health*, **14**, 159-184 (1998)

- 43) Pasquini, J. M. and Adamo, A. M.: *Dev. Neurosci.*, **16**, 1-8 (1994)
- 44) Rodriguez-Pena, A., Ibarrola, N., Iniguez, M. A., Munoz, A. and Bernal, J.: *J. Clin. Invest.*, **91**, 812-818 (1993)
- 45) Pipaon, C., Santos, A. and Perez-Castillo, A.: *J. Biol. Chem.*, **267**, 21-23 (1992)
- 46) Porterfield, S. P.: *Environ. Health Perspect.*, **102**, 125-130 (1994)
- 47) MacLusky, N. J., Brown, T. J., Schantz, S., Seo, B. W. and Peterson, R. E.: *Toxicol. Ind. Health*, **14**, 185-208 (1998)
- 48) Sher, E. S., Xu, X. M., Adams, P. M., Craft, C. M. and tein, S. A.: *Toxicol. Ind. Health*, **14**, 121-158 (1998)
- 49) Okey, A. B., Riddick, D. S. and Harper, P. A.: *Toxicol. Lett.*, **70**, 1-22 (1994)
- 50) Fujisawa-Sehara, A., Yamane, M. and Fujii Kuriyama, Y.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5859-5863 (1988)
- 51) Lawrence, B. P., Leid, M. and Kerkvliet, N. I.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **138**, 275-284 (1996)
- 52) White, T. E. and Gasiewicz, T. A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **193**, 956-62 (1993)
- 53) Hoffman, E. C., Reyes, H., Chu, F-F. and Sander, F.: *Science*, **252**, 954-958 (1991)
- 54) Ema, M., Sogawa, K., Watanabe, N., Chujoh, Y., Matsushita, N., Gotoh, O., Funae, Y. and Fujii-Kuriyama, Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**, 246-253 (1992)
- 55) Burbach, K. M., Poland, A. and Bradfield, C. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 8185-8189 (1992)
- 56) 藤井義明: *ファルマシア*, **34**, 431 - 435 (1998)
- 57) Krishnan, V., Porter, W., Santostefano, M. et al.: *Mol. Cell Biol.*, **15**, 6710-6719 (1995)
- 58) Safe, S. H.: *Pharmacol. Ther.*, **67**, 247-281 (1998)
- 59) Fisher, J. M., Wu, L., Denison, M. S.: *J. Biol. Chem.*, **265**, 9676-9681 (1990)
- 60) Jones, P. B. C., Durrin, L. K., Galeazzi, D. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 2802-2806 (1986)
- 61) Neuhold, L. A., Gonzalez, F. J. and Jaiswal, A. K.: *DNA*, **5**, 403-411 (1986)
- 62) Fernandes-Salguero, P. M., Pineau, T., Hilbert, D. M., McPhail, T., Lee, S. S., Kimura, S., Nebert, D. W., Rudikoff, S., Ward, J. M. and Gonzalez, F. J.: *Science*, **268**, 722-726 (1995)
- 63) Fernandez-Salguero, P. M., Hilbert, D. M., Rudikoff, S., Ward, J. M. and Gonzalez, F. J.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **140**, 173-179 (1996)
- 64) Schmidt, J. V., Su, G. H., Reddy, J. K., Simon, M. C. and Bradfield, C. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 6731-6736 (1996)
- 65) Mimura, J., Ymashita, K., Nakamura, K., Morita, M., Takagi, T. N., Nakao, K., Ema, M., Sogawa, K., Yasuda, M., Katsuki, M. and Fujii-Kuriyama, Y.: *Genes Cells*, **2**, 645-654 (1997)
- 66) Birnbaum, L. S.: *Environ. Health Perspect.*, **102** (Suppl.9), 157-167 (1994)
- 67) Matsumura, F.: *Biochem. Pharmacol.*, **48**, 215-224 (1994)
- 68) Peattie, D. A., Haring, M. W., Fleming, M. A., DeCenzo, M. T., Lippke, J. A. and Livingston, D. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 10974-10978 (1992)
- 69) Alnemri, F. S., Fernandes-Alnemri, T., Nelki, D. S., Dudley, K., Dubois, G. C. and Litwack, G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 6839-6843 (1993)
- 70) Safe, S., Astroff, B., Harris, M., Zacharewski, T., Dickerson, R., Romkes, M. and Biegel, L.: *Pharmacol. Toxicol.*, **69**, 400-409 (1991)
- 71) Lucier, G. W.: *Environ. Toxicol. Chem.*, **10**, 727-735 (1991)
- 72) Abbott, B. D., Perdew, G. H., Buckalew, A. R. and Birnbaum, L. S.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **128**, 138-150 (1994)
- 73) Birnbaum, L. S., Harris, M. W., Miller, C. P., Pratt, R. M. and Lamb, J. C.: *Teratology*, **33**, 29-35 (1986)
- 74) Carson-Jurica, M. A., Schrader, W. T. and O'Malley, B. W.: *Endocrine Rev.*, **11**, 201-220 (1990)
- 75) McKinney, J. D. and Waller, C. L.: *Environ. Health Perspect.*, **102**, 290-297 (1994)
- 76) McKinney, J. D. and Waller, C. L.: *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.*, **1**, 27-58 (1998)