

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名「大気中に存在する新しいタイプの内分泌かく乱物質」

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

武田 健 (東京理科大学薬学部 教授)

主たる研究参加者

早川 和一 (金沢大学大学院自然科学研究科 教授)

渡邊 伸枝 (東京都健康安全研究センター  
環境保健部環境衛生科 主任研究員)

高野 裕久 (国立環境研究所  
環境ホルモン・ダイオキシンプロジェクト 統合研究官)

菅原 勇 (結核研究所分子病理学科 科長)

鈴木 勉 (星薬科大学薬学部 教授)

吉田 成一 (大分県立看護科学大学看護学部 講師)

3. 研究内容及び成果

自動車排ガスの健康影響に対する社会的関心は自動車の普及と共に高まり、1960年代には既に呼吸器系への影響が報告されている。自動車排ガスにはガス成分だけでなく、浮遊粒子状物質(SPM: suspended particulate matter)が含まれている事が判ってきた。特に幹線道路沿い高汚染地区のSPMは、自動車からの排出が約80%を占め、その大部分はディーゼル排ガス(DE: diesel exhaust)由来のディーゼル排ガス中粒子成分(DEP: diesel exhaust particle)であると考えられている。SPMの健康影響としては、呼吸器系、循環器系、免疫系への影響が報告されている。

DE/DEP 中には、女性ホルモン様作用やダイオキシン受容体(AhR)刺激作用等の、従来から知られている作用を示す物質に加え、性ステロイドホルモン受容体遺伝子発現抑制作用等を示す物質が含まれている事が明らかになって来た。DE/DEP中に内分泌かく乱作用を示す物質が含まれているとすれば、環境安全対策上極めて重要な問題であり、物質の同定、影響の確認、作用機構の解明が急務となる。

これらの背景から、本研究では①DE/DEPの生殖系、神経系への影響を解明する、②DE/DEP中の内分泌かく乱物質を同定する、③同定された内分泌かく乱物質の大気中濃度を測定し、ヒトへの影響を推定する、④その除去技術を確立する、事を目標とした。

本研究の成果概要は以下の通りである。

(1)DEP 中に含まれる内分泌かく乱物質の同定

1)DEP 成分の抗男性ホルモン作用(早川グループ)

DEP は抗男性ホルモン作用、ダイオキシン受容体(AhR)活性化作用、AhR 不活化作用を示す多種の物質を含む事を明らかにした。抗男性ホルモン作用、AhR 活性化作用を示す物質として、10種の多環芳香族炭化水素(PAH)を同定した。抗男性ホルモン作用物質として水酸化フェナンスレン類を、男性ホルモン受容体(AR)アンタゴニストとして1-ニトロピレン、3-ニトロフルオランテン等のニトロ化PHA及び水酸化PHAを同定した。AhR活性化物質が抗男性ホルモン作用の一部を担っている事、DEP中の抗男性ホルモン作用物質はディーゼル車のエンジン負荷が強くなるほど多くなる事、を明らかにした。

#### 2)尿中代謝物測定による多環芳香族炭化水素類曝露評価(早川グループ)

1-ヒドロキシピレン、2-ヒドロキシフルオレンを検出する蛍光検出HPLCシステムを開発した。日本人、タイ人尿中濃度の測定結果から、DE/DEP曝露状況推定の可能性が示唆された。大規模疫学調査等での曝露評価に有効である事が示唆された。

#### 3)DEPのER $\alpha$ mRNA発現抑制作用(吉田/武田/早川グループ)

DEP抽出物は女性ホルモン受容体(ER) $\alpha$ 遺伝子発現抑制物質を含む事、中性抽出画分に活性が有る事、活性本体はモノヒドロキシフェナンスレンである可能性が高い事、を明らかにした。

#### 4)DEP曝露ヒト絨毛癌細胞の遺伝子発現解析(菅原/武田/早川グループ)

DEP抽出物を中性、水溶性、脂溶性、カルボン酸性、フェノール性画分に分画し、各画分添加による遺伝子発現変動を解析した。発現変動遺伝子数にばらつきはあるものの全ての画分は発現を減少させる傾向が強い事、細胞間接着・伝達関連遺伝子群、代謝酵素・蛋白関連遺伝子群、ストレス応答関連遺伝子群発現に影響を及ぼす事、を明らかにした。

### (2)雄性生殖器系への影響

#### 1)胎仔期曝露の影響(渡辺グループ)

胎仔期ラットに全排出ガス及び除塵排出ガスを曝露すると、免疫系、骨格形成、生殖機能、呼吸器系機能に影響を及ぼす事を明らかにした。曝露母親の内分泌環境が変化し、胎仔の未分化な間葉組織に作用して細胞間相互作用を阻害する事が原因と考えられる。除塵排ガスでも全排出ガス曝露と同様な影響が見られ、ガス成分あるいは除塵後も残存しているナノ粒子が関与している可能性が示唆された。

#### 2)雄性生殖腺分化過程に及ぼす影響(武田/菅原グループ)

胎仔期DE曝露の雄胎仔(胎齢14日)への影響を解析し、ミューラー管抑制因子(MIS)及び核内受容体型転写因子Ad4BP/SF-1遺伝子の発現が有意に低下する事、性腺原基から雄性生殖腺への分化抑制を引起す事、を明らかにした。雌胎仔では卵胞発生に関与するBone morphogenetic protein-15の発現が有意に低下しており、雌性生殖器分化にも影響する可能性が示唆された。

#### 3)雄性生殖系に及ぼす影響(武田/高野/菅原グループ)

環境基準値程度の低濃度であっても、DE胎仔期及び出生後曝露で、雄性産仔テストステロ

ン値変動、精子形成能低下(一日精子産生量、精巣組織像悪化)、精子性状悪化(運動率低下、奇形率上昇)を引き起こす事を明らかにした。精巣セルトリ細胞にミトコンドリアクリステ崩壊像が認められる事、ライディッヒ細胞内脂肪滴にDE由来と推定される無数の数nmサイズの超微粒子が存在する事、を明らかにした。

#### 4) DEP の感染性肺障害への影響と遺伝子発現解析(高野グループ)

疫学調査の結果から、SPM の健康影響は特定の高感受性群に出現し易い事が明らかにされている。高感受性群は、呼吸器系・循環器系疾患患者、入院患者、老人施設入所者、高齢者等で構成されている。高感受性者は、グラム陰性菌感染等を契機とする急性増悪により、しばしば重症化する事が経験されている。

DE はグラム陰性菌に起因する感染症肺障害を相乗的に増悪化する事、炎症性サイトカイン、ケモカイン関連遺伝子発現を顕著に増強する事、この作用は主として粒子成分が担っている事、を明らかにした。

### (3)脳神経系への影響

#### 1)脳内遺伝子発現への影響(武田グループ)

周産期 DE 曝露は新生仔脳内 ER $\alpha$ 、 $\beta$  の発現を最大 1.5 倍まで上昇させる事、上昇パターンは曝露濃度・時期等によって異なる事、を明らかにした。甲状腺ホルモン系には影響せず、エストロゲン系に影響を及ぼしている可能性、DEP が新生仔脳内に移行している可能性が示唆された。

#### 2)DE 曝露マウスの行動評価(鈴木／武田グループ)

DE の胎仔期、成長期慢性曝露で、運動量が増加する事、特に新奇環境への馴化過程の運動量が増加する事、ストレスに対する脆弱性が惹起される事、を明らかにした。自発運動を調節する脳内モノアミン系において、ドパミン系ではその代謝産物ホモバニリン酸が、セロトニン系ではセロトニン及びその代謝産物水酸化インドール酢酸が増加している事、その代謝回転も亢進している事、を明らかにした。

DEP 慢性曝露がセロトニン及びドパミン神経系機能、代謝系に影響を及ぼし、自発運動変化をもたらす可能性が示唆された。曝露濃度は現行の環境基準値(0.1mgDEP/m<sup>3</sup>)であり、曝露時間が相対的に短い(1日8時間、週末は未曝露)事を考慮すると、幹線道路沿いの実際の環境曝露量よりも低い曝露量で影響が認められた事には注意を要する。また、ドパミン神経系機能変化に起因する、依存性薬物に対する感受性変化も考慮すべきである事が示唆された。

#### 3)脳組織に及ぼす影響(武田グループ)

胎仔期曝露で、出生仔大脳皮質、小脳、海馬に caspase3 陽性細胞が存在する事、apoptosis 小体形成過程に特徴的なクロマチンの不均一凝集、核不整を伴う細胞が存在する事、血管周囲浮腫、微小血管狭窄が各部位に存在する事、細胞質内顆粒にDEPと疑われる沈着物質が存在する事、を明らかにした。

DEP が胎盤を通して胎仔に移行し、胎仔の脳血管関門や精巣血管関門を通過する事、その

粒子は出生後も仔の特定細胞に蓄積された状態で残り、周辺の細胞に影響を及ぼす可能性がある事、が示唆された。

#### 4. 事後評価結果

##### 4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

ディーゼル排ガス(DE)／粒子成分(DEP)胎仔期曝露の生殖器系、脳神経系への影響、DE／DEP中の内分泌かく乱物質の単離・同定等々に関し、新たな知見を多数得ている。しかしながら、その成果の殆どは「……を示唆する」という段階に止まっており、確定的な証拠に裏付けられた成果は少なく、詰めが甘い、と言わざるを得ない。用いた研究手法に特段の工夫があったと言うわけでもなく、科学・技術的に大きなブレークスルーを示す成果が得られたと言うわけでもないが、研究は広く浅く推進されており、個々の成果をさらに掘り下げ、相互に関連付ける事によって、多くの問題点が明らかにされる要素を内包している。今後のさらなる展開を期待したい。

新たな視点からの独創的な研究であり、複雑、困難な課題に敢えて挑戦した事を評価したい。この様な研究では、得られた成果の裏付け研究が大切である。今後、数多くの新知見が確定的な証拠で裏付けられて行く事を期待したい。

研究成果は論文(国際誌27報、国内誌3報)、学会(国際学会33件、国内学会231件)発表されている。学会発表は比較的活発に行われたが、論文発表が少ない事に不満が残る。この様な領域の論文がインパクトファクターの高い学術誌には採用され難いという事情を考慮しても、残念な結果であると言わざるを得ない。論文発表は、成果の公表と言う事に止まらず、考察を深め、その後の研究方針を練り上げる上でも極めて重要であり、他の研究者との相互作用の契機にもなる。その意味で、論文発表が少なかった事が、研究の厚みや説得力にも影響を与えており、残念である。研究者の幅、層がもう少し厚ければ、もっと確実な成果が挙げられたのではないかと思われる。重要な視点を持った研究であるだけに、その点が残念である。

##### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

大気中の化学物質には多くのヒトが日常的に晒されるため、大気汚染物質中に内分泌かく乱物質が存在する事を明らかにし、その成分を特定する研究は社会的に重要度が高い。また、内分泌かく乱物質問題に対処するための諸研究で、その複雑性・困難性故に後回しにされてきた、複合物質による影響の解明への糸口を与えるものとしての期待度の高い研究である。DE／DEPに含まれる内分泌かく乱物質の同定、生殖機能への影響、脳神経系への影響、行動薬理学的研究、等々多面的な研究が同時に行われた例は他になく、パイオニアスタディーとして意義のある研究であり、DE／DEPの影響の重要性を明らかにした事は高く評価する。

その成果は未だ定性的・半定量的結果に止まっているが、今後それらの成果が裏付けを得て適切に発展する事を期待したい。その結果は、より有効・有益なディーゼル排ガス対策等に対する科学的基盤・基礎を提供するであろう。

#### 4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

共同研究者の受賞は以下の通りである。

- ・吉田成一 第1回日本薬学会 環境・衛生部会賞(平成15年)
- ・庭田祐一郎 第1回精子形成・精巣毒性研究会 奨励賞(平成17年)

研究期間中に、押尾 茂氏が奥羽大学薬学部教授に、吉田成一氏が大分県立看護科学大学講師に就任した。