

環境毒性の分子生物学

国立環境研究所 石堂 正美

I. 序

地球は美しい。産業化の進展とともに土壌、大気、水の汚染が進んできている。こうした生態系に加え、私たちの健康へも影響している。こうした環境汚染物質には、古くから重金属、ディーゼル排気粒子が知られてきているが、最近では電磁界や多種の化学物質が指摘されている。前者は産業活動の副産物であることが多く、その対策はかなり執られてきている。しかしながら、後者は私たちの日常生活に密接に関係しているために、その対策は思いのほか採られていないのが現状である。電磁界や多種の化学物質の健康影響を排除するためには、それらの代替品の開発や健康影響のないレベルでの利用が賢明である。代替品の開発が不可能な現在では、それらの健康影響のレベル(閾値)を多方面から見積もることが急務になってきている。

筆者は、これまでに重金属、電磁界、そして環境化学物質の生体影響評価に関する研究を進め、若干の知見を得たので紹介する。

II. 電磁界の環境毒性

今日の「電磁界の健康影響の問題」は、1979年に発表されたWertheimerとLeeper両博士の論文に端を発するとされている[1]。低レベルの超低周波(50~60 Hz)電磁界への曝露によって、白血病、脳腫瘍、などのリスクが上昇している可能性を示唆する疫学的データである。これらの報告で示されているレベルは、これまで生理的影響を考慮して安全とされてきたレベルより極端に低いレベルであり、その妥当性について国際的に盛んに研究されているところであるが、わが国での研究あるいは行政での取り組みは大幅に遅れている。このような超低周波電磁界への曝露をうけている人口は非常に多く、健康影響の具体的検討が急務である。

電磁界の生体影響に関する研究は、彼らの発表より以前からなされてきている。1970年代半ば、電界の生体影響が問題にされはじめた頃から多くのホルモンに対する電界の影響が研究された。ほとんどの研究で何らの影響も認められなかったが、1981年メラトニンの夜間分泌が抑制されることがWilson博士らによって報告された。ヒトのコルチゾル、成長ホルモン、テストステロンなどが調べられたが、いずれも影響は認められなかった。このような結果と後述するStevens博士のメラトニン仮説[2]やLiburdy博士の報告[3]により、電磁界曝露によるメラトニンへの影響が一時多くの研究者の関心を集めた。

現代生活では、夜になっても煌々と照明され、安息の時間帯が著しく短縮されてしまっている。これがメラトニン分泌を抑えていることは確かであり、メラトニンの生理作用からみて喜ばしいことではない。性活動の抑制と精神安定に必要なメラトニンの分泌が欠乏してくる。

また、乳癌は現代病の一つである。電力を膨大に消費する産業化が乳癌の原因とは考

えにくい、1985 年 Stevens 博士は次の仮説を提唱した。産業化に伴い一日の‘暗さ’が減少し、乳癌細胞に対して抑制的に作用するメラトニン分泌が減少し、乳癌細胞が増殖しやすくなってきているとする、いわゆる‘メラトニン’仮説である。この仮説は、唯一 UCLA 大学の Liburdy 博士によって支持されてきた。Liburdy 博士は、当時アリゾナ大学で研究していた Blask 博士のヒト乳癌培養細胞 MCF-7 を譲り受け、電磁界の影響を調べた。電磁界の曝露装置は、4 個の Merritt-coil 型で、これをそのまま市販の CO₂ 恒温器に入れたものである。メラトニンは MCF-7 細胞の増殖を抑制した。しかし、電磁場のかかっているところでは (1.2 μ T; 60 Hz)、メラトニンの細胞増殖抑制作用が打ち消され、MCF-7 細胞は増殖し続けた。Liburdy 博士は、更に電磁場のかかっている細胞では、Ca²⁺イオン流入が増大することを報告した。Ca²⁺イオン流入の初期相には変化はみられないが、定常相の Ca²⁺イオン流入が電磁界により増大するという。

筆者も、Liburdy 博士が用いた MCF-7 細胞を譲り受け、追試を行った[4]。確かに博士の報告通りに、メラトニンの細胞増殖抑制作用が電磁界 (100 μ T, 50Hz) により消失することが確認された。10%血清存在下の MCF-7 の増殖に対して、10⁻¹¹–10⁻⁹M 濃度のメラトニンは 20–25% の増殖阻害を示すが、電磁界 (100 μ T, 50Hz) に曝露すると、メラトニンの細胞増殖阻害は約 0–15% に減少する。このことは電磁界によりメラトニンの情報伝達機構が何らかの形で阻害されていることが示唆された。電磁界の生体影響の分子基盤を解明するためには、この MCF-7 細胞のメラトニンの情報伝達機構を解析することが重要になってくる。そこで、筆者らは MCF-7 細胞に存在するメラトニン受容体を同定することから着手した。

¹²⁵I で標識したメラトニンによる結合実験では、メラトニン 1 型受容体アンタゴニスト (Luzindole) の存在下でメラトニンの細胞膜受容体への結合が阻害され、2 型受容体アンタゴニスト (GR135531) の存在下では阻害はみられなかった。また PCR 法ではメラトニン 1a 受容体に対する特異的プライマーにより受容体 cDNA が増幅され、1b 受容体のプライマーではそれは増幅しなかった。以上の結果より、用いた MCF-7 における細胞膜メラトニン受容体はその大部分がタイプ 1a 受容体であることが明らかとなった。続いて、電磁界曝露がメラトニンの受容体への結合や受容体遺伝子の発現に影響を与えるかどうかを調べてみると、電磁界 ((100 μ T, 50Hz) は受容体レベルでメラトニンの情報伝達を阻害しなかった。

次に、電磁界が G 蛋白質レベルで影響を与えているかどうかを検討してみると、GTPase 活性も ADP リボシル化においても有意な影響はみられなかった。また、電磁界 (100 μ T, 50Hz) が効果器 アデニルサイクレース自身の活性に影響を及ぼしているかを調べたところ、電磁界曝露によりアデニルサイクレース自身の活性にも全く変化は認められなかった。

最後に、メラトニン 1a 受容体は、細胞膜において Gタンパク質・アデニルサイクレースと連結し、アデニルサイクレースによる細胞内の cAMP 蓄積に対して抑制系として機能していると報告されている。アデニルサイクレース刺激後の細胞内 cAMP の蓄積を指標として、メラトニンの作用 (蓄積の抑制) と電磁界曝露との関係をみたところ、メラトニンによる抑制が電磁界 (100 μ T, 50Hz) により阻害され、その阻害率と曝露日数との関係は極めて良好な直線性を示すことが明

らかとなった。以上のことから、筆者らの研究では電磁界は上記の分子群の連結部に作用することが示唆された。

III. 環境化学物質の環境神経毒性

生物としての複雑なヒトの成り立ちを理解したり、ヒトの疾病を治すことを目的として、さまざまなモデル動物が研究対象とされてきている。自然環境にあるモデル動物、自然発症したミュータントモデル動物、そして遺伝子工学的手法を駆使したモデル動物など実に多彩である。モデル動物の一般的な特徴は、1) 世代交代期間が短いこと。2) 遺伝学的解析に適していること。特に、ゲノムプロジェクトが終了あるいは進行中であること。3) 安価なこと。4) 生育しやすいこと。5) 利用する研究者のサポート体制が確立していること。そして、明白ではあるが、6) 複雑なヒトの成り立ちや疾病が単純化されていることであろう。

ヒトの疾患を単純化した疾患モデル動物は、当然ながらヒトの疾患の特徴を全て備えていない。従って、同じ疾患名のモデル動物でも病態が異なる場合がある。たとえば、選択的ドーパミン神経変性疾患で、振戦、無動、固縮、姿勢反射障害といった運動障害がみられるパーキンソン病のモデル動物もいくつかの方法で作製されてきている。非遺伝性パーキンソン病の環境因子として歴史的に最も精力的に研究されてきている神経毒で MPTP (N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-pyridine) 作製されたモデル動物の神経には、ヒトのパーキンソン病患者に特徴的な Lewy body は観察されない。一方、近年パーキンソン病の環境因子として注目されている農薬ロテノンによるモデル動物では Lewy body の封入体を伴う。しかし、どちらのモデル動物が優れているかを論じることは困難である。両モデル動物において、環境因子がパーキンソン病様病態をもたらすことを実証しているからである。

これらの方法以外にもパーキンソン病モデル動物が作製されてきている。こうした研究を通じて、ヒトのパーキンソン病の治療に L-DOPA 補充法、細胞療法、遺伝子治療の可能性を提示してきたことは、疾患モデル動物を対象とした研究の大きな成果と言える。

このようなモデル動物の有益性に鑑み、筆者らは環境化学物質が発達期の脳・神経系に影響を及ぼし、多動症をきたすか否かをモデル動物により検討を加え、若干の知見を得たので紹介したい。

多動症モデル動物

今日のヒトの疾患で多動症が観察されるのは、注意欠陥多動性障害(ADHD)や自閉症である。いずれも発達期にある脳の器質的障害とされている。これらの疾患は、言語の獲得性の観点から明瞭に区別されるが、場にふさわしくない多動性、衝動性、不注意、他人とのコミュニケーションが困難なこと、反社会的等が特徴とされている。従って、多動症モデル動物は、これらの疾患の特徴から行動面の特徴である多動を抽出したものである。洋の東西を問わず、多動症モデル動物は ADHD のモデル動物と同義的に用いられている場合が多いが、多動症は自閉症の特徴の一つでもある。

先駆的な多動症モデルラットは、1976年に Shaywitz らによって報告された[5]。当時は、目に見えないような小さな障害の原因が脳にあるに違いないとされた微細脳機能不全 (minimal brain dysfunction) のモデルと称された。彼らの方法は、生後5日齢の雄ラットの大槽内に6-水酸化ドーパミン(100 μ g:約 500 nmol 相当)という試薬を投与し、3-4週齢で運動量が増加するというものである。多動になったラット脳内のドーパミン含量が特異的に減少していることを併せて報告しているが、6-水酸化ドーパミンによる多動症の分子機構に関しては今日もなお不明な点が多い。

これに加え、今日の遺伝子欠損マウス作製技術の進歩により、さまざまな多動症モデルマウスが報告されてきている。特定の遺伝子が個体レベルから欠損した時の多動症であるから解釈が容易であると思われるが、実際は必ずしもそうではない。おそらく、遺伝子欠損による代償作用が働くためであろうと云われている。たとえば、ドーパミン神経系の構成分子の遺伝子欠損は、マウスの多動症をもたらしたり、そうでなかったりする。同じドーパミン受容体遺伝子の欠損でもそのサブタイプによって表現系が異なる。ドーパミン受容体 D1, D2, 及び D4 遺伝子の欠損マウスでは移所行動は減少する。逆に、ドーパミン受容体 D3 のそれは増加し、特に新しい環境での移所行動の増加が著しい。これらの報告により、マウス多動症の原因にドーパミンの hypofunctioning と hyperfunctioning の両仮説がある所以である。

環境化学物質によるラット多動症

WHO による国際疾病分類基準あるいはそれを引き継ぎアメリカ精神医学学会が作成した診断の手引書により診断基準がかなり整理され、注意欠陥多動性障害 (ADHD) や自閉症の子供が増加してきていることが明らかになってきている。米国ではおよそ3-7%とする報告が多い(我が国でも、その実態調査が行われてきているが、専門家による詳細な結果は公表されていない)。これらの疾患は、学童期の不注意、多動性、衝動性を特徴とし、成人してからも他人とのコミュニケーションの困難さを有する。いずれも脳の器質的障害と考えられており、社会的に大きな問題となっている。一方、環境化学物質が脳神経系の機能に影響を及ぼす可能性が指摘され始めているが、その詳細については未だ不明なところが多い。発達期にある脳が環境化学物質の影響を受けるのではないかと懸念され始め、PCB 曝露地域の子供の IQ が低いという報告やヒトのへその緒から種々の環境化学物質が検出されたという報告などが状況証拠として取り上げられてきている。そこで、私たちは環境化学物質により脳・神経系の発達障害がもたらされ多動症になりうるかどうかの仮説を上記 Shaywitz らの方法に法って検証することにした。大槽内投与法は実生活での曝露ルートとしては稀なケースであるが、ビスフェノール A やフタル酸エステルなどの環境化学物質は、胎盤や血液脳関門を通過するという事実を考慮し、敢えて原著どおり大槽内投与法を選んだ。環境化学物質が脳内に確実に入った場合の行動レベルへの影響を調べることに焦点を合わせた。

最初に、Shaywitz らの報告を基に実験系を構築した[6]。神経があまり分化しておらず、シ

ナプスも出来つつあるとされている生後 5 日の雄 Wistar 系ラットに 6-水酸化ドーパミン(100 μg)を大槽内投与し、ヒトの学童期に相当する4-5週齢で自発運動量を測定することにより、多動症を判定した。自発運動量は近年開発された Supermex system(室町機械(株))で測定した。防音箱に遠赤外線を利用した温度センサーが備えてあり、これがラットの動きを捉える。主に、移所行動を測定するが、立ち上がりや身繕いもカウントされる。磁場を利用した一昔の測定器よりも格段に安定したものになっている。明暗サイクルは、12 時間ずつにセットし、19 時より暗期にし測定した。夜行性のラットは、暗いところでは活動的で、明るいところではじっとして動かない。そうしたリズムを有している。

測定の結果、6-水酸化ドーパミンは暗期において顕著に自発運動量を亢進することが明らかになった。対照ラットに比べ 1.6 倍から 1.8 倍増加した。明暗のリズムの相には変化は見られなかった。こうして、筆者らの実験系でも Shaywitz らの実験結果が追試しうることが明らかになった。

次に、同様に、ビスフェノール A(20 μg ; 87 nmol 相当)を生後5日の雄ラットに一回大槽内投与し、4-5週齢で自発運動量を測定した。6-水酸化ドーパミンによる多動プロフィールと近似し、暗期 12 時間における自発運動量は、対照ラットに比べ約 1.6 倍増加することが明らかになった[7]。リズムの位相に変化はなかった。体重の増え方にも大きな差は見られない。

更に、ビスフェノール A の用量依存性を検討した。20 ng のビスフェノール A を大槽内投与してもラットの多動症は見られなかった。しかし、200 ng のビスフェノール A を大槽内投与すると有意に多動症が惹起された($p < 0.05$)。2 μg のビスフェノール A の効果は、20 μg のそれと同じだった($p < 0.001$)。従って、ビスフェノール A によるラット多動症は、大槽内投与という方法的アーティファクトでないこと、そして、構築した実験系では 200 ng のビスフェノール A が脳内に確実に入ると多動症が検出可能であることが明らかになった[7]。

以上のようにして、Shaywitz らの方法を用いることによりビスフェノール A はラットにおいて多動症を惹起し得ることが明らかになった。同システムにおいて、固定量(87nmol; 20 μg ビスフェノール A に相当)で他の環境化学物質をスクリーニングした結果、従来から神経毒性が知られているトリブチルチンが陽性であった。また、これまで報告のない μ -ニトロトルエンもラット多動症を引き起こした。一方、アジピン酸、オクタロスチレン、ベンゾヘノン、アミトロール等は陰性であった。現在のところ、環境化学物質の構造と活性との相関性は不明である。

環境化学物質によるラット多動性障害と神経変性

ヒトの多動症は ADHD や自閉症で見られることを述べてきたが、古い初期の記載は、第一次世界大戦後(1918 年)のエコノモ脳炎の子供たちとされる。特記すべきことは、エコノモ脳炎は死亡率が極めて高かったが、一命を取りとめた大人はパーキンソン病症状を呈するようになったということである。つまり、この記載は、子供の多動症にはドーパミン神経系の異常が示唆されること、当時、インフルエンザウイルスが猛威をふるっていたが、エコノモ博士らはエコノモ脳炎の原因をウイルスではなく他に求めた。しかし、原因不明のままこの病気は終焉し

ている。

これまでに、筆者らはビスフェノール A による多動症ラットがアダルト(8 週齢)になった時の免疫染色の結果、黒質カテコールアミン合成酵素の免疫活性が極端に減少することを明らかにしている。この結果は、新生児でのドーパミン神経系の障害が神経変性としてアダルトまで残存していることを示唆している。そこで、神経変性としての神経細胞死の同定を TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling) 法によって調べた。その結果、*p*-*n*-オクチルフェノールやビスフェノール A による TUNEL 陽性細胞が、カテコールアミン合成酵素の免疫交叉性が極端に減少する黒質に認められた。更に、ビスフェノール A (87 nmol) を成熟ラットの一側黒質に微量注入すると投与側ドーパミン神経の退行性変性を認めた。これらの結果は、ビスフェノール A 等の環境化学物質によってエコノモ脳炎に見られる病態が生じることを示唆するものであるが、更に詳細なデータの蓄積が必要と思われる。

多因子性疾患としての多動症

これまで紹介してきた筆者らの知見、すなわち「環境因子である環境化学物質単独によりラットの多動症を惹起しうる。」という事実は大変重要である。というのも、ヒトの ADHD や自閉症は多因子性疾患と考えられてきているからである。遺伝素因と環境因子が絡みあって発症するというものであるが、この場合の遺伝はメンデルの法則に従わないために原因遺伝子の同定は困難を極めている。こうした多因子性疾患のモデル動物は極めて稀であり、次世代のモデル動物として待望されている。したがって、環境化学物質によるラット多動性障害のエピゲノムからのアプローチによりその遺伝メカニズムを解析することは極めて重要になってくる。エピジェネティックスは、細胞世代を超えて継承され、DNA の塩基配列の変化を戸も会わない遺伝様式として広く考えられるようになってきている。受精からはじまる哺乳類の個体発生では、連続的な細胞分裂・増殖・分化を繰り返して最終的に様々な形態や機能を有する細胞へと分化していく。DNA の塩基配列によってコードされた遺伝情報は、一部の例外はあっても、どの細胞でも同じである。しかし、個体が誕生するまでには、それぞれの細胞に必要な遺伝子の発現を活性化し、不必要な遺伝子の発現を不活性化する必要がある。しかも、遺伝子発現の活性化/不活性化状態は細胞世代を超えて継承されなければならない。身体を構成するほぼ全ての細胞において、同じゲノム塩基配列を持ちながら、異なった形質が獲得・発揮され、記憶されていく。

エピジェネテックスな遺伝子発現調節の主なものは、DNA のメチル化、ヒストンのメチル化、アセチル化やリン酸化などが考えられている。最近では、ヒストンのメチル化とリン酸化が同時に重要であるとする 'binary switch 仮説' が提唱されている [8]。

ヒトの脳の発達障害の一つであるレット症候群は、メチル化 DNA 結合タンパク質の一つである MeCP2 (methyl CpG binding protein 2) の遺伝子変異であることが明らか

にされ、DNAメチル化、ひいてはエピジェネティックスの精神神経発達における重要性が示された[9]。遺伝子変異によるMeCP2タンパク質の機能不全が本来の被調節遺伝子の過剰発現を誘導し、これがレット症候群の発症原因と想定されている。

更に、環境の影響が、遺伝子に刷り込まれ調節変化をきたし得るエピジェネティックな遺伝子発現調節が見られるという報告がなされている[10]。母親の子育てが足りないと、特定の遺伝子プロモーター領域のメチル化により脳の遺伝子発現が低下し、その結果、その子供は環境ストレスに弱くなることをラットで報告している。従来、生涯安定と考えられてきたDNAメチル化が、生後比較的短期間にダイナミックに変化し、母親の世話という環境入力があるDNAメチル化を変化させ、DNAメチル化に伴う遺伝子の発現変化が精神状態に影響するということである。家族や他人との接触を含めた生活環境に影響を受ける精神状態が、DNAのメチル化に基づく転写調節に密接に関わっている可能性が示されたことになる。

また近年、環境化学物質の生殖毒性について、エピジェネティックな遺伝様式をとることがラットを用いて報告された。環境化学物質を胎児の精巣発達期に投与し、精子数は減少しているが生殖能力は残っている雄(F1)と同じF1雌を掛け合わせた。これを繰り返しF4まで得、F2～F4の精巣の精子形成能力を調べると明らかな障害が観察された。環境化学物質の投与は、最初の母親(F0)だけである。つまり、最初の母親の投与された環境化学物質による障害は、次々に多世代的に伝えられたことになる。F0～F4のDNAのメチル化状態を調べたところ、F1～F4の雄に限って、DNA上に特定パターンの異常なメチル化が起こったり、これらが原因と考えられた。

このように、私たちの身の回りの環境のみならず環境化学物質それ自身にもエピジェネティックなポテンシャルを有していることが明らかにされた。したがって、環境化学物質による多動性障害も同様にエピジェネティックな様式をとるか否かを明らかにすることは、今後に残された重要な課題である。

参考文献

- [1] Wertheimer N and Leeper E. Electrowiring configurations and childhood cancer. *Am. J. Epidemiol.* 109: 273-284 (1979)
- [2] Stevens RG. Electric power use and breast cancer: a hypothesis. *Am. J. Epidemiol.* 125: 556-561(1987)
- [3] Liburdy RP. ELF magnetic fields, breast cancer, and melatonin: 60 Hz fields block melatonin's oncostatic action on ER⁺ breast cancer cell proliferation. *J. Pineal Res.* 14: 89-97 (1993)
- [4] Ishido M, Nitta H, and Kabuto M.
Magnetic fields (MF) of 50 Hz at 1.2 μ T as well as 100 μ T cause uncoupling of inhibitory pathways of adenylyl cyclase mediated by melatonin 1a receptor in MF-sensitive MCF-7 cells. *Carcinogenesis* 22: 1043-1048 (2001)

- [5] B.A. Shaywitz, R.D. Yager, and J.H. Klopfer.
Selective brain dopamine depletion in developing rats: an experimental model of minimal brain dysfunction. *Science* (1976) 191: 305–308.
- [6] M. Ishido, Y. Masuo, S. Oka, M. Kunimoto, and M. Morita.
Application of Supermex system to screen behavioral traits produced by tributyltin in the rat. *J. Health Sci.* (2002) 48: 451–454.
- [7] M. Ishido, Y. Masuo, M. Kunimoto, S. Oka, and M. Morita.
Bisphenol A causes hyperactivity in the rat concomitantly with impairment of tyrosine hydroxylase immunoreactivity. *J. Neurosci. Res.* (2004) 76: 422–433.
- [8] W. Fischle, Y. Wang and C.D. Allis.
Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. *Nature* (2003) 425: 475–479.
- [9] R.E. Amir, IBV den Veyver, CQ Tran, U Francke and HY Zoghbi.
Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nature Genet* (1999)23: 185–188
- [10] L.C.G. Weaver, N. Cervoni, F.A. Champagne, A.C.D' Alessio, S. Sharma, J. R Secki, S. Dymov, M. Szyf, and M.J Meaney. *Nature Neurosci* (2004)7:847–854.
- [11] M.D. Anway, A.S. Cupp, M. Uzumcu, and M.K. Skinner.
Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science*(2005)308:1466–1469