

環境ホルモン・ノニルフェノールの 細胞障害作用と酸化ストレス

大阪薫英女子短期大学・生活科学科・食物栄養専攻

岡井 康二

CYTOTOXIC ACTION AND OXIDATIVE STRESS BY ENDOCRINE DISRUPTOR, NONYLPHENOL

YASUJI OKAI

Department of Food and Nutrition, Division of Life Science, Osaka Kun-Ei Women's College

Received April 30, 2008

Abstract : 代表的な環境ホルモンであるノニルフェノールがすでに明らかにされている「エストロゲン活性」のほかに微生物の細胞増殖や細胞呼吸に対する阻害作用や炎症細胞の活性化作用を示すことを明らかにし、さらにその作用メカニズムとして活性酸素の生成などのいわゆる「酸化ストレス」を誘導することを明らかにした。そして環境ホルモンの本質を酸化ストレスを誘導する化学物質として理解すると環境ホルモンの毒性評価やその防御方法について新しい研究の視点が得られる事を紹介する。

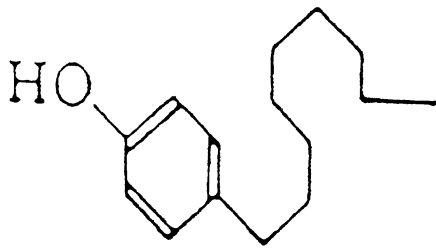
Key words : Endocrine disruptor, Nonylphenol, Oxidative stress, Reactive oxygen species, Cytotoxic action

はじめに

環境ホルモンはよく知られているように1990年代にこれまでの化学物質の毒性概念とは異なる新たな毒性概念として特に米国のコルボーンらの「Our Stolen Future」(奪われし未来)という著作の中ではじめて総括的に提唱された概念である¹⁾。例えばこれまでの毒性概念とは異なり野生動物の繁殖やその行動の異常などの原因が環境中の特定の人工化学物質がそれらの動物の体内において特に生殖ホルモンを始めとする内分泌システムのホメオステシス(恒常性)を攪乱するためであるという考え方から新たな毒性を発現する特定の化学物質を「Environmental Endocrine Disruptor」(外因性内分泌攪乱物質)と名付けた。今日では省略されて「Endocrine Disruptor」あるいは「ED」と呼ばれている。日本では簡略化された呼称として「環境ホルモン」となっている。そして環境ホルモンは野生動物のみならず人の健康や安全に対してもさまざまな影響を与えることが指摘されてきた。日本では、コルボーンらの著作の登場後、当時の環境庁が中心となってそれまでの研究結果から環境ホルモンの作用

をもつと言われていた代表的な人工化学物質約70種をリストアップして環境ホルモンの毒性について国民の注意を喚起した。しかしその後、様々な研究が展開される中で環境ホルモンとされていた化学物質が特にヒトの内分泌システムに対する作用が確認できないとして次々とそのリストから除外されたり、さらに一部の評論家や研究者がこれまでの環境ホルモンの毒性評価はまちがいであったとする議論まで出され、現在、環境ホルモンに関する新たな論争が展開されている。これらの状況の中で、現在、環境ホルモンの毒性を科学的に再評価する必要性が指摘されている。一方、本総説でとりあげるノニルフェノールは他の環境ホルモンと比較するとその毒性も強くその汎用性も広いことから上記の環境庁のリストから除外されなかったが、その毒性を再評価する場合の視点として新しい毒性発現のメカニズムである「酸化ストレス」を介してその毒性が発現する可能性を著者らの研究結果を中心に紹介する。

1. ノニルフェノールの一般的な性質と研究背景
ノニルフェノールを化学構造から見るとオルト・メタ・



Para-Nonylphenol

図1. 環境ホルモン・ノニルフェノールの化学構造

パラ体の3つの異性体が存在するが通常環境ホルモンのノニルフェノールはパラ・ノニルフェノールを指している。図1に示したようにパラ・ノニルフェノールの化学構造はベンゼン環を母核とするフェノール骨格のOH基に対してパラの位置に炭素数9のアルキル基が結合した比較的簡単な構造である。そしてその物理化学的性質として比較的弱い疎水性を示し、水やエタノールにあまり溶解しないがメタノールに容易に溶解する。そして私達の実際の生活の中でノニルフェノールは様々な用途に使用されているが、例えばその代表的な例としてプラスチック製品の安定化や可塑性の目的でいわゆる添加剤として含まれている。このプラスチック中の添加剤のノニルフェノールが環境ホルモンとして認知されるように到った有名な研究としてタフツ大学のソト博士らがポリスチレン製のプラスチックシャーレを使って乳ガン細胞を培養していた所、その増殖必須因子である性ホルモンを添加しないものにもかかわらず細胞が増殖するという現象に出くわし、その原因を追及したところプラスチックシャーレに含まれていたノニルフェノールが培養液中に溶出してそれがいわゆるエストロゲン活性を示した事であった²⁾。またイギリスでは羊毛加工の洗浄剤に含まれていたノニルフェノールが河川に溶出し魚類の肝臓のピテロゲン合成を高めるエストロゲンと同様の作用を示す可能性も指摘された³⁾。そしてメスの妊娠ラットにノニルフェノールを一定量投与するとその胎児の生殖器の異常形成が観察される事も報告されている⁴⁾。さらにノニルフェノールは環境中の水や土壌における残存性が強いいため環境中の生物や水を利用するヒトへの影響が危惧されており⁵⁾現在全国の地方自治体で代表的な環境ホルモンとしてダイオキシンなどとともに環境中のノニルフェノールの濃度の調査(サーベイランス)が定期的に行われている。

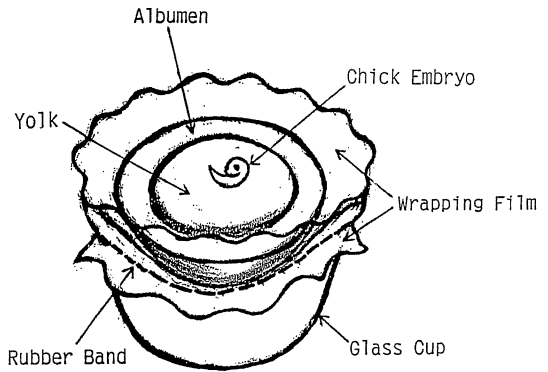


図2. 食品用ラップの毒性を調べるためのニワトリ胚の培養システム

2. 環境ホルモンと食品包装用ラップの毒性

以上の状況の中で著者とノニルフェノールとのかかわりのきっかけは、日常の食生活の中で頻繁に用いられる食品包装用ラップに含まれるノニルフェノールをはじめとする添加剤が動物の胎児の成長にどのような影響をあたえるのかについて調べたことであった⁶⁾。これは約10年前、食品用トレイ、ラップ、カップめんの容器から溶出する添加剤の環境ホルモンについてあまり問題はないとする研究者と非常に問題があるとする研究者の間で論争があったが、著者はおそらく分析に用いる実験系の環境ホルモンに対する感度の差によって判断が異なると考え、化学物質の毒性に対してきわめて鋭敏な時期である動物の受精後の初期発生の時期に添加剤の影響を調べる簡単な方法はないか考えた。そこで、著者が以前米国留学中に固形癌のまわりの血管新生を抑制するドラッグを開発するために用いていたニワトリの胚発生のモデル実験を応用する事を考えた。その方法は図2に示したようにパイレックスのガラスカップを使ってそこに食品包装用ラップを用いてハンモックのようなニワトリ胚のベッドを作る。そこにニワトリの受精卵のカラを除き受精卵全体を注意深くのせてやる。2~3日経過すると胚の心臓の原基となる部分がピクピクと律動を打つようになりそのまわりを細かな血管系のネットワークを形成するようになる。その後血管は太くなりさらに血管系のネットワークが発達してくるが、それと併行して各組織・器官が次々と形成されてくる。そこでこの実験システムの胚のベッドとなる食品用ラップとしてノニルフェノールなどの添加剤を含むポリ塩化ビニル製のラップと無添加

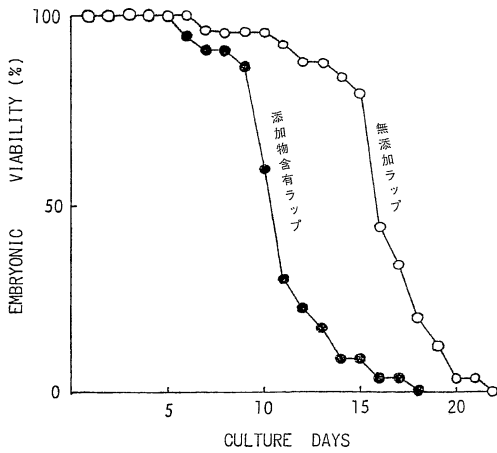


図3. ニワトリ胚に対するポリエチレンラップとポリ塩化ビニルラップの影響
横軸は培養日数、縦軸は生存率、そして白丸、黒丸はポリエチレン(PE)ラップとポリ塩化ビニル(PVC)ラップの生存率を示す。

のポリエチレン製ラップを用いてニワトリ胚の発生・分化の様子を観察して比較した。その結果、図3に示した生存曲線のように添加剤を含むラップの胚は無添加ラップの胚に比べて生存率がかなり低くなった。すなわち培養後2週間後、無添加ラップの胚はほとんど生存しているが添加剤入りのラップの胚はほとんど死亡する。これは添加剤入りのラップを使用した胚の特徴として心臓を中心とする血管系の発達の程度がきわめて不十分であることが観察されたのでこれが主な死亡原因と考え、少なくともプラスチックから溶出する添加剤の環境ホルモンについて受精の初期発生や胎児の時期には特別な配慮や注意が必要であると結論づけた。しかし、この実験システムではノニルフェノールなどの環境ホルモンの毒性発現のメカニズムをクリアーに詳しく解析する事は困難と考え、より単純な実験システムによる分析の可能性をさらに追求した。

2. 微生物に対するノニルフェノールの細胞増殖抑制作用の発見と酸化的ストレス

すでに述べたようにいくつかの研究結果によって環境ホルモンの作用機構のイメージとして次のような考え方が提出されていた。生体中で生殖ホルモンがそのターゲットとなる組織の細胞の膜表面上に存在するホルモンの受容体(レセプター)に結合しそれぞれの細胞が活性化され細胞の分化や増殖が起こるのだが人工化学物質である環境ホルモンがそのレセプターに競合的に結合する事に

よって本来のホルモンの作用が攪乱されたり妨害されるという考え方である。このドグマに対して著者は限られた研究環境の中でどのような研究のアプローチが可能か考えた。その一つのヒントは1980年代にスタンフォード大学のFeldman教授らが提出していた酵母のシステムでエストロゲン様の因子が放出され、それに対するレセプターが酵母に存在する事を示唆したモデルであった⁷⁾。後でこのデータやモデルはかなりあやしい事が他の研究者に指摘されるのだが、著者は約20年以上前に日本の酵母の性遺伝学の草分け的存在であった柳島直彦教授(大阪市立大学・後に名古屋大学)から酵母の機能や生理作用がステロイドやステロールなどによって影響を受けるという話を聞いていた事や以前よりステロイドホルモンの制御システムの進化・系統発生の問題に強い興味もっていたのでこの酵母のモデルを環境ホルモンのアッセイ系に利用しようと考えた。早速、それまでに知られていたプラスチック中の添加剤で代表的な環境ホルモンであるBPA(ビスフェノールA)、DEHP(ジエチル・ヘキシルフタル酸)、NP(ノニルフェノール)と強力な合成エストロゲンであるDES(ジエチルベステロール)などを酵母の培養システムに添加して比べてみた。その結果はFeldmanらの示した研究結果による予想とはまったく異なっており、すべての環境ホルモンは有意の細胞増殖作用を示さなかった。逆に分析した環境ホルモンの中でノニルフェノールが低濃度(μM オーダー)で用量依存的な細胞増殖抑制作用を示した(図4)。その他の環境ホル

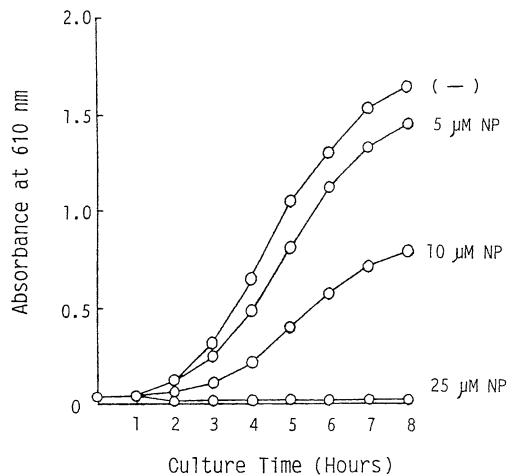


図4. 酵母の増殖に対するノニルフェノールの抑制作用
横軸は、酵母の培養時間、縦軸は細胞数を表す。

モンは有意の抑制作用を示さなかった。そこでノニルフェノールの細胞増殖抑制作用の原因を解析する視点としていわゆる「酸化ストレス」による細胞障害作用を仮定し、いくつかの抗酸化剤を処理しノニルフェノールによる増殖抑制に対する効果を調べた。その結果、ビタミンC(アスコルビン酸)やカテキンなどの水溶性抗酸化剤は非常に弱い効果を示しただけであったが、 β -カロチンやビタミンE(α -トコフェロール)などの脂溶性抗酸化剤が強い抑制防御効果を示した⁹⁾。すなわち環境ホルモン(ノニルフェノール)が酸化ストレスを介してターゲットとなる細胞に障害作用を与えている可能性が示唆された。そこで酸化ストレスのインディケータとして細胞の酸素消費に対するノニルフェノールの効果を酸素電極法により分析したところ、ノニルフェノールは酵母のグルコース依存性の酸素消費を用量依存的に抑制した。さらにビタミンEや β -カロチンなどの抗酸化剤を前処理するとノニルフェノールによる酸素消費の抑制は解除される事が判明した。そこでノニルフェノールの酵母細胞における活性酸素の産生への影響を調べたところ用量依存的に細胞内の活性酸素の産生を高める事が判明した(図5)。さらに細胞における主要な酸素消費の場であり、活性酸素を生産する可能性のある細胞内小器官であるミトコンドリアに対するノニルフェノールの影響を調べるためにミトコンドリアの機能が極度に低下したミュータントの酵母細胞(ρ 細胞)と正常の酵母細胞に対するノニルフェノールの効果を調べたところ正常細胞は障害作用を示したが、ミュータントの細胞は有意の障害作用を示さな

った⁹⁾。これらの結果はノニルフェノールがミトコンドリアなどをターゲットとしたいわゆる酸化ストレスを介して酵母の細胞呼吸や細胞増殖を抑制する事を示している。

次に酵母に対するノニルフェノールの細胞障害作用が他の微生物に対しても同様の作用を示すのか明らかにするためにバチルス属、シュドモナス属、スタフィロコッカス属、マイクロコッカス属などいくつかの種類のバクテリアに対してノニルフェノールを添加して培養したところ酵母と同様の濃度(5~100 μ M)で有意の細胞増殖や細胞呼吸に対する抑制作用が認められた¹⁰⁾。またATP-依存性のプロトン輸送の機能も抑制する事が判明した。

ところが、いくつかのバクテリアを使ってノニルフェノールの作用を調べていた時に理解できない不思議な現象に出くわしていた。それは、大腸菌がノニルフェノールに対して抵抗性を示したことである。他のバクテリアに20 μ Mの濃度のノニルフェノールを添加すると細胞増殖の完全な抑制が認められるのだが、大腸菌だけは何事もなかった様に元気に増殖した。特定の大腸菌の株のみにこの現象が見られるのか調べるために手に入るいくつかの大腸菌株を使って調べてみるとほとんどの大腸菌がノニルフェノールに抵抗性を示す事が判明した。そこでいくつかの文献を調べてみると大腸菌は他のバクテリアに比べていわゆる活性酸素消去酵素の活性が高いという論文に出会った。そこで逆に大腸菌の活性酸素消去酵素の活性が高いという性質を使ってノニルフェノールの細胞障害作用のメカニズムを分析できないか考えた。その時、思い出した事は、以前に発癌剤などの遺伝子障害を与える化学物質の作用メカニズム(どのような活性酸素の種類が遺伝子障害の原因か?)を分析する目的で同志社大学の西岡一教授が活性酸素消去酵素に関してタイプの違う大腸菌のミュータントを遺伝子工学的手法により作成し興味深い成績を発表されていた。すなわち過酸化水素を消去するカタラーゼの遺伝子を欠損した菌株やスーパーオキシド(O_2^-)を消去するSODの遺伝子を欠損した菌株を使って遺伝子障害を起こす発がん物質の作用機構を分析していた。これらの菌株を利用すればどのタイプの活性酸素を介してノニルフェノール障害作用が誘導されるのか明らかになるのではないかと期待をしてこれらのミュータント株と正常の親株を使ってノニルフェノールの細胞の生存率に対する作用を比較したところスーパーオキシドを消去するSODの遺伝子を欠損した株の感受性が最も高い事が判明した。この時点で実験成績をまとめて論文として発表する事を考えたが、西岡先生からいただいた株はある特殊なアッセイ系に用いるた

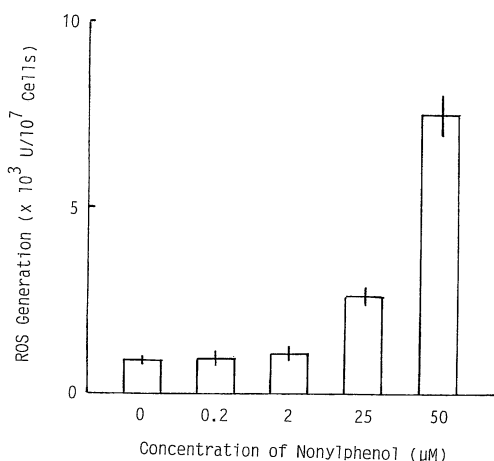


図5. ノニルフェノールによる酵母の活性酸素(ROS)生成・放出
蛍光色素(DCF-DA)を用いてROS量を測定した。

めにそれぞれの株にマーカー遺伝子などを導入していたため投稿雑誌のレフリーからこれらの外来の導入遺伝子の影響についてクレームを受ける可能性があった。そこで実験結果の確実性をさらに高めるために再度、他の研究者から導入遺伝子の影響がない株を供与してもらい同様の実験をした。その結果、図6に示したように正常株やカタラーゼ欠損株と比べるとノニルフェノールはSOD欠損株に対してきわめて高い感受性を示す事が判明した。すなわちノニルフェノールは細胞内でSODのターゲットであるスーパーオキシド(O_2^-)を発生させる事によってその障害作用を発現している可能性が考えられた。実際に正常株とカタラーゼ欠損株とSOD欠損株に対するノニルフェノールの活性酸素の生成量を比較したところSOD欠損株が最も高い生成量を示した¹¹⁾。さらに予想外のラッキーな事としてSOD欠損株の培養系にSODを加えておくとノニルフェノールの傷害作用が抑制されることも判明した。おそらくノニルフェノールにより細胞膜近傍で生成したスーパーオキシドをSODが消去すると考えられた。一方、このようなスーパーオキシドを生成させることによって細胞障害作用を示す典型的な化学物質として農薬のパラコートが知られているが、ノニルフェノールについて著者らが初めて同様のタイプの細胞障害作用を明らかにしたことになる。おそらくこれまで蓄積された膨大なパラコートの毒性発現の

メカニズムを分析した研究結果を参考にして今後より詳しいノニルフェノールの毒性発現のメカニズムの解析が可能になると思われる。例えば酵母のミトコンドリアのどの部位(内膜の電子伝達系など)がノニルフェノールのprimary targetになっているのか今後、詳しい分析を進めることができる。

3. ヒト好中球に対するノニルフェノールの作用と他の炎症性物質との複合作用

すでに述べたようにノニルフェノールが様々な微生物の細胞内に活性酸素(特にスーパーオキシド)を生成させる事によりその毒性作用を発現する可能性を強く示唆するデータが得られたので視点を変えて活性酸素(スーパーオキシドなど)を生成させる能力を高度に発達させた特定の細胞に対するノニルフェノールの効果を検討する事にした。その代表例としてヒト末梢血から好中球を単離しそこにノニルフェノールを添加し活性酸素の生成と放出の様子を調べてみた。まずヒト好中球にノニルフェノールを添加するとかなり低い濃度(数 μM - 数十 μM)で用量依存的に強い活性酸素の生成と放出が観察された¹²⁾。現在までの研究成果によれば好中球の活性酸素の生成・放出は主にスーパーオキシドの場合、細胞膜上のNADPH依存性オキシダーゼの働きによって行われる事が明らかにされているがNADPH依存性オキシダーゼに特異的な阻害剤(DPI)を処理しておくとなニルフェノールによる作用はほぼ完全に抑制された。しかしミトコンドリアの電子伝達系に対する代謝阻害剤(KCN)を処理しても有意の影響はなかった。すなわちヒト好中球の場合ノニルフェノールはミトコンドリアの電子伝達系にあまり影響は与えないが、NADPH依存性オキシダーゼの活性化を行っている事が示唆されたが、その場合細胞外から与えられた刺激(炎症物質やサイトカインなど)がいわゆる「シグナルトランスダクション」と呼ばれる代謝経路を介してその活性化が起こる事が知られている。特にその経路の中心的役割を果たすのが様々なタンパクリン酸化酵素が関与するプロテインキナーゼ・カスケードであるが、これらのタンパクリン酸化酵素のそれぞれに対応する特異的な代謝阻害剤を使ってノニルフェノールによる活性化のメカニズムを分析するとPI3キナーゼ、チロシンキナーゼ、プロテインキナーゼC、p38MAPキナーゼ、ERK MAPキナーゼなどのプロテインキナーゼ・カスケードを介して活性酸素の生成と放出が行われている事が明らかとなった¹²⁾。すなわちノニルフェノールは他の典型的な炎症物質やサイトカインと同様なメカニズムで好中球を活性化する炎症性因

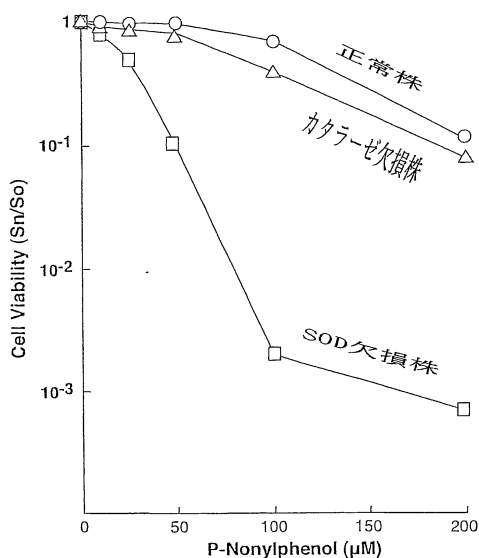


図6. 大腸菌正常株, カタラーゼ欠損株, SOD欠損株のノニルフェノールに対する生存率

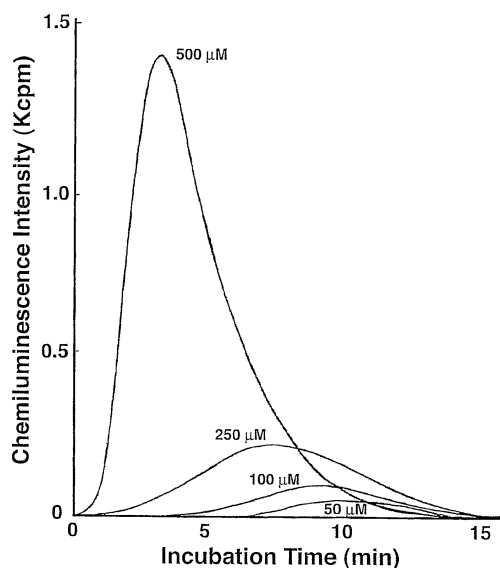


図7. ノニルフェノールによるヒト末梢血の活性酸素の生成・放出
化学発光試薬ルミノールを用いて化学発光量を測定した

子のひとつである可能性が示唆された。

さらに *in vivo* の条件でのノニルフェノールの働き方を知る上で重要と考えられる好中球を含むヒト末梢血に対するノニルフェノールの作用効果を検討した。その結果、ヒト末梢血に対しても活性酸素の生成が行われるが、単離好中球に対するノニルフェノールの作用と比べてノニルフェノールのヒト末梢血に対する感受性はかなり低下した。例えば単離好中球に対して著しい活性酸素の生成・放出が認められる $20\mu\text{M}$ ノニルフェノールは末梢血に対してほとんど生成・放出活性が認められないが、 $50\mu\text{M}$ の濃度で初めて有意の活性酸素の生成が認められ $50\mu\text{M}$ - $500\mu\text{M}$ の濃度で用量依存的な活性酸素の生成・放出が認められる(図7)。しかしその生成量は単離好中球の場合の約40分の1以下である。ところが著者らは典型的な炎症活性化物質であるフォルボールエステルがきわめて微量共存すると末梢血の感受性が高くなりきわめて低濃度(μM)のノニルフェノールが活性酸素の生成・放出を高める事を見いだした(図8)。同様の現象はほかの炎症物質であるザイモザンの場合でも観察されている¹³⁾。この現象は最近注目されている環境ホルモンの複合作用と関係する。これは環境ホルモンがある一定の濃度条件で有意な毒性を示さない場合でも他の環境ホルモンや他の化学物質が微量存在すると複合的な相乗作用を

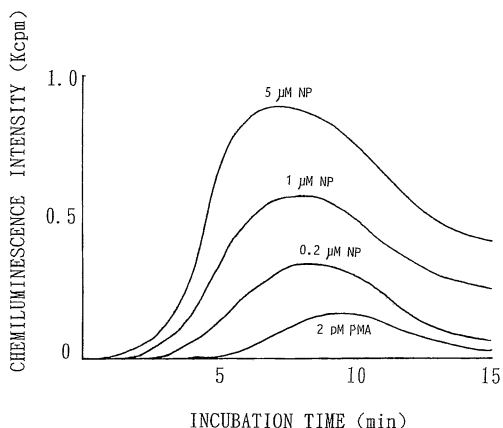


図8. ヒト末梢血の活性酸素の生成におけるノニルフェノール(NP)とフォルボールエステル(PMA)の相乗作用

発現する事が知られている。その典型的な例としてカリフォルニア大学の Grey 教授のグループが明らかにした環境ホルモンのベンツベンジルフタル酸と殺虫剤のリノロンの複合作用の例が有名である。すなわちそれぞれ単独では全く環境ホルモンの毒性が発現しない低濃度の条件下で両者が共存するとラットの胎児の生殖器官の分化において異常な尿道下裂の頻度が増加するという知見である¹⁴⁾。すなわち著者らの研究を含めて以上の研究から明らかになったことは動物実験などで一定濃度の環境ホルモンを単独で投与した場合に有意の影響が見られなかったからといってその環境ホルモンには毒性がないと結論づけるのは以上の知見から考えると早計で不十分な判断といえる。

おわりに

以上環境ホルモンのノニルフェノールに関して従来多くの研究者が報告してきたいわゆるエストロゲン活性以外の微生物の細胞障害作用や炎症細胞の活性化作用について特に「酸化ストレス」の視点から著者らの実験成績を中心に紹介した。環境ホルモンの作用メカニズムを「酸化ストレス」という視点から分析した研究はこれまであまり行われていなかったが、不十分ではあるがいくつかの示唆的な研究がされている。例えば大阪市立大の笠原らはプラスチック製品の添加剤で環境ホルモンであるジエチルヘキシルフタレート (DEHP) がラットの精巢の異常分化を誘導するのは酸化ストレスを介して精原細胞にアポトーシスを誘導して障害作用を与える事が原因である

という報告をしている¹⁵⁾。また東京大学の久保田のグループは、ラット脳でノニルフェノールがフェントン反応によるOHラジカルを生成させる事によってその毒性が発現する可能性を示し、その毒性作用がすでに著者らが明らかにしたシグナルトランスダクションにおけるプロテインキナーゼカスケードを介して起こる可能性をタモキシフェンによる阻害実験で示している¹⁶⁾。

いずれにせよ環境ホルモンの毒性作用の発現メカニズムとして「酸化ストレス」という視点を導入すると環境ホルモンの新しい研究分野が広がることが期待される。例えば大腸菌のミュータントを利用した実験で細胞障害作用に関与する主要な活性酸素はスーパーオキシドであると結論づけたが、話はそこにとどまらない。そのスーパーオキシドはその先どのような活性酸素の反応に結び付くのか？過酸化水素を介してフェントン反応によるOHラジカルの生成をするのか？あるいはまた別の活性酸素であるNOの生成に関与するのか？また酵母の場合はミトコンドリアを介したアポトーシスを誘導するのか？といった問いかけに対して研究するテーマを提供している。これらの問いかけについて現在部分的な解答は用意出来ているがまだまだ不十分な状態である。

さらにこの視点にたてば環境ホルモンの毒性に対する防御法について大切なヒントが得られる。すでに示したようにノニルフェノールの細胞障害作用や炎症細胞の活性化作用をカロチノイドやビタミンなどの脂溶性抗酸化物質やSODやカタラーゼなどの活性酸素消去酵素が抑制するデータを考慮するとこれらの抗酸化成分を多く含む食品を摂取する食生活をすると環境ホルモンの毒性作用が軽減される可能性が示唆される。この点については抗酸化成分を多く含む食材廃棄物の有効利用の観点からノニルフェノールの細胞障害作用に対するいくつかの食材やその廃棄物の防御効果を酵母の培養システムを使ってスクリーニングしたことがある(表1)。その中で非常に防御活性の強かった緑茶から活性本体としてクロロフィル類やフェオフィチン類やカロチノイド類を単離・同定した¹⁷⁾。おそらくこのような研究データが蓄積されれば、食品栄養学の分野で重要と考えられるさまざまな環境ホルモンに対する防御効果を示す食事メニューの提供も可能になると思われる。

本総説ではノニルフェノールがいわゆるエストロゲン活性のほかに微生物の細胞増殖や細胞呼吸に対する阻害作用や炎症細胞の活性化などの多様な作用(Pleiotropic action)を示す可能性を述べたが、これはノニルフェノールのターゲットとなる組織や細胞の分化の程度や特性の違いや生理状態などの違いによって毒性発現の

表1. ノニルフェノールの増殖抑制作用に対する食材廃棄物の抽出液の防御効果

食材廃棄物抽出液	防御活性(%)
米ぬか熱水抽出液	5.3
ミカン乾燥皮熱水抽出液	7.5
ミカン乾燥皮メタノール抽出液	27.0
茶がら熱水抽出液	2.8
茶がらアセトン抽出液	56.1
緑茶熱水抽出液	8.6
緑茶アセトン抽出液	95.4

酵母の増殖活性は細胞初濃度:10⁶ cells/ml, 37 °C, 5 hrsの培養後, Az20nmにて細胞増殖活性を測定した。

防御活性(%) = (25 μM ノニルフェノール + 各抽出液存在下での細胞増殖活性 / ノニルフェノール 非存在下での細胞増殖活性) × 100 %

違いさらにその作用メカニズムの違いが存在すると考えられる。例えば酵母のノニルフェノールによる増殖阻害作用の場合にその毒性発現のターゲットはミトコンドリアである可能性を示すデータを紹介した。しかし好中球の活性化の場合はそのターゲットはミトコンドリアではないことを示すデータを紹介した。この違いは両方の細胞の分化の程度や生理状態などの違いを反映していると考えられる。まず酵母は好気条件では細胞増殖が非常に盛んでエネルギー源としてATPを大量に要求するのでミトコンドリアが非常に発達した細胞である。ところが好中球はほぼ細胞増殖はしないのでエネルギー要求性が異なり解糖系が主要な代謝系でミトコンドリアの発達の程度がきわめて貧弱でありターゲットになり得ない。興味深いことに酵母を低酸素条件にするとノニルフェノールに対して抵抗性を示すようになる(ミトコンドリアが貧弱になる)(未発表)。さらに好中球の活性化を様々なタイプの代謝阻害剤でしらべた結果、NADPH オキシダーゼを活性化する代謝経路のいろいろな部位(いわゆるマルチターゲット)でノニルフェノールが影響を及ぼしている可能性が示されたが^{12,13)}、これはノニルフェノールがある程度の疎水性を示す単純な構造の低分子であるという分子特性から考えると非常に特異性の高いレセプターと結合してその作用を発現するよりもむしろ一定の親和力を有するいろいろな分子群(マルチターゲット)と相互作用をするというイメージが浮かんでくる。(ノニルフェノールに特異的なレセプターを単離したとする研究者もいるが論争がある)いずれにせよノニルフェノールが多

様な作用 (Pleiotrophic action) を示すのは分子自身の化学的特性とターゲットとなる組織や細胞の分化の程度や特性の違いや生理状態などの違いによって多様な毒性発現の作用メカニズムが存在することを示唆している。

またもう一つの重要な視点は環境ホルモンの複合作用の問題である。現在、かつて環境庁が示した代表的な環境ホルモンのリストの中のかなりのものが単独の投与実験で環境ホルモンとしての活性が弱いという事や人への影響が確認できないという理由で削除され、これらの物質を環境ホルモンと考えたのはミスリーディングであったとかそもそも環境ホルモンによる毒性は存在しなかったというようなことを吹聴する自称「環境ホルモンの専門家」がいる。これらの人たちに共通しているのは環境ホルモンの複合作用の問題についての視点がほとんど欠落していることである。現在これらの環境ホルモンについて低濃度の条件で他の化学物質が共存した時の相加作用や相乗作用などのいわゆる複合作用についての研究報告はきわめて少ない。すでに著者が環境ホルモンによる好中球の活性化で示したように特定の環境ホルモンが単独で存在する場合とほかの化学物質と複数共存する場合でその毒性の発現の仕方が異なることはこの分野の研究を進める上でさらに社会的な影響を考える上でもきわめて重要な視点と考えられる。たとえばすでに紹介した添加剤を含むラップを用いたニワトリの胚発生のモデル実験では無添加の場合と比べて極めてはっきりした毒性の違いが示されたが³⁰⁾、特に添加ラップに含まれているフタル酸エステル類の胎児毒性に対する評価が研究者によってかなり違っている。この問題に関して著者はフタル酸エステル類がかつて四肢形成不全の薬害をおこしたサリドマイドと同様の血管系の発達に対する影響を与える可能性をそれぞれの化学構造の相同性から指摘したが³¹⁾、添加ラップに共存しているノニルフェノールによってフタル酸エステル類の血管形成に対する抑制作用を相乗的に高めた可能性があると考えている。

さらに現在大きな社会的問題となっているいわゆるシックハウス症候群や花粉アレルギーやアトピー性皮膚炎などのアレルギー性疾患の原因を考える上で環境ホルモンを含めて非常に低濃度の化学物質が複数存在した場合の毒性についてそれらの疾患の原因を考える上で複合作用の考え方は有効な分析の糸口になると思われる。

また脳科学の分野で子供たちの軽度の発達障害といわれる学習障害 (LD)・注意欠陥多動性障害 (ADHD)・アスペルガー症候群などの発症に脳神経系の発生・分化の過程で環境ホルモンを含めて非常に低濃度の化学物質が複数存在することが関与する可能性がかなり以前から指

摘されていたが³²⁾、まだまだ解明が不十分の状態である。

いずれにせよ環境ホルモンの複合作用の問題を酸化ストレスの視点を手掛かりにしてもう一度全面的に検討し直す必要があるだろう。

謝 辞

本論文で紹介した微生物に関する実験について多くの助言を下された大阪市立大学・理学部・微生物化学研究室の谷口誠名誉教授、田中俊雄教授、町田清隆博士そして好中球の活性化の研究を御指導下された大阪市立大学・医学部・病態生化学研究室の井上正康教授・佐藤栄助講師、笠原恵美子博士、今田伊助博士、さらにこれまで長年にわたり免疫学のご指導と励ましを下さり、さらに今回の総説をまとめる機会を与えていただきました奈良県立医科大学・寄生虫学教室の石坂重昭教授に深く感謝する次第です。

文 献

- 1) Colborn, T., Dumanoski, D. and Myers, J. P. : Our Stolen Future Dutton Inc. New York, USA 1996.
- 2) Soto, A. M., Justicia, H., Wray, J. M. and Sonnenschein, C. : P-Nonylphenol : an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene Environ. Health Persp. **92** : 167-173, 1991.
- 3) Jobling, S. and Sumpters, J. P. : Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: an in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. Toxicol. Aquat. **27** : 361-372, 1993.
- 4) Nagano, T., Saito, Y., Usumi, K., Nakagomi, M., Yosimura, S. and Ono, H. : Disruption of the reproductive system and reproductive performance by administration of nonylphenol to newborn rats. Human Exp. Toxicol. **19** : 284-296, 2000.
- 5) Ahel, M., McEroy, J. and Giger, W. : Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of nonionic surfactants in fresh water organisms. Environ. Pollut. **79** : 243-248, 1993.
- 6) Okai, Y. and Higashi-Okai, K. : A simple estimation method for the embryonic toxicity of plastic wrapping sheets using an egg shell-free culture system of chick embryos. J. Univ. Occup. Environ. Health **21** : 191-198, 1999.
- 7) Feldman, D., Do, Y., Burshell A., Stathis, P.

- and Loose, D. S. : An estrogen-binding protein and endogenous ligand in *Saccharomyces cerevisiae*: possible hormone receptor system. *Science* **218** : 297-298, 1982.
- 8) Feldman, D., Stathis, P. A., Hirst, P. A., Stover, E. R, Do, Y. S. and Kurz, W. : *Saccharomyces cerevisiae* produces a yeast substance that exhibits estrogenic activity in mammalian systems. *Science* **224**, 1109-1111. 1984.
- 9) Okai, Y., Higashi-Okai, K., Machida, K., Nakamura, H., Nakayama, K., Fujita, K., Tanaka, T., Otani, S. and Taniguchi, M. : Protective effect of antioxidants against para-nonylphenol-induced inhibition of cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **185** : 65-75, 2000.
- 10) Okai, Y., Higashi-Okai, K., Machida, K., Nakamura, H., Nakayama, K., Fujita, K., Tanaka, T. and Taniguchi, M. : Protective effects of alpha-tocopherol and beta-carotene on para-nonylphenol-induced inhibition of cell growth, cellular respiration and glucose-induced proton extrusion of bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **187** : 161-165. 2000.
- 11) Okai, Y., Sato, E. F., Higashi-Okai, K. and Inoue, M. : Effect of endocrine disruptor para-nonylphenol on the cell growth and oxygen radical generation in *Escherichia coli* mutant cells deficient in catalase and superoxide dismutase. *Free Rad. Biol. Med.* **37** : 1412-1418, 2004.
- 12) Okai, Y., Sato, E. F., Higashi-Okai, K. and Inoue, M. : Enhancing effect of an endocrine disruptor para-nonylphenol on the generation of reactive oxygen species in human blood neutrophils. *Environ Health Persp.* **112** : 553-556, 2004.
- 13) Okai, Y., Sato, E. F., Higashi-Okai, K. and Inoue, M. : Potentiating effect of an endocrine disruptor, para-nonylphenol, on the generation of reactive oxygen species (ROS) in human venous blood ? Association with activation of signal transduction pathway. *J. Occup. Environ. Health* **29** : 221-233, 2007.
- 14) Hotchkiss, A. K., Parks-Saldutt, L. G., Ostby, J. S., Lambright, C., Furr, J., Veadenbergh, J. G. and Grey L. E. : A mixture of the "antiandrogens" linuron and butylbenzyl phthalate alters sexual differentiation of the male rat in a cumulative fashion. *Boil. Reproduc.* **71** : 1852-1861, 2004.
- 15) Kasahara, E., Sato, E. F., Miyoshi, M., Konaka, R., Hiramoto, K., Sasaki, J., Tokuda, M., Nakano, Y. and Inoue, M. : Role of oxidative stress in germ cell apoptosis induced by di (2-ethylhexyl)phthalate. *Biochem. J.* **365** : 849-856, 2002.
- 16) Obata, T. and Kubota, S. : Formation of hydroxyl radicals by environmental estrogen-like chemicals in rat striatum. *Neurosci. Lett.* **296** : 41-44, 2000.
- 17) Okai, Y. and Higashi-Okai, K. : Protective effects of chlorophyll a and pheophytin a derived from green tea (*Camellia sinensis*) on p-nonylphenol-induced cell growth inhibition and oxygen radical generation in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) *J. Sci. Food Agricul.* **81** : 1443-1446, 2001
- 18) 岡井康二(2002) サリドマイドと環境ホルモンー環境予防医学の過去・現在・未来大阪薫英女子短期大学・研究紀要・37号・p.23-30.
- 19) 黒田洋一郎：脳内攪乱化学物質と脳の発達障害科学, Vol.68, p.582-590, 岩波書店 1998