

- Hormone Receptor Antagonist In vitro, Increases Serum Thyroxine and Alters RC3/Neurogranin Expression in the Developing Rat Brain. *Endocrinology*. 2004, 146(2) 607-12.
- 22) Facciolo RM, Alo R, Madeo M, Canonaco M, Dessi-Fulgheri F.: Early cerebral activities of the environmental estrogen bisphenol A appear to act via the somatostatin receptor subtype sst (2). *Environ Health Perspect*. 2002 Jun; 110 Suppl 3:3970402.
- 23) Gursoy E, Cardounel A, Kalimi M.: The environmental estrogenic compound bisphenol A exerts estrogenic effects on mouse hippocampal (HT-22) cells: neuroprotection against glutamate and amyloid beta protein toxicity. *Neurochem Int*. 2001, 38(2):181-86.
- 24) Aoshima H, Hossain SJ, Imamura H, Shingai R. Effects of bisphenol A and its derivatives on the response of GABA(A) receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2001, 65(9):2070-7.
- 25) Nakazawa K, Ohno Y. Modulation by estrogens and xenoestrogens of recombinant human neuronal nicotinic receptors. *Eur J Pharmacol*. 2001, 430(2-3):175-83.
- 26) Negishi T, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y.: Inhibition of staurosporine- induced neuronal cell death by bisphenol A and nonylphenol in primary cultured rat hippocampal and cortical neurons. *Neurosci Lett*. 2003, 19:353(2):99-102.
- 27) Yoneda T, Hiroi T, Osada M, Asada A, Funae Y. : Non-genomic modulation of dopamine release by bisphenol-A in PC12 cells. *J Neurochem*. 2003, 87(6): 1499-508.
- 28) Seiwa C, Nakahara J, Komiyama T, Katsu Y, Iguchi T, Asou H. : Bisphenol A exerts thyroid-hormone-like effects on mouse oligodendrocyte precursor cells. *Neuroendocrinol*. 2004, 80(1): 21-30.
- 29) Yoshihara S, Mizutare T, Makishima M, Suzuki N, Fujimoto N, Igarashi K, Ohta S. Potent estrogenic metabolites of bisphenol A and bisphenol B formed by rat liver S9 fraction: their structures and estrogenic potency. *Toxicol Sci*. 2004, 78(1):50-9.
- 30) Volkel W, Colnot T, Csanady GA, Filser JG, Dekant W. Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol*. 2002, 15(10):1281-7.
- 31) Kurebayashi H, Harada R, Stewart RK, Numata H, Ohno Y., Disposition of a low dose of bisphenol a in male and female cynomolgus monkeys. *Toxicol Sci*. 2002, Jul;68(1):32-42.
- 32) Kurebayashi H, Betsui H, Ohno Y. Disposition of a low dose of 14C-bisphenol A in male rats and its main biliary excretion as BPA glucuronide. *Toxicol Sci*. 2003, 73(1):17-25.

- 33) Domoradzki JY, Thornton CM, Pottenger LH, Hansen SC, Card TL, Markham DA, Dryzga MD, Shiotsuka RN, Waechter JM Jr.: Age and dose dependency of the pharmacokinetics and metabolism of bisphenol a in neonatal sprague-dawley rats following oral administration. *Toxicol Sci.* 2004, Feb;77(2):230-42.
- 34) Zalko D, Soto AM, Dolo L, Dorio C, Rathahao E, Debrauwer L, Faure R, Cravedi JP. Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice *Environ Health Perspect.* 2003, 111(3):309-19.

D. 考察

厚生労働省は平成 10 年 4 月より「内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会」を通して、本テーマに関する検討を進め、これまで中間報告とその補追を公表してきた。これまでの検討を元にとりわけ健康影響評価上重要なテーマである低用量影響問題に一定の決着を目指している。

内分泌かく乱化学物質について NTP が低用量影響評価ワークショップを開催、翌年欧州でより小規模なワークショップが持たれたが、低用量影響問題について最終的な決着は見られていない。今回の試みはビスフェノールAをひとつの材料としてひとつの結論を導こうとする重要な位置づけにあり、科学的な裏づけを持ち説得力のあるものでなければならない。最近、BPA は弱いエストロゲン様作用、抗アンドロゲン様

作用、抗甲状腺ホルモン様作用のほかに弱いエストロゲン様作用では説明できない作用があり、胎生期、授乳期暴露による免疫系や神経系への影響があるとの報告が急増している。本研究では特にその点に着目してレビューを行った。これらの中には低用量での影響を示唆するデータも見られ、さらに慎重な検討が必要と考えられた。ER または AR 経由の直接エストロゲンやアンドロゲンが関与する生殖系への BPA によるヒトへの影響の生物学的な蓋然性は低いと考えられるが、エストロゲン非存在下の ER とアрилヒドロカーボンレセプター (AhR) とのクロストークによるエストロゲン作用の発現、さらには ER 経由直接といえない BPA による免疫・神経行動影響など高次生命系の関与を示唆するいくつかの注目すべき知見が集積されつつあり、また無影響量レベルのエストロゲン物質の複合曝露による作用の検出など、それら作用の生物学的な意義とともに、低用量による影響として有意であるか否かと含めて詳細な検討が必要となっている。

E. 結論

内分泌かく乱化学物質候補のひとつとしてあげられているビスフェノールAにつき低用量影響問題に関してデータに基づいた評価が行える好個の材料として、文献的な評価を行った。あわせて関連研究の推進と外部による検証の支援の一助として、評価情報をデータベースにまとめた。ここ数年神経系への影響、それも胎生期、授乳期暴露についての報告が急増している。他方、生殖器系への影響としては低用量作用を否定する論文が増えている。最近の評価とし

て、1)BPA には弱いエストロゲン様作用、抗アンドロゲン様作用、抗甲状腺ホルモン様作用、従来の弱いエストロゲン様作用では説明できない作用があり、2)肝臓等における中間代謝産物は BPA そのものよりも強いエストロゲン様活性を有する可能性があり、3)サルはラットにくらべ経口由来の BPA の吸収能力が高いという知見もあるが、ヒトの通常の曝露濃度ではリスクは低いと考えられる。4) OECD で試験法が標準化され文献的にもっとも数多く低用量作用が議論される子宮肥大試験ではエストロゲン様以外の作用を検出することは難しく、神経系の影響など他のアッセイ系による影響評価も今後検討の課題となりうるだろう。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文・図書発表

- 1) Sekizawa J, Tanabe S.: A comparison between integrated risk assessment and classical health/environmental risk assessment: emerging beneficial properties, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2004, 197 (3) 144.
- 2) 関澤 純 (2004) 第 5 章環境ホルモンのヒトへのリスク、「環境ホルモンの基礎と最前線—水環境を中心に—」技報堂出版
- 3) 関澤 純編 (2004) 「化学物質とインターネット情報」化学工業日報社
- 4) 関澤 純 (2004) 第 4 章リスクコミュニケーションとは何か、「食品のリスクアナリシス」オーム社

2. 学会発表

- 1) Sekizawa J, Tanabe S.: A comparison between integrated risk assessment and classical health/environmental risk assessment: emerging beneficial properties, 10th International Congress of Toxicology, Tampere, Finland, July 2004
- 2) 中村友紀、林昭彦、渡辺美佳子、山本裕史、宮入伸一：ラット尿中インディルビン濃度の雌雄比較、日本内分泌かく乱化学物質学会第 7 回研究発表会、名古屋、2004 年 12 月
- 3) 妹尾明子、吉川麻奈美、山本裕史、関澤 純、井藤和人：河川中生物膜による界面活性剤の浄化能の評価、日本内分泌かく乱化学物質学会第 7 回研究発表会、名古屋、2004 年 12 月
- 4) 林 昭秀、山本裕史、関澤 純：医薬品の水環境中における挙動・分配、2004 年度水環境学会研究発表会、千葉、2005 年 3 月
- 5) 中村友紀、渡辺美佳子、山本裕史、関澤 純、近藤卓也、河辺聖、平井慈恵、たたら坂典久：医薬品 (Fluoxetine) のヒメダカによる生物濃縮係数、2004 年度水環境学会研究発表会、千葉、2005 年 3 月

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

表 4 A 生殖系への影響 (生体レベル)

対象	投与経路と濃度	影響	影響観察濃度	注	引用	文献番号
ラット S D	混餌: 0.001-500 mg/kg/日	最小影響量で体重増加	NOEL: 50 mg/kg/日	3 世代試験	Tylら (2002)	4
ラット S D	混餌: 0.2-200 μg/kg/日	成熟・生殖に影響なし	NOEL: 200 μg/kg/日	2 世代試験	Emaら (2001)	5

表 4 B 免疫系への影響 (生体レベル)

対象	投与経路と濃度	影響	影響観察濃度	注	引用	文献番号
マウス NZB/NZW	混餌 2.5 μ gBPA/kg/日	蛋白尿発症の遅延、ConA刺激脾細胞 分泌INF- γ 減少	2.5 μ gBPA/kg/日	自己免疫疾患lupus症徴自然発症モデルマウス	Sawaiら (2003)	6
マウス	皮下投与 0.5, 5 mg/kg	非特異的な生体防御能低下	NOEL: 0.5mg/kg	腹腔内に大腸菌K-12株接種時の排除能	Sugita-Konishiら (2003)	7
マウス	腹腔: 25mgBPA/kg 隔日3回投与	IL-4産生促進、血中抗原特異的IgE抗 体増加	25mgBPA/kg	10 mg/kg経口投与時の血中濃度の約 150~700倍に相当	Leeら (2003)	8

表 4 C 神経・行動への影響 (生体レベル)

対象	投与経路と濃度	影響	影響観察濃度	注	引用	文献番号
ラット	胎児・乳児期 30 μg/kg/日	雌で open-field behavior の活発化、脳内 locus coeruleus (LC) volume の増加	30 μg/kg/日	LC 内のニューロン数の雌雄差逆転、性行為頻度の低下	Kuboら (2003)	11
ddYマウス	交配時から離乳時まで混餌投与: 0, 0.002, 0.5, 2mg/g food	methamphetamine による conditioned place preference	200 μg/kg/day 相当	methamphetamine 誘発活動量増加の増強、連続投与による依存性増強	Suzukiら (2003)	12
雌 CD-1 マウス	胎生期 (GD14-18) および妊娠期 (GD14-18): 10 μg/kg/日	哺乳、巣作り、休憩、身繕い、巢外活動、および摂餌・水	10 μg/kg/日	育仔行動 (PND2-16): 仔に接する時間の低下	Palanzaら (2002)	13
雌マウス	交配時から乳児期まで混餌投与: 0.002, 0.5, 2 mg/kg food	無影響レベルのモルヒネとの併用による嗜好影響および過剰運動の量依存的な変化	?	中枢のドパミン生成システムの発達に影響を推定	Mizuoら (2004)	14
ラット Wistar	成熟、灌流 BPA を含む人工唾液を	OH ラジカルの発生状況を観察	最高濃度 10 μM	変化なし	Obataら (2004)	15
ラット F344 雌雄	生後 1-5 日皮下投与: mg オオダマ	思春期、成熟期に神経内分泌系を介したエストロゲン様のかく乱	mg オオダマ?	雌雄で ER 受容体を介した反応が異なる	Khuranaら (2000)	16
ラット SD	混餌: 0.2 - 200 μg/kg/日	運動機能発達 (reflex test) に影響なし	NOEL: 200 μg/kg/日	2 世代試験	Emaら (2001)	5
ラット 卵巣切除	皮下投与: 400 μg/kg/日	PR 発現は濃度依存的有意に増加、E2 + progesterone で正常な性行為はなく拒絶行為が主	400 μg/kg/日	視床下部 PR system を介し性行為に影響を及ぼすことを示唆	Funabashiら (2003)	17
ラット	交尾から 離乳期まで 40 μg/kg	出生後 35-45 日に仔ラットの novelty seeking と 70 日以降に行動 (impulsivity) と覚せい剤への反応試験	40 μg/kg	成熟期雄の衝撃行動能・覚せい剤反応低下、交感神経系障害による雌の雌化	Adrianiら (2003)	18
ラット	妊娠 15 日から 生後 10 日まで: 60, 600, 3000 ppm を soy free の餌に混餌投与	出生後 3, 11 週下垂体ホルモンの LH, FSH, prolactin に変化なし	最高濃度 3000 ppm 餌中	変化なし	Masutomiら (2004)	19
雌羊 6 頭	4 週令週 2 回連続 7 週間筋注 3.5 mg/kg, 5 週後卵巣切除	術後 2 週目、15 分毎 6 時間採血 LH 濃度, amplitude, frequency 低下	3.5 mg/kg	思春期以前暴露が gonadotrophin 分泌に影響だが筋注のため普遍性は低い	Evansら (2004)	20
ラット SD	妊娠 6 日 - 出生後 21 日まで経口投与: 1, 10, 50 mg/kg/日	新生仔 (PND4, 8, 15, 35) 血漿中 T4 上昇 TSH 影響なし。PND16 海馬甲状腺ホルモン依存遺伝子 RC3/Neurogranin の mRNA 発現上昇	1 mg/kg/日	海馬で TRβ 特異的アンタゴニストとしてネガティブフィードバックかく乱?	Zoellerら (2004)	21
妊娠ラット SD	妊娠直前から PND23 まで 40, 400 μg/kg/日	PND10 で低結合タイプ sst2 活性が海馬歯状回、扁桃基底内側核で低下、海馬 CA1 放射状網状層で上昇、高結合タイプ sst2 活性は視床下部室傍核で上昇	400 μg/kg/日	脳機能発達への影響の有無という点では非常に興味深い記述に不確かな点が多い	Faccioloら (2002)	22

表 4 D 吸収・代謝・分布・排泄

対象	試験法など	影響の内容	影響観察濃度など	注	引用	文献番号
yeast two-hybrid reporter gene assay	ラット、ヒト、サルやマウス肝臓から得たS9分画で処理	活性増強の要因と考えられる分子はLC/MSで4-methyl-2,4-bis(p-hydroxy phenyl) pent-1-ene (MBP)と同一	BPAより強いエストロゲン活性	BPAよりも数倍〜1,000倍強いエストロゲン活性	Yoshiharaら (2004)	29
男女3人 (詳細実験では男4人)	重水素置換BPA (5 mg) を経口投与	96時間までにグルクロン酸抱合体 (g1c-BPA)のみが血液、尿中に検出、BPAは検出限界 (尿6 nM, 血液10 nM) 以下	g1c-BPAのT _{max} は80分後、C _{max} は800 nM。血液中のBPA半減期は6時間以内	g1c-BPAの腸肝循環があるラットではBPAのクリアランスが遅いがヒトではBPAはすぐに抱合され排泄される	Volkelら (2002)	30
カニクイザル	14C-BPAを0.1mg/kg経口、または静脈内投与	79-86%の放射活性は投与後7日間の尿で検出、24時間でほぼ全てを回収。投与後7日間の糞中放射活性は全体の1.8-3.1%	48時間までの血中動態は経口：C _{max} =104-107 ng·eq/mL, AUC=244-265ng·eq·h/mL。静脈内AUC=377-382 ng·eq·h/mL。経口bioavailabilityは0.66-0.7	血中半減期は経口に比し静脈内投与が長い。静脈内投与第1相半減期は0.61-0.67h。未変化BPA半減期はオスよりメスが短かい。血中代謝産物はmonoとdi-glucuronide抱合体で未変化BPA1.5%以下	Kurebayashiら (2002)	31
ラット (オス) F344	0.1mg/kgの濃度で経口または静脈内投与	排出経路は尿よりも糞であり、経口投与の場合は45-50%、静脈内投与の場合は58-66%が胆汁から排出	BPAの血中半減期は経口の場合44.5 hr、静脈内投与の場合39.5 hr、経口のT _{max} は0.38 hrで経口のbioavailabilityは0-6hr、0-48hrで0.54, 0.86	サルは糞より尿に排泄、ラットは主に糞に排泄する、ラットでBPAは主に肝臓でグルクロン酸抱合を受け胆汁に排泄され腸肝循環	Kurebayashiら (2003)	32
ラット生後4,7,21日と11週令 (1 or 10 mg/kg) 11週令 (10mg/kg)	強制経口投与生後4,7,21日	生後4,7,21日ではBPAからBPAGの代謝が加齢とともに高まるが新生児期はBPA代謝が劣る	1 mg/kg 投与で血漿中放射活性の94-100% BPAGに代謝、10 mg/kg では13種の代謝物確認	BPAGとBPAの血液中濃度が11週令に比し生後4,7,21日で高く肝機能発達の未熟さによる	Domoradzkiら (2004)	33

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

内分泌かく乱化学物質のモデル化合物としてのビスフェノール A に関する
低用量影響論文調査研究

分担研究者 井藤悦朗 宇部興産株式会社 環境安全部

研究要旨

ビスフェノール A (BPA) は化審法の既存化学物質で、弱いエストロゲン作用を有する代表的な環境化学物質である。Medline データベースには 2000 年以降、毎年 400 報におよぶ原著論文、総説、レター等に取り上げられている。2004 年度は 200 報余りの論文の書誌事項のデータベースをエクセルファイルで作成した。実験動物（ラット・マウス）における低用量曝露の中枢神経系への形態学的、機能的影響を示唆する論文発表、学会発表が行われている。今後とも中枢神経系への影響のメカニズム解明のために BPA に関する公表論文のモニタリング、内容の精査は必要であろう。

A. 研究目的

ビスフェノール A (BPA) は「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」（化審法）が制定される以前に国内外で流通していた化学物質いわゆる既存化学物質の一つである。この物質はその開発の経緯から弱いエストロゲン作用を有することが知られている代表的な環境化学物質の一つである。この物質を内分泌かく乱化学物質のモデル化合物として選択し、この物質の低用量曝露の生物学的影響に関する論文のフォローアップを目的とする。

B. 研究方法

医学・生物科学に関する原著論文・総説等の文献データベースである Medline

から「bisphenol a」をキーワード入力して検索される文献数をモニターし、内分泌かく乱の観点から研究されていると思われる原著論文等を選別し、要旨を含む書誌事項のデータベースをエクセルファイルで作成する。また、神経影響に関しては国際的に最も規模の大きい北米神経科学年会に注目して調査した。

C. 研究結果

平成 16 年度 4 月上旬から Medline において経時的に検索した結果、11 月末現在、[bisphenol a]のキーワード入力により検索される論文数は 3237 であった。要旨を含む書誌事項のデータベースには 200 余りの論文をピックアップしている。

表 1 には 2000 年から 2004 年までの 1

月及び 10 月末時点でのヒット件数を示している。2000 年 10 月から 2001 年 10 月までの間は 300 強であるが、その後は年間、400 前後の論文数の増加を示している。

表 1

2000 年 1 月	1 5 1 5
2000 年 10 月	1 6 3 9
2001 年 10 月	1 9 5 2
2002 年 10 月	2 3 3 1
2003 年 1 月	2 4 1 6
2004 年 1 月	2 8 9 9
2004 年 10 月	3 1 9 1

Medline データベースには「bisphenol a」を論文の題名、要旨に含む総説、原著論文、レター等は毎年、400 前後収集されているようである。2004 年度では検索された論文の内容については精査していないが、タイトル、要旨の内容から内分泌かく乱、低用量影響、環境影響などの観点に主眼を置いて研究された論文が 200 前後蓄積されている。この傾向はここ 2-3 年継続している。また、北米神経科学 2004 年会では 6 つの発表がなされていた。これらは継続研究が 3 報、新規な発表が 3 報であった。いずれも、論文での公表を準備しているとのことであった。

D. 考察

2002 年の検索ではヒト血中濃度、尿中濃度など体液中の BPA 濃度がいくつかのグループから発表されたことから、ppb レベルでの曝露が推定された。その結果、

このレベルで実験動物に曝露し神経影響、行動影響に関する研究報告がなされた。報告された内容から、ラットでの性的 2 型性を示す中枢神経系の神経核への影響は用量依存的であること、マウスでは胎生期曝露により覚せい剤やモルヒネ等の依存性を形成しやすい物質への反応が過敏になる、など中枢神経系への形態学的、機能的な低用量影響が示された。また、影響のメカニズムにも言及されており、次年度以降も継続的な論文発表のモニタリングと文献調査が必要である。

2000-2004 にかけて公表された BPA に関する 200 報足らずの論文内容について BPA 論文調査小委員会（関澤純先生班長とする構成員 13 名による）を組織して精査した。本案件については別途詳細が報告される（印刷・製本中）。

E. 結論

Medline データベースには[bisphenol a]を論文のタイトル、本文中に含むドキュメントが 2000 年以降毎年、ほぼ 400 報蓄積されている。論文の内容を十分に精査していないが、そのうち、200 報程度が内分泌かく乱関連の報告と思われる。2004 年度は 200 報余りの書誌事項をエクセルファイルとして作成した。実験動物に対する低用量曝露の影響が中枢神経系において用量依存的に形態学的にもまた機能的にも認められると報告されている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

天然の AhR リガンドの存在量と作用メカニズムに関する調査研究

分担研究者 松井三郎 京都大学地球環境学 教授

研究要旨

天然の AhR リガンドの存在量とその生理活性（特に細胞周期への影響）の作用メカニズムについて文献調査を行った。また、実験的な検討も行った。実験的検討では、食品中の新規 AhR リガンドの単離精製を試みた。また、天然の AhR リガンド、インディルビンを LC/MS/MS を用いて定量する系を開発した。AhR が細胞周期に影響を与えるメカニズムとして CDK 阻害タンパクの誘導、RB との結合、NF κ B との相互作用などが明らかになりつつある。緑茶、ウーロン茶、コーヒー、リンゴジュース、トマトジュース中には複数の AhR リガンドが存在していた。また、インディルビンの LC/MS/MS を用いた定量方法を開発した。定量限界は 10pg/ml 程度であった。

A. 研究目的

天然の AhR リガンドの存在量とその生理活性の作用メカニズムを明らかにすることを目的とする。昨年度の研究で天然の AhR リガンドについてまとめた。今年度は、天然の AhR リガンドの存在量と生理活性の作用メカニズムについて明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

天然の AhR リガンドの存在量とその生理活性（特に細胞周期への影響）の作用メカニズムについて文献調査を行った。また、実験的な検討も行った。実験的検討では、食品中の新規 AhR リガンドの単離精製を試みた。また、天然の AhR リガンド、インディルビンを LC/MS/MS を用

いて定量する系を開発した。

C. 研究結果

AhR が細胞周期に影響を与えるメカニズムとして CDK 阻害タンパクの誘導、RB との結合、NF κ B との相互作用などが明らかになりつつある。緑茶、ウーロン茶、コーヒー、リンゴジュース、トマトジュース中には複数の AhR リガンドが存在していた。また、インディルビンの LC/MS/MS を用いた定量方法を開発した。定量限界は 10pg/ml 程度であった。

【文献調査】天然の AhR リガンドの存在量に関する定量的な研究論文は見当たらなかった。AhR が細胞周期に影響を与えるメカニズムについては、CDK 阻害タンパク質の p16, p21, p27 などの誘導、RB

タンパク質との結合による阻害が以外にも、NF κ B との相互作用による細胞周期の調節機構が明らかになりつつある。

【食品中新規 AhR リガンド】身近な飲料である緑茶、ウーロン茶、コーヒー、リンゴジュース、トマトジュース中に AhR リガンドが存在するかどうか調査した。これらのブルーレーヨン抽出物中にはいずれも AhR リガンド活性が認められた。HPLC で分画し、バイオアッセイを行った結果、緑茶、コーヒー、リンゴジュースには少なくとも2種類以上の AhR リガンドが存在することが明らかとなった。現在このリガンドの単離精製をすすめている。

【インディルビン定量方開発】天然の AhR リガンドであるインディルビンを定量するため、インディルビンの ¹³C 標識体を内部標準として、LC/MS/MS で定量する系を開発した。定量限界は 10pg/ml 程度であった。

D. 考察

食品中の AhR リガンドの存在量に関する定量的な検討はほとんど行われていなかった。また、それらの代謝・解毒作用に関する文献もインディルビンと FICZ に関するもの以外は見当たらなかった。今後、これらの研究を行う必要がある。そのとき今回開発したインディルビンの定量方法が役立つと考えられる。LC/MS/MS による定量限界は 10pg/ml 程度と極めて感度がよく、血清中の濃度を十分測定しうる感度であった。

E. 結論

AhR リガンドは広い範囲の食品中に普遍的に存在しているようである。しかし、そのリガンドの化学構造や食品中の存在量に関してはほとんど情報がなく、今後の研究が必要である。AhR が細胞周期に影響を与えるメカニズムは CDK 阻害タンパクの誘導、RB との結合などがある。CDK 阻害タンパクの誘導には、様々な相互作用が存在するらしい。現在 AhR と NF κ B との相互作用について明らかにしつつある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- ◎ Kawanishi M, Takamura-Enya T, Ermawati R, Shimohara C, Sakamoto M, Matsukawa K, Matsuda T, Murahashi T, Matsui S, Wakabayashi K, Watanabe T, Tashiro Y, Yagi T: Detection of genistein as an estrogenic contaminant of river water in Osaka, *TOXICOLOGY AND APPLIED PHARMACOLOGY* 197, 238-238, 2004
- Yasui M, Suzuki N, Miller H, Matsuda T, Matsui S, Shibutani S: Translesion Synthesis past 2'-Deoxyxanthosine, a Nitric Oxide-derived DNA Adduct, by Mammalian DNA Polymerases, *J. Mol. Biol.*, 344, 665-674, 2004
- ◎ Sugihara K, Kitamura S, Yamada T, Okayama T, Ohta S, Yamashita K, Yasuda M, Fujii-Kuriyama Y, Saeki K, Matsui S, Matsuda T: Aryl hydrocarbon

receptor-mediated induction of
microsomal drug-metabolizing enzyme
activity by indirubin and indigo,
Biochem. Biophys. Res. Commun.,
318, 571-578, 2004

© Adachi J, Mori Y, Matsui S, Matsuda
T: Comparison of Gene Expression
Patterns between 2,3,7,8-

tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and a
Natural Arylhydrocarbon Receptor
Ligand, Indirubin, *Toxicol. Sci.*, 80,
161-169, 2004

H. 知的所有権の取得状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

低用量 estrogenic chemicals による前立腺重量、発育などに対する影響に関する研究

分担研究者 杉村芳樹 三重大学医学部 泌尿器科学講座 教授

研究要旨

エストロゲン暴露による前立腺の異常増殖機構解明に向けて、発生生物学的手法を中心とした解析を試みる。今回の検討では、マウス前立腺上皮由来細胞株 mPr を用いた in vitro 細胞増殖試験と、マウス前立腺の腺管分枝構造を解析する無血清器官培養法を用いた。エストロゲン (10^{-11} – 10^{-9} M)、TGF α (0.1–10ng/ml) は、mPr の細胞増殖率を濃度および時間依存的に上昇させた。器官培養法では、エストロゲンによる扁平上皮化生の誘導に伴う TGF α の過剰発現を確認した。また、TGF α 単独でもエストロゲンと同様の扁平上皮化生を誘導した。マウス前立腺における扁平上皮化生は、エストロゲンが TGF α の発現を誘導した結果、過剰量の TGF α が病変を誘導している可能性が示唆された。

A. 研究目的

エストロゲン暴露による前立腺の異常増殖機構解明に向けて、発生生物学的手法を中心とした解析を試みる。すなわち、前立腺上皮の分化・増殖、腺管分枝形態発生の機構を上皮-間質の相互作用という観点から、in vitro の実験系で明らかにする。

B. 研究方法

1) マウス前立腺上皮由来細胞株 mPr を用いた in vitro 細胞増殖試験。2) マウス前立腺の腺管分枝構造を解析する無血清器官培養法。すなわち、我々が確立した無血清器官培養法とは、マウス前立腺を実体顕微鏡下にて微小解剖し、無血清培養液上に浮かべたフィルターに組織を乗せて一定時間の培養を行う。無血清培養液に添加され

た薬物（ここではエストロゲンもしくは TGF α ）はフィルターを隔てた前立腺組織を直接的に刺激するため、形態学的な変化が観察できる実験手技である。

（倫理面への配慮）

本研究では、やむを得ず実験動物を使用した。その使用数は最小限にとどめ、当大学の実験動物取り扱い倫理規定に準拠し、十分な配慮を行った。

C. 研究結果

エストロゲン (10^{-11} – 10^{-9} M)、TGF α (0.1–10ng/ml) は、mPr の細胞増殖率を濃度および時間依存的に上昇させた。器官培養法では、エストロゲンによる扁平上皮化生の誘導に伴う TGF α の過剰発現を確認した。また、TGF α 単独でもエストロゲンと同様

の扁平上皮化生を誘導した。すなわち、*in vitro* 細胞増殖試験では48時間の処理により、エストロゲンが121.1%、TGF α が152.0%の増加率を示した。このとき、ジヒドロテストステロンは何ら影響を示さなかった。一方、無血清器官培養法では、成長後のマウス前立腺を微小解剖し、エストロゲン (10^{-8} M) の影響を検討した結果、時間依存的に扁平上皮化生を誘導し、そのとき TGF α が過剰発現していることを免疫染色法により明らかとした。また、本培養法において、エストロゲンによる扁平上皮化生の誘導はサイトケラチン14 (CK14) の発現を特徴とする基底細胞の過増殖と、サイトケラチン10 (CK10) の発現により特徴づけられる扁平上皮細胞への分化という2つの作用を持つことが示された。さらに、エストロゲンの代わりに TGF α (20ng/ml) 単独でマウス前立腺を処理した場合もエストロゲンと同様に CK14, CK10 陽性の扁平上皮化生を誘導した。

D. 考察

アンドロゲン依存性副生殖腺である前立腺の発生・分化にはアンドロゲンが必要不可欠であるが、単純に、アンドロゲン受容体との結合により発現するアンドロゲン依存性因子だけが前立腺の成長に関わっているのではなく、上皮と間質細胞の間で交わされるシグナル伝達（上皮-間質の相互作用）が重要であることは広く知られている。今回、マウス前立腺上皮由来細胞株 mPr がジヒドロテストステロンの刺激に反応しなかったのは、上皮細胞の増殖にはアンドロゲン受容体を

介した刺激よりも間質細胞からのパラクリン的なシグナル伝達が重要であることを意味している。逆に、エストロゲンが上皮細胞の増殖率を上昇させた理由として、エストロゲン受容体との結合を介して発現するオートクリン的な増殖促進因子が関与していると考えられた。その1つが TGF α である。

TGF α は Epidermal Growth Factor (EGF) や Keratinocyte Growth Factor (KGF) と同様に前立腺上皮細胞の増殖を刺激することが知られている。無血清器官培養実験において明らかとなった、エストロゲンによる TGF α の過剰発現および扁平上皮化生の誘導が基底細胞に限られている点が非常に興味深い。これはマウス前立腺におけるエストロゲン受容体の発現分布に依存していると考えられ、早急の詳細な検討が必要である。また、Estrogenic な化合物でもマウス前立腺の基底細胞における TGF α の発現誘導が起こると考えられ、同様の検討を経て、作用メカニズムを明らかとする予定である。

E. 結論

マウス前立腺における扁平上皮化生は、エストロゲンが TGF α の発現を誘導した結果、過剰量の TGF α が病変を誘導している可能性が示唆された。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Fujikawa S, Matsuura H, Kanai M, Fumino

- M, Ishii K, Arima K, Shiraishi T, Sugimura Y. The natural history of human prostate gland: morphometric and histopathological analysis of Japanese men. Prostate (in press)
- Yamada Y, Toyota M, Hirokawa Y, Suzuki H, Takagi A, Matsuzaki T, Sugimura Y, Yatani R, Shiraishi T, Watanabe M. Identification of differentially methylated CpG islands in prostate cancer. Int. J. Cancer, 112: 840-845, 2004.
- Fukatsu T, Hirokawa Y, Araki T, Hioki T, Murata T, Suzuki H, Ichikawa T, Tsukino H, Qiu D, Katoh T, Sugimura Y, Yatani R, Shiraishi T, Watanabe M. Genetic polymorphisms of hormone-related genes and prostate cancer risk in the Japanese population. Anticancer Res., 24: 2431-2437, 2004.
- Ishii K, Otsuka T, Iguchi K, Usui S, Yamamoto H, Sugimura Y, Yoshikawa K, Hayward SW, Hirano K. Evidence that the prostate-specific antigen (PSA)/Zn²⁺ axis may play a role in human prostate cancer cell invasion. Cancer Lett., 207: 79-87, 2004.
- Iguchi K, Otsuka T, Usui S, Ishii K, Onishi T, Sugimura Y, Hirano K. Zinc and metallothionein levels and expression of zinc transporters in androgen-independent subline of LNCaP cells. J. Androl., 25: 154-161, 2004.
2. 学会発表
なし
- H. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他 (データベース等)
なし

厚生労働省研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

低用量暴露による遺伝子発現、たんぱく発現データの解析による
ホメオスタシスに関する研究

分担研究者 福島昭治 大阪市立大学大学院医学研究科 教授

研究要旨

本研究では発がん性をもつ α -benzene hexachloride (α -BHC)の低用量長期曝露による発がん作用について検証する。前回、我々は α -BHCのラット肝発がん作用を diethylnitrosamine (DEN)をイニシエーターとする発がん二段階法(13週間観察)を用いて検討し、 α -BHCの発がん作用にはホルミシス現象が強く示唆されることを報告した。今回、 α -BHCのラット肝発がん作用をDENをイニシエーターとする長期投与法(35週間観察)を用いて検討した。 α -BHCの高用量投与では肝腫瘍の発生頻度が有意に増加した。逆に、低用量投与では肝細胞腺腫の発生頻度の減少を示した。また、腫瘍周囲の正常肝において、低用量投与ではc-junのmRNA発現低下とTGF- β の発現上昇をmRNAレベルで認めた。一方、TGF- α のmRNA発現は、DEN単独投与群と比較し、変化を示さなかった。以上の結果から、 α -BHCの発がん作用には閾値がありc-junとTGF- β が関係することが示唆された。

A. 研究目的

本研究では発がん性をもつ α -BHCの低用量長期曝露による発がん作用について検証する。すなわち、内分泌攪乱化学物質には齧歯類へ高用量長期投与により発がん性を発揮するものがあり、農薬として日本でも使われていた α -BHCもその一つである。これまで我々は発がん物質 α -BHCのホルミシス現象を明らかにした。今回、低用量長期曝露での発がん作用について検討する。

B. 研究方法

6週齢の雄性F344ラット、156匹を用いた。イニシエーターとしてDEN(100mg/kg体重)を週1回、3週にわたって腹腔内に投与した後、プロモーションの段階に α -BHCを0、0.01、0.05、0.1、1、50、500ppmの用量で32週間、混餌投与した。実験開始35週にてラットを屠殺し、肝臓について病理組織学および分子生物学的に検索した。すなわち、肝細胞がん、肝細胞腺腫の発生有無、ならびにmRNA発現(RT-PCR及びcDNA Microarray)を検索した。

(倫理面での配慮)

屠殺にあたってはエーテル麻酔下に脱血して行った。また、医学研究科の実験動物取り扱い規定に対応してラットを飼育した。

C. 研究結果

α -BHC の高用量は肝発がんプロモーション作用を、逆に低用量は抑制傾向を示した。すなわち、 α -BHC の高用量投与(50 及び 500 ppm)では肝腫瘍の発生頻度が有意に増加した。また逆に、低用量投与(0.1 ppm)は肝細胞腺腫の発生頻度の減少を示した。

腫瘍周囲の正常肝において、低用量投与(0.01 - 0.1 ppm)では c-jun の mRNA 発現低下と TGF- β の mRNA 発現上昇を認めた。一方、TGF- α の mRNA 発現は、DEN 単独投与群と変化を示さなかった。

D. 考察

α -BHC の長期高用量投与では肝腫瘍の発生頻度が有意に増加し、低用量では腺腫の発生減少が認められた。従って昨年度報告した肝 GST-P 陽性細胞巢の発生に関するデータと合わせて考えると、 α -BHC のラット肝への作用にはホルミシス現象があり、確実に発がんの閾値が存在すると考えられる。

また、低用量投与では c-jun の mRNA 発現低下と TGF- β の mRNA 発現上昇を認めたのに対し、TGF- α の mRNA 発現は、DEN 単独投与群と変化を示さなかった。これらが α -BHC のラット肝発がんに関係すると示唆された。

E. 結論

α -BHC のラット肝への作用にはホルミシス現象が見られ、確実に発がんの閾値が存在する。すなわち、 α -BHC のラット肝発がん作用を DEN をイニシエーターとする長期投与法で検討した。肝腫瘍の発生頻度は高用量投与群では増加し、低用量群では減少傾向を示し、以前の結果を合わせると閾値が存在すると結論できる。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) © Fukushima S, Wanibuchi H, Morimura K, Iwai S, Nakae D, Kishida H, Tsuda H, Uehara N, Imaida K, Shirai T, Tatematsu M, Tsukamoto T, Hirose M, Furukawa F. Existence of a threshold for induction of aberrant crypt foci in the rat colon with low doses of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Toxicol Sci*, 80: 109-114, 2004.
- 2) ©Hoshi M, Morimura K, Wanibuchi H, Wei M, Okochi E, Ushijima T, Takaoka K, Fukushima S. No-Observed Effect Levels for Carcinogenicity and for in vivo Mutagenicity of a Genotoxic Carcinogen. *Toxicol Sci*, 81: 273-279, 2004.
- 3) Wanibuchi H, Salim EI, Kinoshita A, Shen J, Wei M, Morimura K, Yoshida K, Kuroda K, Endo G, Fukushima S. Understanding arsenic carcino-

- genicity by the use of animal models. *Toxicol Appl Pharmacol*, 198: 366-376, 2004.
- 4) Doi K, Wanibuchi H, Salim EI, Shen J, Wei M, Mitsuhashi M, Kudoh S, Hirata K, Fukushima S. Revised rat multi-organ carcinogenesis bioassay for whole-body detection of chemopreventive agents: modifying potential of S-methyl-cysteine. *Cancer Lett*, 206: 15-26, 2004.
- 5) Salim EI, Kaneko M, Wanibuchi H, Morimura K, Fukushima S. Lack of carcinogenicity of enzymatically modified isoquercitrin in F344/DuCrj rats. *Food Chem Toxicol*, 42: 1949-1969, 2004.
- 6) Shen J, Wanibuchi H, Salim EI, Wei M, Yamachika T, Fukushima S. Inhibition of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats due to JTE-522, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Asian Pac J Cancer Prev*, 5: 253-258, 2004.
- 7) Wei M, Morimura K, Wanibuchi H, Shen J, Salim EI, Moku M, Hakoi K, Fukushima S. JTE-522, a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor, inhibits induction but not growth and invasion of 1,2-dimethylhydrazine-induced tubular adenocarcinomas of colon in rats. *Int J Cancer*, 113: 354-358, 2004.
- 8) Wei M, Wanibuchi H, Morimura K, Salim EI, Moku M, Doi K, Mitsuhashi M, Masuda C, Shen J, Kinoshita A, Fukushima S. Lack of preventive efficacy of FK228, a histone deacetylase inhibitor, against N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in p53 and p53 mice. *Anticancer Res*, 24: 785-790, 2004.
2. 学会発表
 <特別講演、シンポジウム、ワークショップ、国際会議>
- 1) Morimura K, Wanibuchi H, Hoshi M, Kinoshita A, Fukushima S.: Risk assessment of genotoxic carcinogens for cancer prevention. 6th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association, January 25-29, Waikoloa, Hawaii, 2004 (Conference Proceedings Poster session C6)
- 2) Fukushima S.: Environmental chemical carcinogenicity. Plenary Lecture. The 3rd International Congress of Asian Society of Toxicology: ASIATOX III, Feb.1-6, Bangkok, Chiang Thailand, 2004 (ASIATOX III program & abstracts p. 31-32)
- 3) 福島昭治：環境発がん：低用量曝露によるがん発生。日本病理学会近畿支部学術集会。2月14日，大阪，2004
- 4) Wanibuchi H, Morimura K, Fukushima S.: Risk assessment of low dose carcinogenesis by genotoxic carcinogens. Symposium, JSTP/ISTP

- (IATP) 2004, Feb. 15-18, International Conference Center Kobe, 2004 (Book of Abstracts S-1-1, p. 76)
- 5) Morimura K, Wanibuchi H, Hoshi M, Kinoshita A, Fukushima S.: Carcinogenicity of low-dose MeIQx, in relation to cancer risk assessment. JSTP/ISTP (IATP) 2004, Feb. 15-18, International Conference Center Kobe, 2004 (Book of Abstracts P-14, p. 122)
- 6) Naito S, Morimura K, Hoshi M, Miyazi N, Fukushima S.: Presence of the threshold for carcinogenicity and in vivo mutagenicity induced by genotoxic carcinogen, MeIQx, at low doses. JSTP/ISTP (IATP) 2004, Feb. 15-18, International Conference Center Kobe, 2004 (Book of Abstracts P-15, p. 123)
- 7) Doi K, Salim EI, Kinoshita A, Puatanachokchai R, Wanibuchi H, Fukushima S.: Colon carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine (PhIP) in rats: suggestion for carcinogenesis and practical threshold. JSTP/ISTP (IATP) 2004, Feb. 15-18, International Conference Center Kobe, 2004 (Book of Abstracts P-18, p. 126)
- 8) ©Puatanachokchai R, Wanibuchi H, Osada M, Morimura K, Funae Y, Fukushima S.: Possible mechanism of hormetic phenomenon of alpha benzene hexachloride on diethylnitrosamine induced hepatocarcinogenesis. JSTP/ISTP (IATP) 2004, Feb. 15-18, International Conference Center Kobe, 2004 (Book of Abstracts P-21, p. 129)
- 9) Kushida M, Sukata T, Ozaki K, Uwagawa, S, Morimura K, Wanibuchi H, Okuno Y, Fukushima S.: Effect of low-dose DDT on liver carcinogenesis in rats. JSTP/ISTP (IATP) 2004, Feb. 15-18, International Conference Center Kobe, 2004 (Book of Abstracts P-22, p. 130)
- 10) Kinoshita A, Wanibuchi H, Morimura K, Yunoki T, Fukushima S.: Carcinogenicity of phenobarbital in Mmh/OGG1 knockout mice. JSTP/ISTP (IATP) 2004, Feb. 15-18, International Conference Center Kobe, 2004 (Book of Abstracts P-63, p. 171)
- 11) Miyazi N, Wanibuchi H, Moku M, Morimura K, Tagawa Y, Fukushima S.: The effect of N-acetylcysteine on low dose 2-amino-3,8-dimethylimidazo [4,5-f] quinoxaline (MeIQx)-induced rat hepatocarcinogenesis. JSTP/ISTP (IATP) 2004, Feb. 15-18, International Conference Center Kobe, 2004 (Book of Abstracts P-89, p. 197)
- 12) Morimura K, Wanibuchi H, Kinoshita A, Hoshi M, Fukushima S.: Carcinogenicity risk of low-dose MeIQx. 95th Annual Meeting, American Association for Cancer Research, March 27-31, Orlando, Florida, U.S.A., 2004 (AACR proceedings, vol. 45, March 2004, 1337, p. 306)
- 13) Miyazi N, Morimura K, Kinoshita A, Wanibuchi H, Kang JS, Asamoto M, Hokaiwado N, Shirai T, Fukushima S.: