

平成18年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
「内分泌かく乱化学物質の生体影響メカニズム（低用量効果・複合効果を含む）
に関する総合研究」分担研究報告書

胚・胎児期の曝露による神経行動関連を中心としたビスフェノールAの低用量影響の検討
分担研究者 関澤 純 徳島大学総合科学部

研究要旨

ビスフェノールAによる低用量影響に関し網羅的に文献を収集しデータの内容および信頼性の評価を行った。ここ数年胎生期、授乳期暴露による神経系への影響の報告が急増しており、この点に着目して検討した。PubMed 医学文献データベースにおいてビスフェノールAのCAS登録番号80-05-7を用いて、昨年調査時以降の新たな研究論文の所在を網羅的に検索した。ヒットした95件のうち分析や野生生物への影響の文献40件を除き、内容により神経行動影響16件、免疫影響3件、生殖影響5件、その他31件に分類した。近年形態学および機能面の両方で神経行動影響の報告が多い。かつ中にはきわめて低用量（25 ng/kg 体重）での影響が観察されている。従来RfDを導くために観察された影響よりもはるかに低濃度での神経系を中心とした種々の影響を及ぼすことは間違いなく、ヒトにおける影響の可能性については、作用機作および曝露レベルとの関係でより精細な研究が必要とされる。

A. 研究目的

ビスフェノールA（BPA）の低用量影響について周産期曝露による神経系への影響を中心に低用量影響問題に関して文献的な評価を行う。BPAの低用量影響として、どのような生物学的な現象が見られており、その証拠としての研究報告の信頼性と、データの生物学的な意義を検証する。低用量で影響が見られた濃度と、ヒトの曝露レベルを勘案してリスクの可能性についても検討する。

B. 研究方法

BPAの公表文献をMEDLINE（2005年9月24日から2006年11月9日まで）で検索し得られた95文献から野生生物への影響や分析法に関する文献などを除外し55報

を得た。これらの文献の原報を入手し、内容により分別した。テーマに沿いBPAの低用量影響の証拠の確からしさと、影響の内容、およびデータの信頼性について検討した。さらにこの間にBPAによる健康リスクの検討を行った報告が、欧州連合食品に関する科学委員会（SCF, 2002）、および産業技術総合研究所化学物質リスク管理研究センター（CRM/AIST, 2005）から出されたので、これらの内容とも比較・検討した。

C. 研究結果

近年周産期の一過性曝露による神経系への影響の報告が多いが、周産期は神経系の器官形成期で最もホルモン感受性が高い時期で行動レベルで性差の消失と組織学的に青斑核やBed nucleusの性差の消失の報告

がある。しかし SDN-POA (性的二型核) 神経核の大きさが影響を受けたという報告はない。NTP 長期毒性試験での体重減少の LOEL 5mg/kg 体重よりも低い曝露濃度で前記影響が観察されていることから、典型的なエストロゲン様作用以外に焦点をあてた毒性学的な試験と考察が必要とされている。

(1) はじめに

内分泌かく乱化学物質について 2000 年に NTP が低用量影響評価ワークショップを開催、翌年欧州でワークショップが持たれたが、最終的な決着は見られていない。BPA を材料として、どのような生物学的な現象が見られており、その証拠としての研究報告の信頼性と、データの生物学的な意義を文献的に検証した。

MEDLINE で BPA の CAS 登録番号 80-05-7 を用いて 2000 年 4 月 1 日から 2006 年 11 月 8 日までの文献を検索すると 749 件がヒットした。このうち昨年調査以降の 2005 年 9 月 24 日から 2006 年 11 月 8 日までの文献数は 95 件であった。95 文献から野生生物への影響や分析法に関する文献などを除外すると 55 報が得られた。影響の標的臓器別で見ると、生殖系 2 件、免疫系 1 件、神経系 13 件、その他 (レビュー、遺伝子発現、曝露および代謝を含む) の報告 39 件となっていた。2000 年頃には生殖に関連した発達影響の文献が多かったが、最近では神経行動毒性および遺伝子発現関連の報告が多い。

(2) 生殖系への影響

Nishino ら (2006) によると、Hershberger assay で androgen receptor regulation および形態計測において BPA 投与の影響は認められなかった。Kim ら (2005) は、思春期前のメス Sprague Dawley ラットを用いる OECD

rodent uterotrophic assay で BPA は 300 mg/kg/日 で有意な子宮肥大を示したと報告した。

(3) 免疫系への影響

6 週令の雌 Balb/c マウスを ovalbumin で感作し 100 mg/kg 体重の BPA を 1 日間隔で 4 回腹腔内投与した。投与マウスの脾臓重量は有意に増加した。BPA 投与は Th1 免疫反応を増強させた (Alizadeh ら, 2006)

(4) 神経行動への影響

近年形態学および機能面の両方で神経行動影響の報告が多く、きわめて低用量 (25 ng/kg 体重) での影響が観察されている。機作の詳細は十分解明されていないが、視索前野脳室周囲核 (AVPV) における tyrosine hydroxylase (TH) 陽性ニューロン数の減少、脳内の somatostatin receptor subtype 3 (ss3) mRNA 量の変化、前脳辺縁における dopamine 受容体の up regulation などが観察されている。

C57/Bl-6 雌マウスに妊娠 3 日から授乳期間中まで BPA (2, 200 μ g/kg 体重/日) を経口投与した。BPA は雌の思春期開始を早めた。また濃度依存的に不安行動の増強 (明空間で過ごす時間の減少) を示したが、短期空間記憶には影響を示さなかった (Ryan ら 2006)。

CD-1 マウスの妊娠 8~授乳 16 日まで、25 または 250 ng/kg 体重の BPA を皮下に埋設されたポンプにより投与した。BPA 曝露されたメスの視索前野脳室周囲核 (AVPV) における tyrosine hydroxylase (TH) 陽性ニューロン数の減少により、元来見られる TH 陽性ニューロン数の性差が見られなくなった。同様に open field behavior の性的 2 形性も BPA 曝露によって解消した (Rubin ら, 2006)。

メス Sprague Dawley ラットに BPA (40, 400 μ

g/kg 体重/日) を交配8日前 5 日間および妊娠から授乳期間中までの 42 日間まで強制経口投与した。出生後7日目または 55 日目に屠殺し脳内の somatostatin receptor subtype 3 (ss3) mRNA 量を調べた。400 μ g/ kg 処理群成獣の前頭頂骨皮質V層では対照群に比べ ss3mRNA の顕著な減少が見られた。出生後7日目の処理群では海馬脳室周辺核での ss3mRNA の顕著な減少、腹側内側の核における ss3mRNA の顕著な増加が見られた。さらに GABA 受容体 subunit $\alpha_{1,5}$ 特異的アゴニスト存在下にさらに顕著な up regulation と down regulation が観察された。GABA 受容体 subunit 依存的な ss3mRNA の変化は神経内分泌系や社会・性行動に関与した神経回路におけるクロストークメカニズムに BPA が何らかの影響を与えることの説明を提供している (Facciolo, 2005)。

出生前あるいは新生児期に BPA (餌中に 3×10^{-2} , 3×10^{-1} , 5×10^2 , 2×10^3 μ g/g 混入) で処理されたメスから生まれた7週令オス ddY マウスの morphine による自発運動の亢進と報酬効果を増強した。この影響は BPA が前脳辺縁における dopamine 受容体の up regulation による G タンパク活性化を通して中枢の dopamine 受容体依存神経伝達を亢進し morphine 依存性の自発運動の亢進と報酬効果への感受性を高めると考えられた (Narita,ら., 2006)。

Sprague Dawley ラット新生児に出生 1 日目から 12 時間ごと BPA 250 μ g を 4 回(100 mg/kg 体重に相当)皮下投与した。BPA 曝露により19日目オスにおける視索前野脳室周囲核(AVPV)の tyrosine hydroxylase (TH) 陽性ニューロン数が増加し性差が少なくなった。さらに BPA 曝露メスでは TH 陽性ニューロンおよ

びエストロゲン受容体を共に発現しているニューロン数が減少していた (Patisaul ら., 2006)。

Sprague Dawley ラットに出生 23 日から 30 日まで BPA を強制経口投与 (40 μ g/ kg 体重/日) した。思春期行動は出生 45 日目に、性行動は 90 日令以上のオスを使って調べた。BPA 曝露により思春期では、臭い嗅ぎや噛み付きなど短期の行動に減少傾向が見られた。性行動では曝露により挿入潜伏期の短縮が見られた。また血中 testosterone は曝露により思春期、成熟期ともに有意に減少した。同時に試験した ethinylestradiol (0.4 μ g/ kg 体重/日) では、より強力に同様な影響が観察された (Della Seta ら., 2006)。

Sprague Dawley ラットに BPA を妊娠6日目から出産後 20 日目まで強制経口投与 (4, 40, 400 mg/kg 体重) した。400 mg/kg 投与群は死亡し 40 mg/kg 投与群の体重は対照群に比べやや少なかった。出生後 3 週目の 4 mg/kg 投与群のメス出生児脳中の 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid, homovanillic acid = HVA (両者とも dopamine = DA の代謝物), serotonin, 5-hydroxyindoleacetic acid (serotonin 代謝物) 濃度が上昇し、脳の部位によっては HVA/DA 比が上昇した。同様な傾向は出産後 3 週目の母親でも見られた。これら脳内神経伝達物質濃度変化の意義については不明である (Honma, 2006)。

Sprague Dawley ラット(出生 4 日から 19 日新生児と若齢の雌雄)を ketamine+xylozine で麻酔、脳解剖時に BPA (10^{-12} ~ 10^{-6} M, 3 μ l) を矢状面中央から第4脳室頂部 (in the midsagittal plane to the suprafastigial region) に注入した。BPA は出生 10 日新生児の脳顆粒細胞で ERK1/2 免疫陽性細胞数を増加させた。BPA を 17 β -estradiol (E2) と併用投与する

と、E2による発達中の脳ニューロンにおける急激なERK1/2活性化を濃度依存的に阻害し発達中の脳への低濃度BPAによる影響の可能性を示唆した。(Zsarnovszky, 2005)

オス Wistar ラット成獣の脳内に微透析還流により BPA(10 μ M)を 1-methyl-4-phenyl pyridinium ion (MPP⁺) 5 mMを併用投与すると、MPP⁺による dopamine 放出と hydroxyl radical (*OH)生成が相乗作用により増強される。このラットに angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor の imidaprilat(100 μ M)を処置するとおそらく抗酸化作用により dopamine 放出と *OH 生成が抑制される(Obata ら、2006)。

妊娠 13 日目から出産まで Wistar ラットに飲料水経路で 0.1 ppm BPA(15 μ g/kg/日)を摂取させた(Fujimoto ら、2006)。出生 6-9 週にかけて雌雄別に (20-24 匹群) 神経行動毒性 (Open-Field test, Elevated plus maze test, Passive avoidance-test, Forced swimming test) を評価した。BSA 投与は Open field test ではオスの立上り行動の頻度、時間を上昇、性差を消滅させ、Forced swimming test でも BPA による性差消失が見られオスの immobility が増加した。BPA は depressive response を特にオスにおいて顕著にしたと判断された。神経行動毒性の客観的評価方法が提唱され形態的な障害とあわせて機能的な発達障害評価の重要性が増しつつある。

Rubin ら(2006)の研究で皮下埋設ポンプにより 250 ng/kg 体重の BPA 曝露により性差の変化が見られたことを引用し、すでにヒト血液や組織中に BPA が 0.1~10 ng/ml (平均あるいは中央値で 10 nM まで)検出されていることからFDA(米国食品に薬品庁)が BPA の安全量を見直すべきと主張した(vom Saal. &

Welshons. 2006)。

(5) 遺伝子発現への影響

Nishizawa ら(2005)は、ICR マウスの妊娠期間中にBPAを経口投与し妊娠後期に胚を摘出、定量的 real-time RT-PCR により mRNA 発現、western immunoblot でタンパク発現を調べた。0.02 μ g/kg 投与で雌雄ともに妊娠 14.5 日と 18.5 日目に大脳、小脳、精巣および卵巣における Arylhydrocarbon receptor (AhR) mRNA の発現が対照に比べ 30~40 倍近く上昇した。Arylhydrocarbon receptor repressor (AhRR), AhR nuclear translocator (Arnt) mRNA 発現も 0.02 μ g/kg 投与で雌雄ともに妊娠 14.5 日と 18.5 日目に小脳で数倍~十数倍上昇した。肝臓、小脳の CYP1A1 glutathione S-transferase Ya subunit タンパクは 200 μ g/kg 投与 18.5 日目に上昇した。

(6) 吸収・代謝・分布・排泄

Kang ら(2006)のレビューによると、実験動物では遊離の BPA は 56~82%が糞中に、代謝物(主要なものはグルクロン酸および硫酸抱合体)は 13~28%が尿中に排泄される。

BPA の代謝を F344 ラット、赤毛サル、チンパンジーで比較した。経口 10 mg/kg 投与後の赤毛サル、チンパンジーの血清 Cmax および AUC はラットよりも高かった。皮下投与に比べ、経口による吸収効率は低い。ラットに比べ霊長類の肝血流の低さがクリアランスの低さと AUC の大きさに関係していると思われた。ラットの最終排出半減期が大きいのは腸肝循環が寄与していると考えられる。ヒトにおけるクリアランスは他の霊長類と同じく尿排泄によるだろう(Tominaga ら、2006)。

2000 年~2004 年に得られた多様だが不

特定の 30 人の尿を LC/MS/MS で分析した。遊離 BPA、グルクロン酸および硫酸抱合体、合計の中央値は、それぞれ検出限界以下、1.4, 0.3, 2.12 $\mu\text{g/L}$ で、合計中のそれぞれの比率は 9.5%, 70%, 21%であった(Yeら, 2005)。

(7) 低用量影響の総括

(A) BPAの公表文献を MEDLINE (2001 年 1 月から 2006 年 11 月 9 日)で CAS 登録番号 80-05-7 を用いて検索された 707 文献より、低用量に該当する影響が見られた主要なデータを表 1 にまとめた。ここで低用量とは、US EPA が 50 $\mu\text{g/kg/日}$ の RfD (参照用量)を導くために用いたラット慢性毒性試験で、低体重が観察された LOAEL 50 mg/kg/日を採用した(IRIS, 1988)。

少なくとも 400 $\mu\text{g/kg/日}$ 以下の曝露で影響が検出された報告は 17 件あり、遺伝子発現の変化と免疫影響が各 1 件以外は、すべて神経系への形態学的、あるいは機能的な影響であった。また曝露時期では、免疫影響試験と皮下投与試験各 1 件以外は、妊娠期間を含め胎児、乳児期間中の曝露による次世代への影響を見ていた。

(B) 最も低い用量で影響が見られたのは ICR マウスの妊娠期間中にBPAを経口投与し妊娠後期に胚を摘出、mRNA とタンパク発現を調べたものであった。0.02 $\mu\text{g/kg}$ 投与で雌雄ともに妊娠 14.5 日と 18.5 日目に大脳、小脳、精巣・卵巣の Arylhydrocarbon receptor (AhR) mRNA 発現が 30~40 倍近く上昇し、AhR repressor, Arnt mRNA 発現も小脳で数倍~十数倍上昇した。この他に雌マウスに妊娠3日から授乳期間中の 2 $\mu\text{g/kg}$ 体重/日経口投与により、雌の発情開始早期化、また濃度依存的に不安行動の増強が見ら

れた。10 $\mu\text{g/kg}$ 体重/日以下で影響が見られた報告は 7 件あった。

(C) 欧州連合食品に関する科学委員会 (ECB, 2003)、産業技術総合研究所化学物質リスク管理研究センターの報告 (NEDO/CRM-AIST, 2005)はそれぞれ推定した。前者ではヒトの1日摂取量は過大なワーストケースシナリオから、体重 70 kg の成人においてワインから 0.5 mg/人/日および缶詰食品 0.1 mg/人/日の合計 0.6 mg/人/日 (0.086 mg/kg 体重/日)と推定し、後者は尿中濃度の実測値からいくつかの仮定をおいて推計し1日摂取量は1~6 歳児が最も高く平均で 1.2 $\mu\text{g/kg}$ 体重/日 (95 パーセンタイルで 4 $\mu\text{g/kg}$ 体重/日)と推定した。

マウスの妊娠期間中の 0.02 $\mu\text{g/kg}$ 投与で胚の脳における AhR 他の mRNA 発現に変化、また妊娠3日から授乳期間中の 2 $\mu\text{g/kg}$ 体重/日経口投与で雌の発情開始早期化、不安行動の増強が見られ、10 $\mu\text{g/kg}$ 体重/日以下で影響が見られた報告は 7 件あり、その多くは神経系における形態的あるいは機能的な影響であった。霊長類はラットに比べクリアランスが低く、血清 Cmax と AUC はラットより高くなるとされている。他方ヒトの胎児はげっ歯類に比べて数十倍高濃度の天然の女性ホルモンにさらされているため、実験動物で影響が見られた濃度でエストロゲン受容体を介する作用は受けにくいのではないかと推定されている。

これらを総合すると、BPAが胎児の妊娠期間中曝露により、従来 RfD を導くために観察された影響よりもはるかに低濃度での神経系を中心とした種々の影響を及ぼすことは間違いない。ヒトにおける影響の可能性については、作用機作および曝露レベル

との関係でより精細な研究が必要とされる。ことに従来問題とされたエストロゲン受容体を直接介する作用以外の関与について検討が必要とされる。

引用文献

Alizadeh M, Ota F, Hosoi K, Kato M, Sakai T, Satter MA., Altered allergic cytokine and antibody response in mice treated with Bisphenol A., *J Med Invest.* 2006 53(1-2) 70-80.

Della Seta D, Minder I, Belloni V, Aloisi AM, Dessi-Fulgheri F, Farabollini F. : Pubertal exposure to estrogenic chemicals affects behavior in juvenile and adult male rats. *Horm Behav.* 2006;50(2):301-7.

ECB: European Chemicals Bureau : European Union Risk Assessment, Volume 37 4,4'-isopropyl idenediphenol (bisphenol-A), European Commission, Joint Research Centre, EUR 20843 EN, 2003

Facciolo RM, Madeo M, Alo R, Canonaco M, Dessi-Fulgheri F. Neurobiological effects of bisphenol A may be mediated by somatostatin subtype 3 receptors in some regions of the developing rat brain. *Toxicol Sci.* 2005 88 (2):477-84.

Fujimoto T, Kubo K, Aou S., Prenatal exposure to bisphenol A impairs sexual differentiation of exploratory behavior and increases depression-like behavior in rats., *Brain Res.* 2006 1068(1):49-55.

Honma T, Miyagawa M, Suda M, Wang RS, Kobayashi K, Sekiguchi S. Effects of perinatal exposure to bisphenol A on brain neurotransmitters in female rat offspring, *Ind Health.* 2006 44(3):510-24

IRIS (1988) Bisphenol A (CASRN 80-05-7) Integrated Risk Information System, US Environmental Protection Agency http://cfpub.epa.gov/iris/quickview.cfm?substance_nmbr=0356

Kang JH, Katayama Y, Kondo F, Biodegradation or metabolism of bisphenol A: from microorganisms to mammals. *Toxicology.* 2006 217(2-3):81-90.

Kim HS, Kang TS, Kang IH, Kim TS, Moon HJ, Kim IY, Ki H, Park KL, Lee BM, Yoo SD, Han SY: Validation study of OECD rodent uterotrophic assay for the assessment of estrogenic activity in Sprague-Dawley immature female rats., *J Toxicol Environ Health A.* 2005 Dec 10;68(23-24):2249-62.

Narita M, Miyagawa K, Mizuo K, Yoshida T, Suzuki T.: Prenatal and neonatal exposure to low-dose of bisphenol-A enhance the morphine-induced hyperlocomotion and rewarding effect. *Neurosci Lett.* 2006 Jul 24;402(3):249-52

NEDO/CRM-AIST : 詳細リスク評価書シリーズ6 ビスフェノールA、NEDO 技術開発機構/産業技術総合研究所化学物質リスク管理研究センター共編、丸善株式会社、東京、267 頁、2005

Nishino T, Wedel T, Schmitt O, Schonfelder M, Hirtreiter C, Schulz T, Kuhnel W, Michna H.: The xenoestrogen bisphenol A in the Hershberger assay: androgen receptor regulation and morphometrical reactions indicate no major effects., *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2006 Feb;98(2-3):155-63.

Nishizawa H, Imanishi S, Manabe N.: Effects of exposure in utero to bisphenol a on the

expression of aryl hydrocarbon receptor, related factors, and xenobiotic metabolizing enzymes in murine embryos., *J Reprod Dev.* 2005 Oct;51(5):593-605.

Obata T. : Imidaprilat, an angiotensin-converting enzyme inhibitor exerts neuroprotective effect via decreasing dopamine efflux and hydroxyl radical generation induced by bisphenol A and MPP+ in rat striatum. *Brain Res.* 2006; 1071(1): 250-3.

Patisaul HB, Fortino AE, Polston EK : Neonatal genistein or bisphenol-A exposure alters sexual differentiation of the AVPV. *Neurotoxicol Teratol.* 2006 Jan-Feb; 28 (1):111-8.

Rubin BS, Lenkowski JR, Schaeberle CM, Vandenberg LN, Ronsheim PM, Soto AM.: Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A, *Endocrinology.* 2006; 147 (8) :3681-91.

vom Saal FS, Welshons WV.: Large effects from small exposures. II. The importance of positive controls in low-dose research on bisphenol A. *Environ Res.* 2006 Jan; 100 (1) :50-76.

Ryan BC, Vandenberg JG., Developmental exposure to environmental estrogens alters anxiety and spatial memory in female mice., *Hormones and Behavior.* 2006 50(1):85-93.

Tominaga T, Negishi T, Hirooka H, Miyachi A, Inoue A, Hayasaka I, Yoshikawa Y., Toxicokinetics of bisphenol A in rats, monkeys and chimpanzees by the LC-MS/MS method. Toxicokinetics of bisphenol A in rats, monkeys and chimpanzees by the LC-MS/MS

method., *Toxicology.* 2006, 226(2-3):208-17

Ye X, Kuklenyik Z, Needham LL, Calafat AM., Quantification of urinary conjugates of bisphenol A, 2,5-dichlorophenol, and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in humans by online solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry., *Anal Bioanal Chem.* 2005, 383(4):638-44.

Zsarnovszky A, Le HH, Wang HS, Belcher SM. Ontogeny of rapid estrogen-mediated extracellular signal-regulated kinase signaling in the rat cerebellar cortex: potent nongenomic agonist and endocrine disrupting activity of the xenoestrogen bisphenol A., *Endocrinology.* 2005 146 (12) :5388-96

D. 考察

BPAが胎児の妊娠期間中曝露により、従来RfDを導くために観察された影響よりもはるかに低濃度での神経系を中心とした種々の影響を及ぼすことは間違いない。ヒトにおける影響の可能性については、作用機作および曝露レベルとの関係でより精細な研究が必要とされる。ことに従来問題とされたエストロゲン受容体を直接介する作用以外の関与について検討が必要とされる。

E. 結論

BPAによる低用量影響に関し近年神経行動影響の報告が多く、その機作の解明が急がれている。

BPAによる低用量影響に関し文献的な評価を行った。PubMed 医学文献データベースにおいてBPAの低用量影響評価に関わる文献55件を収集し評価した。

(A) BPAの公表文献をMEDLINE(2001年1月から2006年11月9日)でCAS登録番号80-05-7を用いて検索された707文献より、低用量に該当する影響が見られた主要なデータを表1にまとめた。ここで低用量とは、US EPAが50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ のRfD(参照用量)を導くために用いたラット慢性毒性試験で、低体重が観察されたLOAEL 50 $\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ を採用した(IRIS, 1988)。

少なくとも400 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 以下の曝露で影響が検出された報告は17件あり、遺伝子発現の変化と免疫影響が各1件以外は、すべて神経系への形態学的、あるいは機能的な影響であった。また曝露時期では、免疫影響試験と皮下投与試験各1件以外は、妊娠期間を含め胎児、乳児期間中の曝露による次世代への影響を見ていた。

(B) 最も低い用量で影響が見られたのはICRマウスの妊娠期間中にBPAを経口投与し妊娠後期に胚を摘出、mRNAとタンパク発現を調べたものであった。0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与で雌雄ともに妊娠14.5日と18.5日目に大脳、小脳、精巣・卵巣のArylhydrocarbon receptor (AhR) mRNA発現が30~40倍近く上昇し、AhR repressor, Arnt mRNA発現も小脳で数倍~十数倍上昇した。この他に雌マウスに妊娠3日から授乳期間中の2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日経口投与により、雌の発情開始早期化、また濃度依存的に不安行動の増強が見られた。10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日以下で影響が見られた報告は7件あった。

(C) 欧州連合食品に関する科学委員会はヒトの1日摂取量は過大なワーストケースシナリオから体重70 kgの成人はワインから0.5 $\text{mg}/\text{人}/\text{日}$ と缶詰食品0.1 $\text{mg}/\text{人}/\text{日}$ の合計0.6 $\text{mg}/\text{人}/\text{日}$ (0.086 mg/kg 体重/日)摂取する可

能性があると推定し、産業技術総合研究所化学物質リスク管理研究センター報告は尿中濃度の実測値からの推計により1日摂取量は1~6歳児が最も高く平均1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日(95パーセンタイルで4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日)と推定している。

マウスの妊娠期間中の0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与で胚の脳におけるAhR他のmRNA発現に変化が見られ、妊娠3日から授乳期間中の2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日経口投与で雌の発情開始早期化、不安行動の増強が見られ、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日以下で影響が見られた報告は7件あり、その多くは神経系における形態的あるいは機能的な影響であった。霊長類のクリアランスはラットに比べて低く、血清CmaxとAUCはラットより高くなるとされ、他方ヒトの胎児はげっ歯類に比べて数十倍高濃度の天然の女性ホルモンにさらされているため、実験動物で影響が見られた濃度でエストロゲン受容体を介する作用は受けにくいのではないかと推定されている。

(D) BPAの低用量影響リスクを考察することに寄与する多くの新たな実験データが提出されてきたが、用量と反応の関係、曝露レベルと体内動態を推定する上では、まだ不確実性が大きい。しかしようやくBPAに関しては、低用量影響を比較的信頼性の高いデータを基に論ずることが可能になりつつある。しかし最も最近の産業技術総合研究所化学物質リスク管理研究センターの詳細リスク評価書(2005)では、ほぼ同時期になされた本研究の文献調査により見出された低用量報告データをほとんど一つも見えていないという致命的な欠陥を抱えている。真に総合的にこの問題を検討される必要があり、さらに比較的到低用量に妊娠の特定の臨界期の曝露されることにより、後

天的に形態だけでなく機能面で発達の障害が生じる可能性という新たな毒性機作につき、適切に検討しうる毒性試験法と、リスク評価手法の検討と、このことについて国際的な専門家の協力を基礎にコンセンサスが目指されるべきと考えられる。

なし

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文・図書発表

査読あり

Vermeire T, Munns, WRJr, Sekizawa J, Suter

G, Van der Kraak G An assessment of Integrated Risk Assessment, Human & Ecological Risk Assessment (accepted)

関澤 純 「環境ホルモン物質」の低用量影響を考える、四国医学雑誌 2006 62(3/4) 113-119

関澤 純 内分泌かく乱化学物質による低用量影響の蓋然性、日本リスク研究学会誌, 2007 17(1) (印刷中)

2. 学会発表

関澤 純 内分泌かく乱化学物質による低用量影響の蓋然性、日本リスク研究学会第19回春季シンポジウム (2006年6月、東京) 講演要旨集 30~37

H. 知的所有権の取得状況

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学教授

研究要旨

環境中、食品中の新規 AhR リガンドの構造決定と、CYP1A1 を組み込んだ酵母 AhR リガンドアッセイ系の開発を目的とした。染色工場廃水及び各種コーヒーから有機物を抽出し、AhR リガンドを単離精製し、構造決定した。染色工場廃水から 3 種類の AhR リガンド、単離同定した。コーヒー中に複数のリガンドを発見したが、構造決定には至っていない。また、YCM3-CYP1A1 は期待通り働き、CYP1A1 によるリガンドの不活化を評価することができた。染料工場廃水から新規の AhR リガンドを単離同定し、キノフタロン系化合物が新しいタイプの AhR リガンドであることを示した。また、新しく作成した YCM3-CYP1A1 は新規リガンドの毒性を簡便に予測するのによい系である。

A. 研究目的

環境中、食品中の新規 AhR リガンドの構造決定と、CYP1A1 を組み込んだ酵母 AhR リガンドアッセイ系の開発を目的とした。AhR は比較的広い基質特異性を持ち、食品中、生体内のリガンドも複数発見されている。京都の染色工場廃水とコーヒー中に含まれる AhR リガンドの構造決定を試みた。AhR リガンドの毒性は誘導された CYP1A1 により分解されるかどうかによって左右されるため、この影響を簡便に測定できる酵母株を作成した。

B. 研究方法

染色工場廃水及び各種コーヒーから有機物を抽出し、AhR リガンドを単離精製し、構造決定した。各抽出サンプルを HPLC で分画し、酵母株 YCM3 で AhR リガンド活性を測定し、活性の高いピークを精製した。ピークの吸光スペクトル及び質量スペクトルから精製した物質の構造を推定した。推定した構造の化合物を購入または合成し、構造の確認を行った。また、シャトルベクター pBEV-GL にヒト CYP1A1 遺伝子を組み込み、酵母株 YCM3 に導入した YCM3-CYP1A1 を作成し、既知の AhR リガンド及び環境サンプルについて試験を行った。

C. 研究結果

染色工場廃水から 3 種類の AhR リガンド、

単離同定した。コーヒー中に複数のリガンドを発見したが、構造決定には至っていない。また、YCM3-CYP1A1 は期待通り働き、CYP1A1 によるリガンドの不活化を評価することができた。

染色工場廃水から単離したリガンドはいずれも市販の染料である、Disperse Red 92 (DR92), Disperse Yellow 64 (DY64), および 3'-hydroxybenzo[b]quinophthalone (3'-HB[b]QP) であった。特に後者 2 種類は強力な AhR リガンドで、構造もよく似ていた。

また、ヒト CYP1A1 を組み込んだ酵母株 YCM3-CYP1A1 の実験では、生体内 AhR リガンドであるインディルビン、ICZ、FICZ は YCM3-CYP1A1 により代謝され、活性の現弱が見られたが、TCDD や 3-MC の活性はほとんど変化しなかった。この方法を各種抽出物についても行った。この結果、コーヒー抽出物及び石油化学コンビナート廃水抽出物中のリガンドは CYP1A1 で代謝されるが、ディーゼル粉塵中のリガンド活性はあまり変わらないことがわかった。

D. 考察

今回、市販の染料物質に強力な AhR リガンド活性がみとめられた。もっとも強力な DY64 の底質中半減期は 240 日以上であると報告されており、環境中に長期間残留する可能性がある。DY64 と 3'-HB[b]QP はいずれもキノフタロン骨格を持っており、新しいタ

タイプの AhR リガンドである。

E. 結論

染料工場廃水から新規の AhR リガンドを単離同定し、キノフタロン系化合物が新しいタイプの AhR リガンドであることを示した。また、新しく作成した YCM3-CYP1A1 は新規リガンドの毒性を簡便に予測するのにより系である。

F. 研究発表

1. 研究論文

- 乙部史子、周佩欣、松井三郎、小田美光、松田知成*「HPLC-バイオアッセイを用いた下水処理排水中の DNA 損傷性および AhR リガンド活性の解析」*環境工学研究論文集*, in press
- P.H. Chou, S. Matsui, K. Misaki, T. Matsuda: Isolation and Identification of Xenobiotic Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands in Dyeing Wastewater, *Environ. Sci. Technol.*, in press
- P.H. Chou, S. Matsui, T. Matsuda: Detection and identification of dyes showing AhR-binding affinity in treated sewage effluents, *Wat. Sci. Tech.*, 53(11), 35-42, 2006

2. 学会発表

- J. Adachi, T. Matsuda: The mechanism of G1 arrest induced by indirubin - An AhR dependent pathway, *Indirubin the red shade of indigo*, 2006, 8th-13th April, Les Eyzies-de-Tayac, France

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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

低容量 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 三重大学大学院医学系研究科・腎泌尿器外科学・教授

研究要旨

低用量エストロゲン様化学物質の暴露によるマウス前立腺の異常増殖機構解明に向けて、独自の発生生物学的手法に分子生物学的手法を組み合わせた解析を試みた。ビスフェノール A (BPA) によるマウス前立腺の形態組織学的変化を評価し、さらに、BPA 経胎盤投与により変化する泌尿生殖洞の遺伝子発現を解析した。BPA 経皮下投与により成獣マウス前立腺において認められる squamous change は、BPA 経胎盤投与による仔雄マウス成獣時前立腺においても観察された。BPA 経胎盤投与により変化する泌尿生殖洞の遺伝子はケラチン化に關与する遺伝子群のほか、性分化に關与する SF1 および、その関連遺伝子群であった。BPA は DES の作用と一部共通した形態組織学的変化や lobe 特異性を示すが、遺伝子発現解析からは BPA に、より特徴的な作用が存在する可能性が示唆された。

A. 研究目的

低用量エストロゲン様化学物質の暴露によるマウス前立腺の異常増殖機構解明に向けて、独自の発生生物学的手法に分子生物学的手法を組み合わせた解析を試みた。すなわち、性ステロイドホルモンに依存する前立腺では、細胞の分化や増殖、そして腺管分枝形態発生など、上皮や間質細胞に存在する性ステロイドホルモン受容体を介した上皮-間質の相互作用に制御されている。我々は、前立腺の異常増殖性病変が体内ホルモンバランス

の不均衡に起因していると考え、低用量エストロゲン様化学物質暴露によるマウス前立腺の異常増殖機構に着目した。

B. 研究方法

ビスフェノール A (BPA) によるマウス前立腺の形態組織学的変化を評価し、さらに、BPA 経胎盤投与により変化する泌尿生殖洞の遺伝子発現を解析した。すなわち、

1. BPA 経皮下投与による成獣マウス前立腺の形態組織学的変化

9 週齢の雄 BALB/c マウスに対して 3 週間、0.2, 2, 20, 200 mg ビスフェノール A (BPA) もしくは 2 mg ジエチルスチルベステロール (DES) を自家製ペレットにして皮下投与した。前立腺は anterior prostate (AP), dorsolateral prostate (DLP), ventral prostate (VP) という 3 つの lobe へと微小解剖し、形態組織学的な変化を評価した。

2. BPA 経胎盤投与による仔雄マウス成獣時前立腺の形態組織学的変化

妊娠 13~18 日目の間、雌 BALB/c マウスに対して、トコフェロール除去済みのコーンオイルに溶解した BPA (20 µg/kg/day) もしくは DES (0.2 µg/kg/day) を強制胃内投与し、生後 1 2 週齢まで育てた。前立腺は上記 3 つの lobe へと微小解剖し、形態組織学的な変化を評価した。

3. BPA 経胎盤投与による仔雄マウス成獣時の前立腺変化に関する遺伝子群の同定

妊娠 13~16 日目の間、雌 C57BL/6 マウスに対して、トコフェロール除去済みのコーンオイルに溶解した BPA (20 µg/kg/day) もしくは DES (0.2 µg/kg/day) を強制胃内投与し、出生前後 (E17, E18, P0) の泌尿生殖洞を回収した。網羅的遺伝子発現変動解析については五十嵐 勝秀 班員に依頼し、Perccellome 手法を適用した Affymetrix 社の Genechip システムによる解析を実施した。

(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

BPA 経皮下投与により成獣マウス前立腺において認められる squamous change は、BPA 経胎盤投与による仔雄マウス成獣時前立腺においても観察された。BPA 経胎盤投与により変化する泌尿生殖洞の遺伝子はケラチン化に関する遺伝子群のほか、性分化に関する SF1 および、その関連遺伝子群であった。すなわち、

1-1. BPA 経皮下投与による成獣マウスの体重と生殖器重量に対する影響

体重について、DES 投与群で有意な体重減少が認められたが、BPA 投与群では変化しなかった。

前立腺について、DES 投与群では AP および DLP の重量が有意に減少したものの、BPA 投与群における影響は認められなかった。精囊腺重量は、DES (2 mg) と 20 mg および 200 mg BPA 処理群において有意に減少した。

1-2. BPA 経皮下投与による成獣マウス前立腺の形態組織学的変化

DES 投与群では、AP において顕著な扁平上皮化生 (squamous metaplasia: SQM) が認められた。SQM とは、CK14 陽性の基

基底上皮細胞が過増殖・重層化し、さらにCK10 発現誘導を伴う変化である。AP とは対照的に、DLP および VP においては基底上皮細胞数の増加（重層化なし）と、CK10 発現誘導が認められるだけであり、これを squamous change と定義付けた。

BPA 投与群では、どの lobe においても腺管構造の形態学的な変化は認められなかった。しかし、>2 mg BPA 投与群の AP と DLP では squamous change が認められた。この変化は BPA の濃度依存的に強く認められ、今回の検討で最も高濃度であった 200 mg BPA 投与群では、すべての lobe で基底上皮細胞が CK10 陽性であった。さらに、BPA による squamous change は、lobe により感受性が異なることも示された (AP>DLP>VP)。

2. BPA 経胎盤投与による仔雄マウス成獣時前立腺の形態組織学的変化

BPA (20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) および DES (0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) 投与群ともに、12 週齢マウス前立腺における腺管構造の形態組織学的な変化は認められなかった。しかし、両群ともに、BPA 経皮下投与による成獣マウス前立腺での変化と同様の squamous change が確認された。

3. BPA 経胎盤投与による仔雄マウス成獣時の前立腺変化に関与する遺伝子群の同定

DES および BPA 投与群ともに、E17 泌尿生殖洞におけるエストロゲン受容体 α の

発現が対照群に比較して有意に高値を示した。BPA 投与群に特徴的な遺伝子発現の変化はケラチン化に関与するものが多かったが、今回、興味深い遺伝子として steroidogenic factor-1 (SF1) が得られた。性分化に強く関与する SF1 の発現上昇に伴い、そのターゲット遺伝子である anti-Mullerian hormone (AMH), AMH receptor 2, Cyp11a1、さらに SF1 の関連遺伝子 Gata4 の発現上昇も認められたことから、胎盤を経て胎児へ移行した BPA は、泌尿生殖洞における SF1 および、その関連遺伝子群の発現変化に大きく関与している可能性が示された。

D. 考察

前立腺の生物学的特性として、1) アンドロゲン依存性、2) 上皮-間質細胞の相互作用、3) 腺内での解剖学的・機能的な異質性が挙げられ、これらの特性と前立腺の異常増殖機構との関連が示唆されている。特に、3) の腺内の異質性 (heterogeneity) について、ヒト前立腺では肥大症結節が transitional zone: TZ (移行領域) から発生し、癌は主に peripheral zone: PZ (辺縁領域) から発生することが知られているが、このような前立腺内における領域特異的な増殖性疾患の発生機序については未だ解明されていない。

本年度の実験動物を用いた検討において、低用量エストロゲン様化学物質 (BPA や DES) に対する感受性は、マウス前立腺

の lobe に特徴的であった (AP>DLP>VP)。そこで、各 lobe におけるエストロゲン受容体 α の mRNA 発現量をリアルタイム PCR により検討したところ、BPA や DES に対する感受性とエストロゲン受容体 α の発現量に強い相関が認められた。さらに、妊娠 13-16 日目の間、BPA や DES に暴露した胎児では泌尿生殖洞におけるエストロゲン受容体 α の発現上昇が確認されており、確かに BPA もエストロゲン受容体 α を介した作用を発揮していることが理解できる。しかし、BPA 経皮下投与による成獣マウス前立腺の形態組織学的変化を観察してみると、いくら投与量を高濃度 (200 mg) に上げてみても、低用量 DES (2 mg) と同じ現象 (squamous metaplasia) は認められない。Genechip 解析の結果でも、BPA 投与により変化する泌尿生殖洞内の遺伝子すべてが DES 投与の結果と一致することはなく、むしろ BPA に特徴的な発現変化が多く認められる。よって、BPA の作用は、合成エストロゲン剤 DES が有するエストロゲン作用の一部と共通しているものの、より特徴的な作用を有する可能性が示唆された。これまで我々は、DES を陽性対照として BPA の作用を検討してきたが、今後、BPA に特徴的な作用を検討する必要があると考えられた。

E. 結論

低用量 BPA に暴露したマウス前立腺では、DES の作用と一部共通した形態組織学的変化 (squamous change) や lobe 特異性

(AP>DLP>VP) を示すため、エストロゲン受容体 α を介した作用が考えられる。しかし、高用量 BPA の投与で DES と同じ形態組織学的変化を示すことはなく、さらに遺伝子発現変化の結果からも、BPA に、より特徴的な作用が存在する可能性が示唆された。我々の検討において、マウス胎児期に低用量 BPA の暴露を受けると、成長後の前立腺でも形態組織学的変化を認めたことから、ヒトにおいても母体が BPA に暴露した場合、中高年で発症する肥大症結節や癌の発生への関与が推察された。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

© Ogura Y, Ishii K, Kanda H, Kanai M, Arima K, Wang YZ, Sugimura Y. Bisphenol A induces permanent squamous change in mouse prostatic epithelium, Differentiation, in press

Uchida K, Kanai M, Yonemura S, Ishii K, Hirokawa Y, Sugimura Y. Proprotein convertases modulate budding and branching morphogenesis of rat ventral prostate. Int J Dev Biol. in press

Iguchi K, Otsuka T, Usui S, Sugimura Y, Hirano K. Correlation between ZIP2

messenger RNA expression and zinc level in rat lateral prostate. *Bio Trace Elem Res.* 112: 159-168 (2006)

Shibahara T, Onishi T, Franco OE, Arima K, Nishikawa K, Yanagawa M, Hioki T, Watanabe M, Hirokawa Y, Shiraishi T, Sugimura Y. A G/A polymorphism in the androgen response element 1 of prostate-specific antigen gene correlates with the response to androgen deprivation therapy in Japanese population. *Anticancer Res.* 26: 3365-3372 (2006)

2. 学会発表

金井優博、石井健一朗、小倉友二、神田英輝、大西毅尚、杉村芳樹：ヒト前立腺癌細胞の可塑性とアンドロゲン感受性：第15回泌尿器科分子・細胞研究会（京都）2006年2月24-25日

◎ 小倉友二、石井健一朗、金井優博、神田英輝、有馬公伸、杉村芳樹：低用量ビスフェノール A がマウス前立腺に与える影響の検討：第94回日本泌尿器科学会総会（福岡）2006年4月12-15日

◎ 神田英輝、石井健一朗、小倉友二、金井優博、金原弘幸、有馬公伸、杉村芳樹：マウス前立腺の形態発生に関連する lobe 特異的な遺伝子の検索：第94回日本泌尿器科学会総会（福岡）2006年4月12-15

日

石井健一朗、Scott B. Shappell, Robert J. Matusik, Simon W. Hayward, 杉村芳樹：組織組み替え実験による前立腺癌発生トランスジェニックマウスの再評価：第94回日本泌尿器科学会総会（福岡）2006年4月12-15日

金井優博、石井健一朗、小倉友二、神田英輝、有馬公伸、杉村芳樹：ヒト前立腺癌細胞株マウス移植モデルの検討-腎被膜下、前立腺部、皮下の3部位に移植して-：第94回日本泌尿器科学会総会（福岡）2006年4月12-15日

◎ 小倉友二、石井健一朗、金井優博、神田英輝、有馬公伸、杉村芳樹：低用量ビスフェノール A がマウス前立腺に与える影響：第2回前立腺生物学シンポジウム（鳥羽）2006年6月15-16日

石井健一朗、Karin Williams、井口和弘、平野和行、Simon W. Hayward、杉村芳樹：前立腺の腺構造構築における前立腺特異抗原の役割：第2回前立腺生物学シンポジウム（鳥羽）2006年6月15-16日

石井健一朗、金井優博、小倉友二、神田英輝、大西毅尚、有馬公伸、杉村芳樹：ヒト前立腺癌細胞のアンドロゲン感受性に依存したパラクラインシグナル応答性：第25回日本アンドロロジー学会総

会（石川県加賀市）2006年7月15-16日 なし

石井健一郎、金井優博、井口和弘、小倉友二、平野和行、有馬公伸、杉村芳樹：
ヒト前立腺癌細胞株のアンドロゲン感受性に依存した間質由来パラクラインシグナル応答性：第65回日本癌学会学術総会（横浜）2006年9月28-30日

井口和弘、石井健一郎、中野 徹、臼井茂之、杉村芳樹、平野和行：限外希釈により単離したホルモン感受性の異なるLNCaP細胞の性状解析：第65回日本癌学会学術総会（横浜）2006年9月28-30日

Kenichiro Ishii, Masahiro Kanai, Kazuhiro Iguchi, Takehisa Onishi, Yuji Ogura, Hideki Kanda, Kiminobu Arima, Kazuyuki Hirano, Yoshiki Sugimura:
Androgen-sensitivity of human prostate cancer cells controls tumor-stromal interactions in vivo: 16th Annual Fall Meeting of the Society for Basic Urologic Research (SBUR) in Phoenix, AZ, 2006年11月16-19日

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）

平成18年度厚生労働省研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
分担研究報告書

低用量曝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 日本バイオアッセイ研究センター所長

研究要旨：内分泌かく乱物質であり、かつ発がん性をもつ α -benzene hexachloride (α -BHC)の低用量曝露による発がんホルミシス現象をマウスを用いて検証した。13-15日齢、雄性 TGF- α トランスジェニックマウスに diethylnitrosamine を 100mg/kg 体重にて、1回腹腔内投与した後、 α -BHC を 0、0.05、0.1、1、500 ppm の用量で 22 週間投与した。病理組織学的に肝腫瘍（肝腺腫と肝細胞がん）の発生はその頻度、個数とも 0 ppm 群に比し、500 ppm 群で有意に増加したが、他の群では差は認められなかった。この事実は、 α -BHC のマウス肝発がん性には閾値が存在することを強く示唆する。しかし、ラット肝発がんでは認められた発がんホルミシス現象は認められなかった。

A. 研究目的

本研究では発がん性をもつ α -BHC の低用量曝露による発がんホルミシス現象をマウスを用いて検証する。

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。これまで我々は肝発がん二段階モデルを用いて α -BHC の発がんホルミシス現象を明らかにした。

Transforming growth factor alpha (TGF- α)は肝細胞の強力な分裂促進作用を有し、human TGF- α トランスジェニックマウス (TGF- α マウス) は肝発がん機序を解析するのに用いられている。この TGF- α マウスでは肝発がん物質である phenobarbital の発がんプロモーション作用が強力に発揮される。

そこで、今回、 α -BHC の低用量曝露での肝発がん作用を TGF- α マウスを用いて検討した。

B. 研究方法

TGF- α マウスを diethylnitrosamine (DEN) でイニシエーションした後、種々の用量の α -BHC を投与し、肝を病理組織学的に検索した。すなわち、13-15日齢、雄性 TGF- α マウス、71匹を用いた。イニシエーターとして DEN を 100mg/kg 体重にて1回、腹腔内投与した後、プロモーションの段階に α -BHC を 0、0.05、0.1、1、500 ppm の用量で混餌投与した。実験開始 22 週にてマウスを屠殺し、肝臓について肝前がん病変ならびに腫瘍の発生を病理組織学的に検索するとともに、血清中 TGF- α レベルを測定した。

(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、実験動物取り扱い規定に対応してマウスを飼育した。

C. 研究結果

肝腫瘍の発生は、 α -BHC, 0 ppm に比較し、500 ppm のみで有意に増加し、1 ppm 以下では差はみられなかった。すなわち、病理組織学的に肝腺腫の発生は対照群 (α -BHC, 0 ppm) の 50% に対して、0.05 ppm から 500 ppm の用量群で 27, 62, 15, 100% と 500 ppm 群で有意に増加したが、他の群では差は認められなかった。肝細胞がんの発生は 500 ppm 群にのみ 100% と有意であった (他のすべての群は 0%)。

また、肝腫瘍の多発性については、対照群 (0.79 ± 0.97) に対して、 α -BHC, 500 ppm 群では 10.56 ± 4.72 と有意に増加した。他の α -BHC 投与群では対照群と比較して全く差がみられなかった。

さらに、肝細胞増殖巣については対照群と α -BHC 投与各群間に差は認められなかった。

血清 TGF- α レベルに関しては α -BHC, 500 ppm 群にのみ対照群に比較して有意に増加した。

D. 考察

肝における α -BHC 投与における腫瘍 (肝腺腫と肝細胞がん) の発生は 0.05-1 ppm の低用量群では対照群と差がなく、500 ppm 群でのみ有意な増加を示した。この事実は、 α -BHC のマウス肝発がん性には閾値が存在することを強く示唆している。しかし、ラット肝発がんにおいて認められた発がんホルミシス現象はみられなかった。このことは、DEN によるイニシエーションが適切な域になかったこと、低用量域における α -BHC の用量、ラットとマウスの発がん感受性の差、および実験に用いた動物数、等が関与している可能性が考えられる。従って、少なくとも匹数を増し、再検討することが望まれる。

また、 α -BHC 高用量の 500 ppm 群で、血清 TGF- α レベルの上昇がみられたこと

は、 α -BHC マウス肝発がんにおいて TGF- α が重要な役割を担っていると考えられる。

E. 結論

本実験において、 α -BHC のマウス肝発がん性には閾値が存在することが強く示唆された。しかし、ラット肝発がんでは認められた発がんホルミシス現象は認められなかった。

F. 健康危険情報

特段なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) ©Wei, M., Hori, T., Wanibuchi, H., Morimura, K., Kang, J.S., Puatanachokchai, R. and Fukushima, S.: Existence of no-observed effect levels for 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline on hepatic preneoplastic lesion development in BN rats. *Cancer Letters*, 231: 304-308, 2006.

2) Romanenko, A., Morimura, K., Kinoshita, A., Wanibuchi, H., Vozianov, A. and Fukushima, S.: Aberrant expression of E-cadherin and β -catenin in association with transforming growth factor- β 1 in urinary bladder lesions in humans after the Chernobyl accident. *Cancer Sci.*, 97: 45-50, 2006.

3) Shen, J., Wanibuchi, H., Waalkes, M. P., Salim, E. I., Kinoshita, A., Yoshida, K., Endo, G. and Fukushima, S.: A comparative study of the sub-chronic toxic effects of three organic arsenical compounds on the urothelium

- in F344 rats; gender-based differences in response. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 210: 171-180, 2006.
- 4) Kang, J. S., Morimura, K., Toda, C., Wanibuchi, H., Wei, M., Kojima, N. and Fukushima, S.: Testicular toxicity of DEHP, but not DEHA, is elevated under conditions of thioacetamide-induced liver damage. *Reproductive Toxicology*, 21: 253-259, 2006.
- 5) Romanenko, A. M., Kinoshita, A., Wanibuchi, H., Wei, M., Zaparin, W. K., Vinnichenko, W. I., Vozianov, A. F. and Fukushima, S.: Involvement of ubiquitination and sumoylation in bladder lesions induced by persistent long-term low dose ionizing radiation in humans. *The Journal of Urology*, 175: 739-743, 2006.
- 6) Hagihara, A., Wanibuchi, H., Puatanachokchai, R., Kang, J. S., Miyazi, N., Seki, S. and Fukushima, S.: Difference in sensitivity of F344 rats from different breeders to phenobarbital hepatocarcinogenicity. *J Toxicol Pathol*, 19: 29-36, 2006.
- 7) Kang, J. S., Waniuchi, H., Morimura, K., Totsuka, Y., Yoshimura, I. and Fukushima, S.: Existence of a no effect level for MelQx hepatocarcinogenicity on background of thioacetamide-induced liver damage in rats. *Cancer Sci*, 97: 453-458, 2006.
- 8) Kushida, M., Aiso, S., Morimura, K., Wei, M., Wanibuchi, H., Nagano, K. and Fukushima, S.: Absence of β -Catenin Alteration in Hepatic Tumors Induced by p-Nitroanisole in Crj:BDF1 Mice. *Toxicologic Pathology*, 34: 237-242, 2006.
- 9) Wanibuchi, H., Wei, M., Karim, M. R., Morimura, K., Doi, K., Kinoshita, A. and Fukushima, S.: Existence of no hepatocarcinogenic effect levels of 2-amino-3, 8-dimethylimidazo [4, 5-f] quinoxaline with or without coadministration with ethanol. *Toxicologic Pathology*, 34: 232-236, 2006.
- 10) Waddell, W. J., Fukushima, S. and Williams, G. M.: Concordance of thresholds for carcinogenicity of N-nitrosodierhylamine. *Arch Toxicol*, 80: 305-309, 2006.
- 11) Uda, N., Kashimoto, N., Sumioka, I., Kyo, E., Sumi, S. and Fukushima, S.: Aged garlic extract inhibits development of putative preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis. *American Society for Nutrition*, 855S-860S, 2006.
- 12) Kitano, M., Chen, Tian-Xin., Morimura, K., Wei, M., Hidaka, T., Hosoe, K. and Fukushima, S.: Biphasic increase of epithelial DNA synthesis in the urinary bladder of rats treated with a tumor promoter, sodium L-ascorbate. *J. Toxicol. Pathol*, 19: 53-56, 2006.
- 13) Kitano, M., Wada, J., Ariki, Y.,