

spontaneous tumors and tumors induced by chemical and radiation exposure [18–23]. In our previous study, incidence of myeloid leukemia was experimentally decreased by caloric restriction [4]. In the present study, particular attention was paid to the timing of caloric restriction, that is, pre- or postirradiation, to determine which would be more effective in preventing development of radiation-induced leukemias, and to determine the underlying mechanism that would play a role in this prevention by caloric restriction. In addition, we speculated that decreased incidence of leukemias may correlate with number of hemopoietic stem/progenitor cells as target cells for leukemic transformation, because caloric restriction in our previous preliminary study decreases the number of HPCs when the restriction was implemented throughout the experimental period [9]. When caloric restriction was implemented from 6 weeks to 10 weeks old only before 3-Gy irradiation [3Gy-CalR(pre)], the incidence of radiation-induced myeloid leukemias was lower than that in the nonrestricted control-diet group [3Gy-CalR(-)] (22.2% vs 16.3% in Table 1). However, there were no statistically significant differences in the incidence of leukemias (Table 1) and in the number of progenitor cells between the 0Gy-CalR(pre) and control diet [0Gy-CalR(-)] groups, evaluated 4 weeks after the dietary change (Fig. 5). On the other hand, the incidence of myeloid leukemias significantly decreased (9.5%) in mice when caloric restriction was started after irradiation and continued throughout their lifespan [3Gy-CalR(post), in Table 1]. This is essentially the same result as that obtained in our previous study [4], although the number of progenitor cells in the 3Gy-CalR(post) group at the time of irradiation was expected to be the same as those in the nonrestricted control diet 0Gy-CalR(-) and 3Gy-CalR(-) groups. On the other hand, 4 weeks of caloric restriction after the age of 10 weeks decreased the number of progenitor cells in the 0Gy-CalR(post) group, which is close to that of hemopoietic progenitor cells in the 0Gy-CalR(through) group [see 0Gy-CalR(through) and 0Gy-CalR(post) groups for reference in Fig. 5].

In the case of preirradiation CalR, 3Gy-CalR(pre) mice were returned to the nonrestricted diet immediately after irradiation. Thus, the body weight of these mice increased rapidly to the non-CalR level after irradiation as compared with that of mice in the restricted diet group [CalR(post) group]. Moreover, the number of progenitor cells in the CalR(pre) group was approximately the same as that in the control diet [0Gy-CalR(-)] group 4 weeks after the dietary change (Fig. 5). After return to the regular non-CalR diet, the HPCs, with or without potential lethal damage caused by the 3-Gy irradiation, may have received strong growth stimulation signals. Consequently, despite return to non-CalR level of HPCs and the negated prevention of myeloid leukemogenesis, the results imply that preirradiation CalR potentially prevented leukemia, which was negated by return to the regular non-CalR diet. Thus, the

results also imply that the effect of CalR during the initiation stage of leukemogenesis may be canceled out by return to non-CalR during the promotion stage of leukemogenesis. Presumably due to the characteristics of the bone marrow function in mice, it was noted that there was no significant difference in the number of CFU-S observed in the femoral bone marrow of mice among experimental treatments in any experimental treatment [24,25]. The reason spleen colonies were assayed was that the contribution of the spleen to radiation-induced leukemias was reported to be more highly significant than that of the bone marrow [24–29]. The bone marrow showed no significant difference in number of progenitor cells (Fig. 5D–F), because external impacts (caloric restriction in the present study) on mice generally cannot change the function of bone marrow significantly, as bone marrow maintains the minimal essential steady-state hematopoiesis fully functional [29]. Our present study of nonlymphoid leukemias specifically focused on myeloid leukemias, which have been presumed to be hemopoietic stem cell diseases [30].

Tessitore and colleagues reported that complete fasting followed by refeeding is responsible for induction of hepatocarcinogenesis in rats by a subnecrogenic dose of carcinogen, possibly due to an enhancement of the rat's growth and that of the growth of aberrant crypt foci in the rat colon and rectum by the carcinogen [31,32]. Repeated fasting/refeeding and caloric restriction in the present study may not have induced comparable growth stimulation; however, caloric restriction and fasting may share possible biological effects on the cell-cycling rate [33–36].

In the present study, the number of target progenitor cells for leukemic transformation may have been lower in the CalR groups than in the non-CalR groups at the time of irradiation. However, the number of such progenitor cells with potential lethal damage may have increased afterward, when the dietary regimen was changed. Consequently, the number of target progenitor cells may have decreased, followed by a rapid increase as observed by Tessitore and colleagues [31,32], which may explain why the 3Gy-CalR(pre) group did not exhibit any significant decrease in the incidence of leukemias. Target cells for radiation-induced leukemogenesis may not be identical to conventionally assayable progenitor cells or CFU-S. However, the number of such target cells may be proportional to the number of progenitor cells and/or CFU-S [37,38]. Thus, we conclude that caloric restriction contributes to the decrease in the incidence of radiation-induced leukemias on the basis of two mechanisms. First, suppression during the initiation stage of direct genotoxic leukemogenesis, i.e., caloric restriction started before irradiation and continued until irradiation. Second, suppression during the promotion stage of indirect epigenetic leukemogenesis, i.e., restriction started after irradiation and continued until death. Furthermore, cell-cycle kinetics in progenitor cells, CFU-S, evaluated by BUUV assay showed a qualitative suppression during the promotion

stage, during which CFU-S in the CalR groups were more quiescent than those in the non-CalR control (74.0% vs 54.0% in quiescence in the bone marrow, and 82.3% vs 68.6% in quiescence in the spleen; opposite to the case of percentage killing), resulting in a lower risk of epigenetic leukemogenesis for these cells. The 0Gy-CalR(-) and CalR(through) groups were evaluated at 50 weeks old, which is the time leukemogenesis generally becomes overt. These findings are compatible with those of Hursting et al. [35], who described that caloric restriction delays spontaneous tumorigenesis in p53 knockout mice due to a decreased amount of cell-cycling fractions in splenocytes and their precursors.

Our results demonstrate that caloric restriction is effective in suppressing the nongenotoxic promotion stage as well as the genotoxic initiation stage of radiation-induced leukemogenesis. Furthermore, from the results of the present study, the mechanisms underlying effects of caloric restriction on suppression of leukemogenesis, can be speculated to have many different aspects. Our present study focused on the number and cell cycling of hemopoietic stem/progenitor cells, despite other preventive factors that may also contribute, such as oncogene expression [39–41], DNA methylation [41], free-radical formation [42], induction of apoptosis [43–46], and activation of immunity [47–51], among others. Several studies of the pathway of insulin signaling and the mechanism underlying the effects of caloric restriction on suppression of tumorigenesis have been reported. Dunn et al. reported that dietary restriction decreased the level of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and the extents of apoptosis, cell proliferation, and tumor progression in p53-deficient mice [52]. The administration of recombinant IGF-1 to CalR mice led to improvement of physiological factors in mice fed a nonrestricted diet [52]. In *Caenorhabditis elegans*, mutation of the *daf-2* gene, in association with that of the *daf-16* gene encoding a member of the insulin receptor signaling molecules, extends the lifespan of the microorganism and confers oxidative stress resistance [53,54]. The *daf-2* gene network also controls longevity by regulating the Mn-SOD (superoxide dismutase)-associated antioxidant defense system [55]. The signal transduction of IGF in *C. elegans* is homologous to that of IGF-1/insulin in mammals. Therefore, the signal-transduction pathway of IGF-1/insulin may be partly involved in the decrease in the incidence of radiation-induced myeloid leukemias following caloric restriction.

In the present study, the incidence of tumors other than myeloid leukemias also decreased statistically significantly in the group in which caloric restriction was started at post-irradiation (Table 1). Caloric restriction limited to the pre-irradiation period, from 6 to 10 weeks old caused a limited decrease in the incidence of myeloid leukemogenesis, implying that for other tumors, caloric restriction suppresses the promotion stage rather than the initiation stage of radiation-induced tumorigenesis. Results of the present study

may contribute to identifying the potential preventive factor comparable to the epidemiological relevancy in atomic bomb survivors. A significant increase in the incidence of tumor-free death to 46.4%, the highest, in the nonirradiated restricted group was observed when caloric intake was restricted from 6 weeks until death, which is the first evidence of an increase in the incidence of tumor-free death with an increase in that of cardiovascular diseases by caloric restriction after irradiation, as confirmed by laborious observations of mice throughout their lifetime.

Acknowledgments

We thank Ms. S. Wada and Ms. K. Nojima of the National Institute of Radiological Sciences and Ms. C. Aoyagi and Ms. H. Aihara of the National Institute of Health Sciences for technical assistance. This work was supported by a special project grant for experimental studies on Radiation Health Detriment and Its Modifying Factors from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

References

1. Beebe GW, Kato H, Land CE. Studies of the mortality of A-bomb survivors: 6. Mortality and radiation dose, 1950–1974. *Radiat Res.* 1978; 75:138–201.
2. The effects on populations of exposure to low levels of ionizing radiation. BEIR. Vol. III. Washington, DC: National Academy Press; 1980. p. 524.
3. Seki M, Yoshida K, Nishimura M, Nemoto K. Radiation-induced myeloid leukemia in C3H/He mice and the effect of prednisolone acetate on leukemogenesis. *Radiat Res.* 1991;127:146–149.
4. Yoshida K, Inoue T, Nojima K, Hirabayashi Y, Sado T. Calorie restriction reduces the incidence of myeloid leukemia induced by a single whole-body radiation in C3H/He mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:2615–2619.
5. Osawa M, Nakamura K, Nishi N, et al. In vivo self-renewal of c-Kit + Sca-1 + Lin(low/-) hemopoietic stem cells. *J Immunol.* 1996;156: 3207–3214.
6. Cronkite EP, Bond VP, Carsten AL, Inoue T, Miller ME, Bullis JE. Effects of low level radiation upon the hematopoietic stem cell: implications for leukemogenesis. *Radiat Environ Biophys.* 1987;26:103–114.
7. Cronkite EP, Inoue T, Bullis JE. Influence of radiation fractionation on survival of mice and spleen colony-forming units. *Radiat Res.* 1994; 138:266–271.
8. Cronkite EP, Inoue T, Hirabayashi Y, Bullis J. Are stem cells exposed to ionizing radiation in vivo as effective as nonirradiated transfused stem cells in restoring hematopoiesis? *Exp Hematol.* 1993;21:823–825.
9. Yoshida K, Inoue T, Hirabayashi Y, Matsumura T, Nemoto K, Sado T. Radiation-induced myeloid leukemia in mice under calorie restriction. *Leukemia.* 1997;11(suppl 3):410–412.
10. Yoshida K, Seki M, Hayata I, Niwa O, Tadokoro K, Tada N. Myeloproliferative disorder due to abnormal production of hematopoietic stimulators. *Leuk Res.* 1987;11:621–627.
11. Frith CH, Ward JM, Harleman JH, et al. Hematopoietic system. In: Mohr U, ed. *International Classification of Rodent Tumors: The Mouse.* Berlin/New York/Heidelberg: Springer-Verlag; 2001. p. 417–451.
12. Seki M, Inoue T. Granulocytic leukemia, mouse. In: Jones TC, Ward JM, Mohr U, Hunt RD, eds. *Hemopoietic System.* Berlin/New York/ Heidelberg: Springer-Verlag; 1990. p. 46–50.
13. Yoshida K, Inoue T, Hirabayashi Y, Nojima K, Sado T. Calorie restriction and spontaneous hepatic tumors in C3H/He mice. *J Nutr Health Aging.* 1999;3:121–126.

14. Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res.* 1961;14: 213–222.
15. Yoshida K, Seki M, Hayata I, Niwa O, Tadokoro K, Tada N. Myeloproliferative disorder due to abnormal production of hematopoietic stimulators. *Leuk Res.* 1987;11:621–627.
16. Hirabayashi Y, Matsumura T, Matsuda M, et al. Cell kinetics of hemopoietic colony-forming units in spleen (CFU-S) in young and old mice. *Mech Ageing Dev.* 1998;101:221–231.
17. Pagano M, Gauvreau K. *Principles of Biostatistics*. 2nd ed. Boston: Duxbury Press; 2000.
18. Visscher MB, Ball ZB, Barnes RH, Sivertsen I. The influence of caloric restriction upon the incidence of spontaneous mammary carcinoma in mice. *Surgery.* 1942;11:48–55.
19. Tannenbaum A. The dependence of the genesis of induced skin tumors on the caloric intake during different stages of carcinogenesis. *Cancer Res.* 1944;4:673–677.
20. Rusch HP, Kline BE, Baumann CA. The influence of caloric restriction and of dietary fat on tumor formation with ultraviolet radiation. *Cancer Res.* 1945;5:431–435.
21. Saxton LA Jr, Boon MC, Furth J. Observations on the inhibition of development of spontaneous leukemia in mice by underfeeding. *Cancer Res.* 1944;4:401–409.
22. Gross L, Dreyfuss Y. Reduction in the incidence of radiation-induced tumors in rats after restriction of food intake. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81:7596–7598.
23. Gross L, Dreyfuss Y. Prevention of spontaneous and radiation-induced tumors in rats by reduction of food intake. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:6795–6797.
24. Upton AC, Wolff FF, Furth J, Kimball AW. A comparison of the induction of myeloid and lymphoid leukemias in x-irradiated RF mice. *Cancer Res.* 1958;18:842–848.
25. Yoshida K, Nojima K, Seki M, Inoue T. Radiation-induced myeloid leukemia following splenectomy in C3H/He mice. *J Radiat Res.* 1996;37:380.
26. Kalpaktsoglou PK, Yunis EJ, Good RA. Early splenectomy and survival of inbred mice. *Nature.* 1967;215:633–634.
27. Moloney WC, King VP. Reduction of leukemia incidence following splenectomy in the rat. *Cancer Res.* 1973;33:573–574.
28. Inoue T, Bullis JE, Cronkite EP, Hubner GE. Relationship between number of spleen colonies and 125I dUrd incorporation into spleen and femur. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80:435–438.
29. Inoue T, Bullis JE, Cronkite EP, Kubo S. Stem cell proliferation and 125I dUrd incorporation into spleen and whole skeletal tissue. *Ann N Y Acad Sci.* 1985;459:162–178.
30. Kogan SC, Ward JM, Anver MR, et al. Bethesda proposals for classification of nonlymphoid hematopoietic neoplasms in mice. *Blood.* 2002;100:238–245.
31. Tessitore L, Tomasi C, Greco M, et al. A subnecrogenic dose of diethylnitrosamine is able to initiate hepatocarcinogenesis in the rat when coupled with fasting/refeeding. *Carcinogenesis.* 1996;17:289–292.
32. Premoselli F, Sesca E, Binasco V, Caderni G, Tessitore L. Fasting/refeeding before initiation enhances the growth of aberrant crypt foci induced by azoxymethane in rat colon and rectum. *Int J Cancer.* 1998;77:286–294.
33. Hikita H, Vaughan J, Pitot HC. The effect of two periods of short-term fasting during the promotion stage of hepatocarcinogenesis in rats: the role of apoptosis and cell proliferation. *Carcinogenesis.* 1997;18: 159–166.
34. Lok E, Nera EA, Iverson F, Scott F, So Y, Clayson DB. Dietary restriction, cell proliferation and carcinogenesis: a preliminary study. *Cancer Lett.* 1988;38:249–255.
35. Hursting SD, Perkins SN, Phang JM. Calorie restriction delays spontaneous tumorigenesis in p53-knockout transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:7036–7040.
36. James SJ, Muskhelishvili L. Rates of apoptosis and proliferation vary with caloric intake and may influence incidence of spontaneous hepatoma in C57BL/6 x C3H F1 mice. *Cancer Res.* 1994;54:5508–5510.
37. Hirabayashi Y, Inoue T, Yoshida K, Inayama Y, Kanisawa M. The detection of normal hidden stem cells during the development of leukemia: assays with PGK isozyme. *Exp Hematol.* 1990;18:7–10.
38. Iwasawa T, Hirabayashi Y, Kubota N, Inoue T, Kakehi M, Matsui K. Hyperthermic purging in vitro of murine leukemia cells (MK-8057): surviving fractions of normal and leukemic stem cells and the long-term survival of mice injected with the post-hyperthermic leukemia cells. *Exp Hematol.* 1991;19:332–337.
39. Nakamura KD, Duffy PH, Lu MH, Turturro A, Hart RW. The effect of dietary restriction on myc protooncogene expression in mice: a preliminary study. *Mech Ageing Dev.* 1989;48:199–205.
40. Himeno Y, Engelman RW, Good RA. Influence of calorie restriction on oncogene expression and DNA synthesis during liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:5497–5501.
41. Hass BS, Hart RW, Lu MH, Lyn-Cook BD. Effects of caloric restriction in animals on cellular function, oncogene expression, and DNA methylation in vitro. *Mutat Res.* 1993;295:281–289.
42. Feuers RJ, Weindruch R, Hart RW. Caloric restriction, aging, and antioxidant enzymes. *Mutat Res.* 1993;295:191–200.
43. James SJ, Muskhelishvili L. Rates of apoptosis and proliferation vary with caloric intake and may influence incidence of spontaneous hepatoma in C57BL/6 x C3H F1 mice. *Cancer Res.* 1994;54:5508–5510.
44. Grasl-Kraupp B, Bursch W, Ruttka-Nedecky B, Wagner A, Lauer B, Schulte-Hermann R. Food restriction eliminates preneoplastic cells through apoptosis and antagonizes carcinogenesis in rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:9995–9999.
45. Lee JH, Jung KJ, Kim JW, Kim HJ, Yu BP, Chung HY. Suppression of apoptosis by calorie restriction in aged kidney. *Exp Gerontol.* 2004;39: 1361–1368.
46. Thompson HJ, Zhu Z, Jiang W. Identification of the apoptosis activation cascade induced in mammary carcinomas by energy restriction. *Cancer Res.* 2004;64:1541–1545.
47. Kharazi AL, James SJ, Taylor JM, Lubinski JM, Naramura LT, Maki-nodan T. Combined chronic low dose radiation –caloric restriction: a model for regression of spontaneous mammary tumor. *Int J Radiat Oncol Bio Phys.* 1994;28:641–647.
48. Kubo C, Day NK, Good RA. Influence of early or late dietary restriction on life span and immunological parameters in MRL/Mp-lpr/lpr mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81:5831–5835.
49. Grossmann A, Maggio-Price L, Jinneman JC, Wolf NS, Rabinovitch PS. The effect of long-term caloric restriction on function of T-cell subsets in old mice. *Cell Immunol.* 1990;131:191–204.
50. Sun D, Krishnan A, Su J, Lawrence R, Zaman K, Fernandes G. Regulation of immune function by calorie restriction and cyclophosphamide treatment in lupus-prone NZB/NZW F1 mice. *Cell Immunol.* 2004;228:54–65.
51. Spaulding CC, Walford RL, Effors RB. The accumulation of non-replicative, non-functional, senescent T cells with age is avoided in calorically restricted mice by an enhancement of T cell apoptosis. *Mech. Ageing dev.* 1997;93:25–33.
52. Dunn SE, Kari FW, French J, et al. Dietary restriction reduces insulin-like growth factor I levels, which modulates apoptosis, cell proliferation, and tumor progression in p53-deficient mice. *Cancer Res.* 1997; 57:4667–4672.
53. Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R. A C. elegans mutant that lives twice as long as wild type. *Nature.* 1993;366:461–464.
54. Ogg S, Paradis S, Gottlieb S, et al. The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in C. elegans. *Nature.* 1997;389:994–999.
55. Honda Y, Honda S. The daf-2 gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J.* 1999;13:1385–1393.

総 説

「環境ホルモン物質」の低用量影響を考える

関 澤 純

徳島大学総合科学部自然システム物質科学

(平成18年5月25日受付)

(平成18年6月14日受理)

はじめに

「内分泌かく乱化学物質」という考えが提起され、これまで毒性学的に注目度が低かった分野の研究が大きく進むきっかけを与えたと同時に、次世代への影響がきわめて低用量で発現する可能性（低用量影響問題）が指摘され多くの人々に未解明の有害影響への不安と関心を誘起した。このため内分泌かく乱化学物質は、環境科学や毒性研究に関わる人々以外に広く関心と呼んだが、国内で「内分泌かく乱化学物質」の同義語として使われた「環境ホルモン物質」という言葉は明確に科学的な定義がされず用いられたため混乱を招き、その余波はまだ続いている。内分泌かく乱化学物質が従来の毒性評価で認められた無毒性量よりもさらに低い投与量で影響があるとする「低用量影響」問題も関係して、わが国では試験管内のエストロゲン活性の検出だけで「環境ホルモン」の危険性を論じる研究者は少なくない。

他方、「環境ホルモン」をめぐる一時期の大騒ぎについて批判的に論ずる向きもあるが、環境や化学分野の専門家の中には生体の制御メカニズムについて十分な理解をもたず、したがって問題の本質を見ずに社会的な発言をされる方もおられる。しかし内分泌攪乱化学物質の問題は以下に記すように、毒性学と化学物質の安全性評価、さらには生体の発達とその制御の分子メカニズムからヒトにおける有害な影響の蓋然性についてより深く考察を進め、リスクの可能性を推測する上で重要なきっかけを与えたというべきである。

筆者は2003年まで国立医薬品食品衛生研究所において20年以上にわたり化学物質の安全性評価に関わる国際協力（国際化学物質安全性計画：IPCS=International Programme on Chemical Safety）に関わり、化学物質のリスク評価の研究を進めてきた。その間を含め厚生労働科

学研究ほかにおいて、内分泌かく乱化学物質の「低用量影響」の検討を進めてきたので、その成果の一部を紹介する。

1. 「低用量影響」問題へのいくつかの国際的な対応

従来、有害性を示す多くの物質（遺伝子障害性を持つ物質は別とされている）については、用量を下げてゆけば毒性が見られなくなる濃度（閾値）があり、動物試験で見られたこの濃度を無毒性量（NOAEL）として、これに十分な安全係数を適用してヒトの許容量が求められてきた（図1）。

しかし内分泌かく乱化学物質は通常の毒性試験で検出される閾値よりも低用量で、生体に有害影響を及ぼす可能性が指摘され（図2）、毒性評価原則の基本が問われた。同時に影響ありとするデータに再現性が見られないため、低用量影響の証拠の確からしさと試験の信頼性が疑われた。

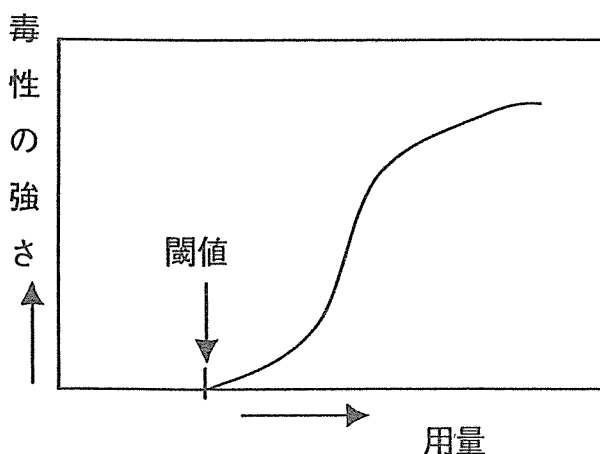


図1 閾値がある場合の毒性試験結果の例

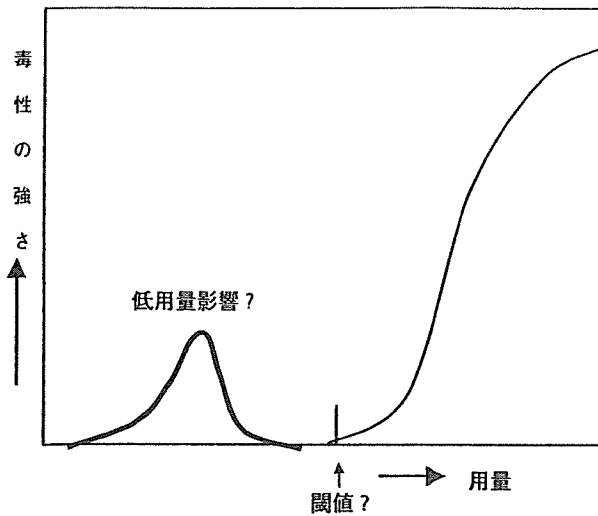


図2 通常の毒性試験における閾値以下の濃度（低用量）での反応の可能性を示す模式図

このため2000年に米国国家毒性試験計画（NTP: National Toxicology Program）は、低用量影響評価ワークショップを開催し、低用量影響を「ヒトの通常の暴露の範囲、または米国環境保護庁が採用している生殖・発生毒性評価の標準試験法で一般に使用される用量よりも低い用量で起こる生物学的変化」と定義した。

ワークショップでは、低用量による健康影響についてもっとも多く報告があるビスフェノール A (BPA)、BPA 以外の環境中エストロゲン物質と Estradiol、アンドロゲンと抗アンドロゲン物質、生物学的因子と試験条件、統計解析と用量-反応モデルの5つの作業班を設け検討した。検討の中でBPAの低用量影響については、NTPの長期毒性試験で観察された体重減少が見られた最小影響量5 mg/kg 体重以下での影響を低用量影響と考えると定義した。ここで、(A) 哺乳動物の研究で得られた生殖・発生エンドポイントについてBPAが低用量影響を示す実験的証拠の強さはどの程度か？(B) BPAが低用量影響を示さないことを証明する実験的証拠の強さはどの程度か？など、7課題について検討した。

(A)の課題については、vom Saalら²⁾のグループの研究など信頼できると認められたBPAの低用量影響の報告がいくつかある。しかしいくつかの研究では、証拠は1種類の用量レベルおよび少数の報告に限定されており、曝露時期、測定された生物学的エンドポイント、それらの機能的意味、またそれらの感度に関する証拠の特異性・一貫性・強さに関する一般化は難しい。他方、Tylら³⁾の研究、Emaら⁴⁾の研究では非常に多くのエンドポイン

トを用いたラットでの多世代試験がなされ、一部のBPA投与群に統計学的に有意な変化が認められたが、これらの観察結果は不規則な用量-反応を示し数値を群間の体重差について補正すると除外されるエンドポイントが多かったことから、多岐に渡るエンドポイントの観察における単なる偶然の変動を表しているにすぎないと考えられた。(B)の課題については、GLP（優良試験所指針）に沿って実施されBPAの低用量影響の不在を証明する多数の研究があり、先にあげたTylとEmaの二つの多世代試験と、vom Saalの研究の1つを正確に再現するため計画された研究を含む非常に大規模な3つの研究が含まれる。これらの研究は一貫性が高く、結論は適正な統計解析により裏付けられておりBPAの影響が存在しないことを確認した。総合すると作業班が特に注目に値すると思ったこれらの研究の長所と統計学的解析力によってもBPAの低用量影響の証拠は見つからなかった。これらの検討の結果、NTP作業班は低用量影響の生物学的な蓋然性を認めたが、毒性学的な意義と試験の再現性については今後さらに検討が必要とする数百頁の報告書をまとめた¹⁾。

2001年に欧州でもより小規模な同様のワークショップが開かれたが「低用量影響」問題の最終的な決着は見られなかった。

IPCSは2002年に国際的な専門家グループの協力により内分泌攪乱化学物質に関する科学的評価の視点を提供する報告書⁵⁾をまとめ、筆者は厚生労働省による翻訳・紹介を支援した。IPCSの専門家グループは、内分泌かく乱自体は有害影響とはみなされない(“endocrine disruption is not considered a toxicological end point per se”)が、有害な影響につながるかも知れない機能上の変化とした。さらにホルモン活性を持つさまざまな物質(Hormonally Active Substances: HAS)と内分泌かく乱化学物質(Endocrine Disrupting Chemicals: EDC)を概念上明確に区別すべきことを指摘したが、このことは議論に混乱を持ち込まないために非常に重要である。

以下にIPCS報告からいくつかの要点を記す。まず内分泌かく乱作用を検討する基礎として、視床下部-脳下垂体-副腎皮質軸、視床下部-脳下垂体-生殖腺軸、視床下部-脳下垂体-甲状腺軸という内分泌系の連関、内分泌系の発生段階におけるプログラミング、性ステロイドホルモンの非生殖系への影響、内分泌系におけるクロストークの存在もあり、個々の化学物質の性ホルモン作用が直ちに生殖系への影響につながるほど単純ではない

とし、化学物質による発生および生殖毒性、神経毒性あるいは免疫毒性の検出と作用機作について紹介している。しかし内分泌系の機能が短期また長期にわたる代謝過程の調節に重要かつ広範囲に及ぶ役割を果たし、成長（骨形成／再生を含む）や、腸・心血管・腎臓の機能やストレスに対する反応と同様に、栄養、行動、発生過程の内分泌系による制御、ホルモン分泌の過剰や不足など内分泌系の乱れは疾病を引き起こし、その影響は様々な異なる器官や機能に及び、時には体の衰弱、生命の危険をもたらすことはありうる。このような観点から内分泌作用をもつ環境化学物質（アゴニストあるいはアンタゴニスト）がもたらす危険の可能性は深刻とも考えられるが、ヒトや野生生物がそのような化学物質にさらされても、暴露される量、期間、時期に大きく依存し必ずしも内分泌系に関係したかく乱が臨床的に現れるとは限らない。

欧州連合食品科学諮問委員会はBPAのリスク評価に、非常に過大なワーストケースシナリオにより、体重70kgの成人の場合、ワインから0.5mg/人/日、缶詰の食品から0.1mg/人/日の合計0.6mg/人/日（0.0086mg/kg体重/日）が一般消費者の曝露量と推定した⁶⁾。リスクの評価では、従来の発達毒性試験からはBPAは発達毒性物質とは認められないが、低用量での影響の有無に関し現時点では証拠的に不確実であるので今後さらに情報収集と試験を継続する必要ありとした。欧州連合食品科学諮問委員会⁷⁾はBPAのラット3世代試験⁸⁾における無毒性量5mg/kg体重/日に種差、個体差のそれぞれ10ずつ、および低用量影響の不確実性について5の合計500の不確実性係数をあてはめて0.01mg/kg体重/日を暫定耐容摂取量とした。

野生生物への影響については低濃度の有機錫への曝露によるある種の巻貝のインボセックスと呼ばれる現象や有機塩素系農薬のDDT代謝物であるDDEによる鳥卵殻の薄化などの事例などその蓋然性を証明する相当確かな証拠が蓄積しつつあるが、北海におけるアザラシの大量死とその体内に蓄積したPCBや有機錫による免疫抑制の関連などについては状況証拠しかなく、汚染と影響の関係は必ずしも明確ではない。人で見られているさまざまな事象とその原因については、精子数の経年的な減少など影響の有無の蓋然性までを含め内分泌作用をもつ環境化学物質への曝露と影響の関係は明確ではないとした。筆者を含むIPCS、EU（欧州連合）、OECD（経済協力開発機構）、US EPA（アメリカ環境保護庁）の専門家グループは内分泌かく乱化学物質を含む環境中の化学物

質による野生生物への影響と人の健康への影響のリスクを統合的に検討する新しい枠組みを検討しており国際トキシコロジー学会ほかで紹介している⁸⁾。従来、健康分野と環境分野は独立に研究を進めてきた。有機スズとDDTでは、野生生物でそれぞれインボセックスと卵殻形成不全が観察され、げっ歯類ではそれぞれ免疫影響と神経毒性が問題とされた。しかし健康への影響と野生生物で観察された現象が一見関連なく見えても、背景にある生物学的なメカニズムや曝露のあり方を検討すると共通する点や異なる点があり、統合的に検討することでリスクの背景を解明し有効な対応につながりうる。

2. 国内での低用量影響の生物学的蓋然性の検討

ホルモン様活性を示す物質が低用量で影響を示すがより高用量でその影響が見られないという現象は多く観察される。この影響が可逆的なもので、生体にとり有害な事象に結びつかないならば問題とはならない。しかしながら生物の発達段階の特定の感受性が高い時期（臨界期）に特定の化学物質（ジエチルベスチルベストールなど）に曝露されると後の段階（たとえば思春期）になって腫瘍が多く見られるという現象がある。このように特定時期の曝露により有害な事象が生起する可能性は、受容体発現のダウンレギュレーションやクロストークという生体内の制御機構の存在により、従来の慢性毒性試験では検出できない場合がありうる。

厚生省は平成10年4月に「内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会」を発足させ当時における科学的な認識と取り組み方針について審議し「中間報告書」をまとめた。さらに国際的な枠組みや他省庁とも協力して健康影響の観点から調査研究と検討を進め、平成14年6月に「中間報告書追補」⁹⁾をまとめたが、筆者らは「中間報告書追補」がまとめられる過程で厚生科学研究「内分泌かく乱化学物質の生体影響に関する研究」を進め、低用量作用につき報告していると考えられる当時最新の重要な文献について、(i)試験条件（試験動物の供給を含む）の違い、(ii)観察条件と観察内容の違い、(iii)未解明のメカニズムによる影響の関与などにつき精査しデータベースに整理し、(i)用量—作用曲線パターン、(ii)閾値の有無、(iii)反応における逆U字現象の有無、(iv)反応における相加・相乗性の有無について問題点を抽出し検討を加えた。

「中間報告書追補」では低用量影響について、再現性

のある実験結果は得られておらず、現時点では低用量域における内分泌かく乱作用を断定することには疑問があるが、受容体を介して起こる低用量域のホルモン様作用は、高用量では受容体自体の発現の低下（ダウンレギュレーション）によって観察され難いことがある。二世世代試験や多世代試験に関する報告では多くの場合内分泌かく乱性が疑われる物質による影響は認められていない。影響が認められている事例は胎生期や新生児に限られているがこれらに着目した低用量域の影響を検出する方法が確立されていない。ジエチルスチルベストロール（DES）のような合成ホルモンで低用量域のホルモン様影響が検出されない事例があり、ホルモン活性を有する物質が再現性をもち陽性反応を示す条件が確立されておらず同一条件下で複数の試験物質を比較できる状態になっていないとした。

NEDO/産総研¹⁰⁾は比較的最近になりBPAについて詳細なリスク評価を行い、曝露評価では尿中濃度からの推計としてBPAの一日摂取量は1～6歳児が最も高く、平均で0.0012mg/kg体重/日（95パーセンタイルで0.004mg/kg体重/日）とした。ここでかなり詳細に曝露情報を集めたと思われるが、以下に記す筆者らの報告¹¹⁾は参照されていない。また毒性評価については2004年までの論文が引用されているにもかかわらず、最近多く見られる低用量での神経行動毒性の論文に関しては一切記述がない。同時期にわれわれが厚生労働科学研究で調査した報告¹²⁾ではこれらの報告について詳しく検討しているので、これらの点でNEDO/産総研の報告はBPAの詳細なリスク評価として文献調査が不十分であり、十分な調査に基づいた場合にはリスク評価の結果は異なってくるのではないかと考えられた。

3. BPAの低用量影響についての筆者らの検討

筆者らは内分泌かく乱化学物質問題は科学的にもわれわれが十分検討しきれておらず、さまざまな角度からの新しい課題を提起したと考え、このうち毒性評価に関連して提示された問題について化学物質によるリスクを検討する際に留意しなければならないも基本的な点を主な焦点にすえて研究を進めてきた。ここでは「低用量影響」をBPAにおける影響の生物学的蓋然性につき筆者らが行った調査研究を紹介する。

平成13年当時までの知見を基にBPAポリマーのポリカーボネート樹脂により成型された血液透析器使用時の

BPA溶出リスクとベネフィットにつき検討した¹³⁾。血液透析器は中空糸膜の中に血液を外側に還流液を循環させて血液中の老廃物や有害物質を濾過・除去する装置であり、腎機能障害の治療に大きな役割を果たしている。ポリカーボネートから成るホローファイバー型血液透析器に水および牛胎児血清を循環、またBPA溶出用の擬似溶媒として17.2%エタノールを用いて検討し血液透析器の使用によるBPA平均曝露レベルとして約0.86μg/回（3回/週）が試算され、この値はほぼ6ng/kg体重/日に相当した。欧州連合食品科学諮問委員会の曝露評価は0.6mg/人/日（0.0086mg/kg体重/日）の値は、過大なワーストケースシナリオによる見積りであり、食品やワイン中のBPAの全量が体内に摂取され未変化のまま標的臓器に到達することはなく、関澤らはBPAに直接曝露される可能性のある人集団として血液透析器を利用する腎機能障害患者における曝露量を実験的に6ng/kg体重/日（欧州連合食品科学諮問委員会の推定の1,400分の1）と推定したが、より実際的な状況において血中に直接入る可能性のある曝露量の推定として信頼性が高いといえる。

1982年のNTP慢性毒性試験レポートではF344ラットまたはB6C3F1マウスの雌雄にBPAは発がん性を持つという証拠は無いとしたが、試験条件下で無毒性量（NOAEL）が認められず低用量（1000ppm）雄ラット群の精巣腫瘍の発生率が有意に上昇していたことから、米国環境保護庁（US EPA）は50mg/kg/日をBPAの最小毒性量（LOAEL）と結論づけ、この値に個体差、種差および亜慢性データから慢性データへの外挿のため10という不確定性係数を採用して50μg/kg/日という経口参照量（RfD）が得られた¹³⁾。いくつかの重要な低用量影響試験報告と影響メカニズムに関する報告を検討したが、雄成熟ラット（13週令）に低用量（20μg/kg体重/日）を6日間経口投与して精巣の一日精子生産量が低下するという報告¹⁴⁾が、当時では十分な用量段階を設定した上でもっとも低用量の曝露による影響を観察した報告と考えられた。

しかし同様条件での低用量影響の報告は無くデータの再現性は保証されておらず、精子生産量に影響が見られた濃度で精巣重量は変化せず萎縮などの病理変化は観察されなかった。精子生産量の低下は用量を10-100倍増やしても25%程度の範囲にとどまり、生殖への有害影響と判断できるかはメカニズムの裏付けと精巣上体に貯蔵される精子数の変化や繁殖への影響などを確かめる必要

があった。さまざまな問題点はあったものの20 μ g/kg 体重/日を取りあえず最小影響量(最小毒性量ではなく)と考へ参考値として用い、1000倍の不確実性係数(最小影響量から無影響量への外挿、種差、個体差にそれぞれ10倍づつを適用して20ng/kg 体重/日が導かれた。前記の曝露レベルは不確実性を大幅に見積もった20ng/kg 体重・日に至らず、またUS EPAのRfDと大きな開きがあった。

ベネフィット要因としては、血液透析器は現在腎機能患者(145,000人)の治療に使われ救命的役割を果たしており、これまで使用されている医療具に勝る安全性と有効性が保証された器具の開発を推進する傍ら、有用性が認められ広く用いられている器具の安全レベルを保証する研究は重要である。血液透析は腎機能障害を抱える患者らにとり欠かすことができない医療処置であり医療器具を用いることにより意図せぬ有害影響が生じる可能性を的確に予測し、未然にその発生を防ぐ手当てがとられなければならないと筆者らは報告した¹⁵⁾。

引き続きビスフェノールAについて多くの研究が精力的になされており、低用量影響問題に関し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¹²⁾。NTPが2000年の低用量影響評価ワークショップで検討した以降の2000年から2004年の5年間に報告された168件の文献について、低用量影響データの有無を確認し12名の専門家の協力を得てレビューとデータベースを作成した(表1, 2)。

その結果、この間に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が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のほか、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⁾、免疫系や神経系への影響、それも胎生期、授乳期暴露についての報告が急増しており、³⁾肝臓等における中間代謝産物はBPAよりも強いエストロゲン様活性を有する可能性があり⁴⁾、サルとげっ歯類で吸収・分布・代謝・排泄に違いがありヒトへの低用量でのリスクを考える上で考慮を要すると考えられた。さらにMEDLINE(2004年3月31日から2005年9月23日まで)で検索し得られた489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得られた135報についても解析を進めた。神経行動影響の一例をあげると、Kuboら¹⁶⁾はラットの胎児・乳児期に母獣の30 μ g/kg/日の曝露により、open-field behaviorの活発化、脳内locus coeruleus(LC) volumeの増加、青斑核内の

表1 Bisphenol Aの低用量影響文献調査

文献検索	
PubMedで2000-2004年発表の文献を検索・収集:	216件
水棲生物への影響分析の文献などは除外:	168件
さらに2005年も追加的に調査:	113件
データベース化	
低用量影響の有無の確認とデータの検討	
低用量影響の有無に関しクリティカルな文献の確認とデータの詳細な検討	
低用量影響の生物学的蓋然性の検討と結論の提示	
影響メカニズムと用量-反応関係の考察に基づく検討	

表2 データベースのフォーマット

文献番号:	
著者名:	
論文題名:	
出典:	
チェック項目:	1. 対象生物, 2. 影響の標的臓器, 3. 影響の種類, 4. 曝露方法, 5. 曝露時期, 6. 曝露濃度 用量段階を記入, 7. 観察された影響の種類と濃度: 8. 観察時期 9. 論文中に低用量影響への関心, 10. 試験の信頼性
論文の概要:	(200~400字)
添付資料:	文献の内容を理解する上で重要な図表
評価者のコメント:	統計的な信頼性など報告の信頼性について記述

ニューロン数の雌雄差逆転、性行動頻度の低下などを観察しており、その他の最近の研究報告を参照すると、従来、問題が指摘されてきたエストロゲン作用以外に、神経・行動面で影響の可能性が否定できず、ヒトにおけるこの方面の影響の蓋然性が十分検討されるべきであると思われる。

5. まとめ 一内分泌かく乱化学物質の低用量影響リスクを検討する上での今後の課題一

BPAについてはここ数年胎生期、授乳期暴露による神経系への影響の報告が急増し、この点に着目して検討した。個体レベルでは生殖器系への影響に関する報告が減り周産期の一過性曝露による神経系への影響に関する報告が相対的に多い。細胞レベルではさまざまな報告があり遺伝子発現の網羅的解析も散見された。周産期は神経系の器官形成期で最もホルモン感受性が強い時期であり、行動レベルでの性差の消失と組織学的に青斑核やBed nucleusの性差の消失に関する報告があるが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 5 mg/kg bw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。

社会的にインパクトを与えた点で類似した面があるが、20年以上前に変異原性試験が発癌性のスクリーニングに使えるとされ、食品中の焼けこげ物質が強い変異原性を示すことから人の発癌への寄与が疑われた。その後の研究により毎日数キログラムの焼けこげ物質を食べない限りヒトの発癌はあり得ないことが示された。試験管内の実験結果からは影響の可能性の示唆は得られても本当のリスクの大きさはわからないが、同時に、変異原性に関する研究の多くは発癌メカニズムの理解に貢献した。

「内分泌かく乱化学物質」のリスクについて考えるにはまず科学的なリスク評価の基本について知ることが重要であろう。厚生労働科学研究班では、生殖系のみならず神経系、免疫系への影響を含め、高次生命機能における複雑な相互作用と、またそれを支える分子機構にメスを入れ、受容体間のクロストーク、シグナル伝達や遺伝子発現の制御と内分泌関連機能かく乱の生物学的な蓋然性について検討を重ねてきた。内分泌関連機能は環境要因、あるいは内因性のストレスに対する生体の防御や恒常性機能に深く関係している。毒作用と薬理作用の境界にもかわり、影響の可逆性、天然の物質とりわけ食品に含まれているような生体活性物質による作用と生体恒常性の関連なども今後さらに検討されねばならない。毒性学的には試験法や適切なエンドポイントの選択とも関連し、発生段階におけるクリティカルウィンドウの問題のより精細なメカニズムを解明してゆかねばならない¹⁷⁾。最後に、毒性学およびリスク評価の立場から内分泌かく乱化学物質のリスク評価の原点について以下の諸点を確認しておく。

- (A) リスク評価は予測の科学と方法であり、リスク評価における不確実性の存在を前提に判断根拠を明確にしつつ評価を行い、不確実性についてはその要因と範囲を明示する。
- (B) 定量的に現象をとらえるとともに、試験条件および結果の限界を理解する。
- (C) 生物における知見をメカニズムの考察を基に総合的に検討し、単なる影響と有害影響を区別する。
- (D) 人におけるリスクの可能性を、人における曝露や生物学的な蓋然性の検討データに基づき検証する。

謝辞とお断り

本稿の基礎となった研究は厚生労働省の研究費により支援を受けた。ここに記して感謝する。

本稿は、筆者が第232回徳島医学会学術集会（冬期）での講演を基に「ホルモンと臨床」誌に寄稿した論文¹⁷⁾に加筆したものである。

文 献

- 1) NTP: National Toxicology Program's Report of the Endocrine Disruptors Low Dose Peer Review, National Toxicology Program/National Institute of Environmental Health Sciences, <http://ntp-server.niehs.nih.gov/htdocs/liason/Low Dose Peer Final Rpt. pdf>, August 2001, 2001
- 2) vom Saal, F. S., Timms, B. G., Montano, M. M., Palanza, P. P., *et al.*: Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94: 2056-2061, 1997
- 3) Tyl, R. W., Myers, C. B., Marr, M. C., Thomas, B. F., *et al.*: Three generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Sci.*, 68: 121-146, 2002
- 4) Ema, M., Fujii, S., Furukawa, M., Kiguchi, M., *et al.*: Rat two-generation reproductive toxicity study of bisphenol A. *Reprod. Toxicol.*, 15: 505-523, 2001
- 5) IPCS: Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors, WHO/IPCS/ EDC/02. 2, World Health Organization, Geneva, 2002: 厚生労働省による邦訳紹介ウェブページ: <http://www.nihs.go.jp/edc/global-doc/index.html>
- 6) European Chemicals Bureau: European Union Risk Assessment, Volume 37 4,4'-isopropyl idenediphenol (bisphenol-A), European Commission. Joint Research Centre, EUR 20843 EN, 2003
- 7) SCF: Opinion of the Scientific Committee on Food on Bisphenol A. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/index_en.html, 2002
- 8) Suter, G., Vermeire, T., Munns, W. R., Sekizawa, J.: Framework for the integration of health and ecological risk assessment. *Human and Ecological Risk*

- Assessment, 9(1) : 281-302, 2003
- 9) 内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会中間報告追補：内分泌かく乱化学物質問題の現状と今後の取組，化学工業日報社，東京，2002，pp.384
- 10) NEDO/産総研：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・産総研化学物質リスク管理研究センター共編，丸善株式会社，東京，2005，pp.267
- 11) 関澤 純，配島由二，土屋利江：ビスフェノールA重合樹脂成型血液透析器使用のリスク・ベネフィット分析，日本リスク研究学会第14回研究発表会講演論文集，2001，pp.73-76
- 12) 関澤 純：ビスフェノールAの低用量影響評価の検討と評価情報データベースの作成，「平成16，17年度厚生労働科学研究内分泌かく乱化学物質の生体影響メカニズムに関する総合研究」報告（井上達代表），2005，2006
- 13) NTP:Carcinogenesis Bioassay of Bisphenol A (CAS No.80-05-7)in F344 Rats and B6C3F₁ Mice (Feed Study), TR-215, US DHHS, NIH, 1982
- 14) Sakaue, M., Ohsako, S., Ishimura, R., Kurosawa, S., *et al* : Bisphenol A affects spermatogenesis in the adult rat even at low dose. *J. Occup. Health*, 43:185-190, 2001
- 15) 関澤 純：低用量問題－低用量影響の生物学的蓋然性，生体統御システムと内分泌攪乱（井上達・井口泰泉編），シュプリンガーフェアラーク，東京，2005，pp.297-314
- 16) Kubo, K., Arai, O., Omura, M., Watanabe, R., *et al* : Low dose effects of bisphenol A on sexual differentiation of the brain and behavior in rats. *Neurosci. Res.*, 45(3) :345-56, 2003
- 17) 関澤 純：内分泌かく乱化学物質による低用量影響の考え方．ホルモンと臨床, 54(3) :209-214, 2006

What are the problems of low-dose effects of endocrine disruptors?

Jun Sekizawa

Faculty of Integrated Arts and Sciences, The University of Tokushima, Tokushima, Japan

SUMMARY

Low-dose effects of endocrine disruptors has raised much concern of both experts and general public. It is partly because the word "Kankyo hormone", used popularly in Japan as a synonym for endocrine disruptors without any scientific definition, misled people. However so called low-dose effects of the endocrine disruptors presented a new challenge to the basic notion of the threshold in toxicology, and the risk assessment of chemicals. Although hormonally active substances can potentially cause some effects at low doses, it should be addressed whether the effects are adverse to health and/or developmentally irreversible. Recently, a number of literatures reported that perinatal exposure to bisphenol A can cause neurobehavioral effects to rats and mice at low doses, which were not considered before. In this review, the author introduces new findings on low-dose effects from a research project supported by the Ministry of Health, Labor and Welfare, together with the outputs from international activities related to this subject.

Key words : endocrine disruptor, low-dose effect, neurobehavioral effect, bisphenol A, perinatal exposure

内分泌かく乱化学物質による低用量影響の蓋然性
Biological Plausibility of Low-Dose Effects of Endocrine Disruptors

関澤 純 徳島大学総合科学部

Jun SEKIZAWA, Faculty of Integrated Arts and Sciences, University of Tokushima

1. はじめに

「内分泌かく乱化学物質」という考えが提起され、これまで毒性学的に注目度が低かった分野の研究が大きく進むきっかけを与えたと同時に、次世代への影響がきわめて低用量で発現する可能性(低用量影響問題)が指摘され多くの人々に未解明の有害影響への不安と関心を誘起した。このため内分泌かく乱化学物質は、環境科学や毒性研究に関わる人々以外に広く関心と呼んだが、国内で「内分泌かく乱化学物質」の同義語として使われた「環境ホルモン物質」という言葉は明確に科学的な定義がされず用いられたため混乱を招き、その余波はまだ続いている。内分泌かく乱化学物質が従来の毒性評価で認められた無毒性量よりもさらに低い投与量で影響があるとする「低用量影響」問題も関係して、わが国では試験管内のエストロゲン活性の検出だけで「環境ホルモン」の危険性を論じる研究者は少なくない。

他方、「環境ホルモン」をめぐる一時期の大騒ぎについて批判的に論ずる向きもあるが、環境や化学分野の専門家の中には生体の制御メカニズムについて十分な理解をもたず、したがって問題の本質を見ずに社会的な発言をされる方もおられる。しかし内分泌攪乱化学物質の問題は以下に記すように、毒性学と化学物質の安全性評価、さらには生体の発達とその制御の分子メカニズムからヒトにおける有害な影響の蓋然性についてより深く考察を進め、リスクの可能性を推測する上で重要なきっかけを与えたというべきである。

筆者は2003年まで国立医薬品食品衛生研究所において20年以上にわたり化学物質の安全性評価に関わる国際協力(国際化学物質安全性計画:IPCS=International Programme on Chemical Safety)に関わり、化学物質のリスク評価の研究を進めてきた。その間を含め厚生労働科学研究ほかにおいて、内分泌かく乱化学物質の「低用量影響」の検討を進めてきたので、その成果の一部を紹介する。

2. 「低用量影響」問題へのいくつかの国際的な対応

じゅうらい有害性を示す多くの物質(遺伝子障害性を持つ物質は別とされている)については、用量を下げれば毒性が見られなくなる濃度(閾値)があり、動物試験で見られたこの濃度を無毒性量として、これに十分な安全係数を適用してヒトの許容量が求められてきた(図1)。

しかし内分泌かく乱化学物質は通常毒性試験で検出される閾値よりも低用量で、生体に有害影響を及ぼす可能性が指摘され(図2)、毒性評価原則の基本が問われた。同時に影響ありとするデータに再現性が見られないため、低用量影響の証拠の確からしさと試験の信頼性が疑われた。

このため2000年にアメリカ国家毒性試験計画(NTP:National Toxicology Program)は、低用量影響評価ワークショップを開催(NTP, 2001)し、低用量影響を「ヒトの通常の暴露の範囲、または米国環境保護庁が採用している生殖・発生毒性評価の標準試験法で一般に使用される用量よりも低い用量で起こる生物学的変化」と定義した。

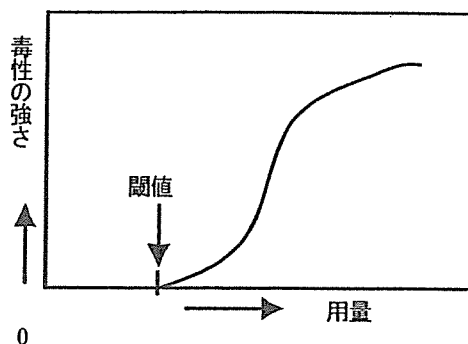


図1 閾値がある場合の毒性試験結果の例

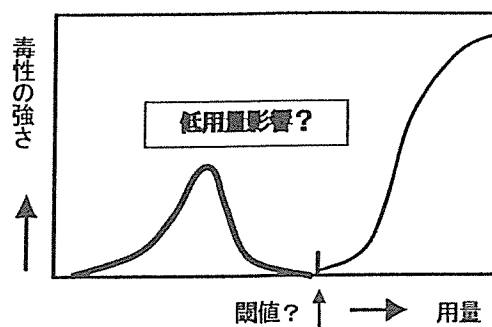


図2 通常の毒性試験における閾値以下の濃度 (低用量)での反応の可能性を示す模式図

ワークショップでは、ビスフェノールA(BPA)、BPA 以外の環境中エストロゲン物質と Estradiol、アンドロゲンと抗アンドロゲン物質、生物学的因子と試験条件、統計解析と用量-反応モデルの5つの作業班を設け検討した。検討の中でBPAの低用量影響については、NTPの長期毒性試験で観察された体重減少が見られた最小影響量 5mg/kg 体重以下での影響を低用量影響と考えると定義した。ここで、(A) 哺乳動物の研究で得られた生殖・発生エンドポイントについて BPA が低用量影響を示す実験的証拠の強さはどの程度か？(B) BPAが低用量影響を示さないことを証明する実験的証拠の強さはどの程度か？など、7課題について検討した。

(A)の課題については、vom Saalら(1997)のグループの研究など信頼できると認められたBPAの低用量影響の報告がいくつかある。しかしいくつかの研究では、証拠は1種類の用量レベルおよび少数の報告に限定されており、曝露時期、測定された生物学的エンドポイント、それらの機能的意味、またそれらの感度に関する証拠の特異性・一貫性・強さに関する一般化は難しい。他方、Tylら(2002)の研究、Emaら(2001)の研究では非常に多くのエンドポイントを用いたラットでの多世代試験がなされ、一部のBPA投与群に統計学的に有意な変化が認められたが、これらの観察結果は不規則な用量-反応を示し数値を群間の体重差について補正すると除外されるエンドポイントが多かったことから、多岐に渡るエンドポイントの観察における単なる偶然の変動を表しているにすぎないと考えられた。(B)の課題については、GLP(優良試験所指針)に沿って実施されBPAの低用量影響の不在を証明する多数の研究があり、先にあげたTylとEmaの二つの多世代試験と、vom Saalの研究の一つを正確に再現するため計画された研究を含む非常に大規模な3つの研究が含まれる。これらの研究は一貫性が高く、結論は適正な統計解析により裏付けられておりBPAの影響が存在しないことを確認した。総合すると作業班が特に注目に値すると思ったこれらの研究の長所と統計学的解析力によってもBPAの低用量影響の証拠は見つからなかった。これらの検討の結果、NTP作業班は低用量影響の生物学的な蓋然性を認めたが、毒性的な意義と試験の再現性については今後さらに検討が必要とする数百頁の報告書をまとめた(NTP, 2001)。

2001年に欧州でもより小規模な同様のワークショップが開かれたが「低用量影響」問題の最終的な決着は見られなかった。

IPCSは2002年に国際的な専門家グループの協力により内分泌攪乱化学物質に関する科学的評価の視点を提供する報告書をまとめ、筆者は厚生労働省による翻訳・紹介を支援した(IPCS, 2002)。IPCSの専門家グループは、内分泌かく乱自体は有害影響とはみなされない("endocrine disruption is

not considered a toxicological end point per se”が、有害な影響につながるかも知れない機能上の変化とした。さらにホルモン活性を持つさまざまな物質 (Hormonally Active Substances : HAS) と 内分泌かく乱化学物質 (Endocrine Disrupting Chemicals : EDC)を概念上明確に区別すべきことを指摘したが、このことは議論に混乱を持ち込まないために非常に重要である。

以下に IPCS 報告からいくつかの要点を記す。まず内分泌かく乱作用を検討する基礎として、視床下部—脳下垂体—副腎皮質軸、視床下部—脳下垂体—生殖腺軸、視床下部—脳下垂体—甲状腺軸という内分泌系の連関、内分泌系の発生段階におけるプログラミング、性ステロイドホルモンの非生殖系への影響、内分泌系におけるクロストークの存在もあり、個々の化学物質の性ホルモン作用が直ちに生殖系への影響につながるほど単純ではないとし、化学物質による発生および生殖毒性、神経毒性あるいは免疫毒性の検出と作用機作について紹介している。しかし内分泌系の機能が短期また長期にわたる代謝過程の調節に重要かつ広範囲に及ぶ役割を果たし、成長(骨形成/再生を含む)や、腸・心血管・腎臓の機能やストレスに対する反応と同様に、栄養、行動、発生過程の内分泌系による制御、ホルモン分泌の過剰や不足など内分泌系の乱れは疾病を引き起こし、その影響は様々な異なる器官や機能に及び、時には体の衰弱、生命の危険をもたらすことはありうる。このような観点から内分泌作用をもつ環境化学物質(アゴニストあるいはアンタゴニスト)がもたらす危険の可能性は深刻とも考えられるが、ヒトや野生生物がそのような化学物質にさらされても、暴露される量、期間、時期に大きく依存し必ずしも内分泌系に関係したかく乱が臨床的に現れるとは限らないとした。

欧州連合食品科学諮問委員会は BPA のリスク評価において、過大なワーストケースシナリオにより、体重 70 kg の成人の場合、ワインから 0.5mg/人/日、缶詰の食品から 0.1mg/人/日の合計 0.6mg/人/日 (0.0086 mg/kg 体重/日) が一般消費者の曝露量と推定した(European Chemicals Bureau, 2003)。リスクの評価では、従来の発達毒性試験からは BPA は発達毒性物質とは認められないが、低用量での影響の有無に関し現時点では証拠的に不確実であるので今後さらに情報収集と試験を継続する必要ありとした。

野生生物への影響については低濃度の有機錫への曝露によるある種の巻貝のインボセックスと呼ばれる現象や有機塩素系農薬の DDT 代謝物である DDE による鳥卵殻の薄化などの事例などその蓋然性を証明する相当確かな証拠が蓄積しつつあるが、北海におけるアザラシの大量死とその体内に蓄積した PCB や有機錫による免疫抑制の関連などについては状況証拠しかなく、汚染と影響の関係は必ずしも明確ではない。人で見られているさまざまな事象とその原因については、精子数の経年的な減少など影響の有無の蓋然性までを含め内分泌作用をもつ環境化学物質への曝露と影響の関係は明確ではないとした。筆者を含む IPCS, EU(欧州連合), OECD (経済協力開発機構), US EPA (アメリカ環境保護庁)の専門家グループは内分泌かく乱化学物質を含む環境中の化学物質による野生生物への影響と人の健康への影響のリスクを統合的に検討する新しい枠組みを検討しており国際トキシコロジー学会ほかで紹介している(Suter ら, 2003)。

3. 国内での低用量影響の生物学的蓋然性の検討

ホルモン様活性を示す物質が低用量で影響を示すがより高用量でその影響が見られないという現象は多く観察される。この影響が可逆的なもので、生体にとり有害な事象に結びつかないならば問題とはならない。しかしながら生物の発達段階の特定の感受性が高い時期 (臨界期) に特定の化学物質 (ジエチルベスチルベストロールなど) に曝露されると後の段階 (たとえば思春期) になって

腫瘍が多く見られるという現象がある。このように特定時期の曝露により有害な事象が生起する可能性は、受容体発現のダウンレギュレーションやクロストークという生体内の制御機構の存在により、従来の慢性毒性試験では検出できない場合がありうる。

厚生省は平成 10 年 4 月に「内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会」を発足させ当時における科学的な認識と取り組み方針について審議し「中間報告書」をまとめた。さらに国際的な枠組みや他省庁とも協力して健康影響の観点から調査研究と検討を進め、平成 14 年 6 月に「中間報告書追補」(内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会、2002)をまとめたが、筆者らは「中間報告書追補」がまとめられる過程で厚生科学研究「内分泌かく乱化学物質の生体影響に関する研究」を進め、低用量作用につき報告していると考えられる当時最新の重要な文献について、(i) 試験条件(動物を含む)の違い、(ii) 観察条件と観察内容の違い、(iii) 未解明のメカニズムによる影響の関与などにつき精査しデータベースに整理し、(i) 用量-作用曲線パターン、(ii) 閾値の有無、(iii) 反応における逆U字現象の有無、(iv) 反応における相加・相乗性の有無について問題点を抽出し検討を加えた。

「中間報告書追補」では低用量影響について、再現性のある実験結果は得られておらず、現時点では低用量域における内分泌かく乱作用を断定することには疑問があるが、受容体を介して起こる低用量域のホルモン様作用は、高用量では受容体自体の発現の低下(ダウンレギュレーション)によって観察されることがある。成人女性の体内にはもともとホルモンが大量に存在するにもかかわらず生理的には安定であることについてメカニズムが解明されていない。二世代試験や多世代試験に関する報告では多くの場合内分泌かく乱性が疑われる物質による影響は認められていない。影響が認められている事例は胎生期や新生児に限られているがこれらに着目した低用量域の影響を検出する方法が確立されていない。ジェチルスチルベストロール(DES)のような合成ホルモンで低用量域のホルモン様影響が検出されない事例があり、ホルモン活性を有する物質が再現性をもち陽性反応を示す条件が確立されておらず同一条件下で複数の試験物質を比較できる状態になっていないとした。

NEDO/産総研は比較的最近になり BPA について詳細なリスク評価を行い、曝露評価では尿中濃度からの推計として BPA の一日摂取量は 1~6 歳児が最も高く、平均で 0.0012 mg/kg 体重/日(95 パーセンタイルで 0.004 mg/kg 体重/日)とした(NEDO/産総研、2005)。ここでかなり詳細に曝露情報を集めたと見られるが、以下に記す筆者らの報告(関澤ら、2001)は参照されていない。また毒性評価については 2004 年までの論文が引用されているにもかかわらず、最近多く見られる低用量域での神経行動毒性の論文に関しては一切記述がない。同時期にわれわれが厚生労働科学研究で調査した報告(関澤、2005、2006)ではこれらの報告について詳しく検討しているので、これらの点で NEDO/産総研の報告は BPA の詳細リスク評価として文献調査が不十分であり、十分な調査に基づいた場合にはリスク評価の結果論は異なってくるのではないかと考えられた。

4. BPA の低用量影響についての筆者らの検討

筆者らは内分泌かく乱化学物質問題は科学的にもわれわれが十分検討しきれておらず、さまざまな角度からの新しい課題を提起したと考え、このうち毒性評価に関連して提示された問題について化学物質によるリスクを検討する際に留意しなければならないも基本的な点を主な焦点にすえて研究を進めてきた。ここでは「低用量影響」を BPA における影響の生物学的蓋然性につき筆者らが行った調査研究を紹介する。

平成 13 年当時までの知見を基に BPA ポリマーのポリカーボネート樹脂により成型された血液透析器使用時の BPA 溶出リスクとベネフィットにつき検討した(関澤ら、2001)。血液透析器は中空糸膜の中に血液を外側に還流液を循環させて血液中の老廃物や有害物質を濾過・除去する装置であり、腎機能障害の治療に大きな役割を果たしている。ポリカーボネートから成るホローファイバー型血液透析器に水および牛胎児血清を循環、また BPA 溶出用の擬似溶媒として 17.2%エタノールを用いて検討し血液透析器の使用による BPA 平均曝露レベルとして約 0.86 $\mu\text{g}/\text{回}$ (3 回/週)が試算され、この値はほぼ 6 ng/kg 体重・日に相当した。欧州連合食品科学諮問委員会の曝露評価は 0.6mg/人/日 (0.0086 mg/kg 体重/日)の値は、過大なワーストケースシナリオによる見積りであり、食品やワイン中の BPA の全量が体内に摂取され未変化のまま標的臓器に到達することはなく、筆者らはもっとも高濃度の BPA に直接曝露される可能性のある人集団として血液透析器を利用する腎機能障害患者における曝露量を実験的に 6 ng/kg 体重/日 (欧州連合食品科学諮問委員会の推定の 1,400 分の 1) と推定しており、より実際の状況における最大曝露量の推定として信頼性が高いといえる。

リスク要因では 1982 年の NTP 慢性毒性試験レポートでは F344 ラットまたは B6C3F₁ マウスの雌雄に BPA は発がん性を持つという証拠は無いとしたが、試験条件下で無毒性量 (NOAEL) が認められず低用量 (1000ppm) 雄ラット群の精巣腫瘍の発生率が有意に上昇していたことから、アメリカ環境保護庁 (US EPA) は 50mg/kg/日を BPA の最小毒性量 (LOAEL) と結論づけ、この値に個体差、種差および亜慢性データから慢性データへの外挿のため 10 という不確実性係数を採用して 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ という経口参照量 (RfD) が得られた (NTP, 1982)。いくつかの重要な低用量影響試験報告と影響メカニズムに関する報告を検討したが、雄成熟ラット (13 週令) に低用量 (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日) を 6 日間経口投与して精巣の一日精子生産量が低下するという報告 (Sakaue ら、2001) が当時では十分な用量段階を設定した上でもっとも低用量の曝露による影響を観察した報告と考えられた。

しかし同様条件下での低用量影響の報告は無くデータの再現性は保証されておらず、精子生産量に影響が見られた濃度で精巣重量は変化せず萎縮などの病理変化は観察されなかった。精子生産量の低下は用量を 10-100 倍増やしても 25% 程度の範囲にとどまり生殖への有害影響と判断できるかはメカニズムの裏付けと精巣上体に貯蔵される精子数の変化や繁殖への影響などを確かめる必要があった。さまざまな問題点はあったものの 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日をとりあえず最小影響量 (最小毒性量ではなく) と考え参考値として使い、1000 倍の不確実性係数 (LOEL から NOEL への外挿、種差、個体差にそれぞれ 10 倍づつを適用して 20 ng/kg 体重・日) が導かれた。前記の曝露レベルは不確実性を大幅に見積もった 20 ng/kg 体重・日に至らず、また US EPA の RfD と大きな開きがあった。

ベネフィット要因としては、血液透析器は現在腎機能患者 (145,000 人) の治療に使われ救命的役割を果たしており、これまで使用されている医療具に勝る安全性と有効性が保証された器具の開発を推進する傍ら、有用性が認められ広く用いられている器具の安全レベルを保証する研究は重要である。血液透析は腎機能障害を抱える患者らにとり欠かすことができない医療処置であり医療器具を用いることにより意図せぬ有害影響が生じる可能性を的確に予測し、未然にその発生を防ぐ手だてがとられなければならないと当時筆者らは報告した (関澤、2005)。

引き続きビスフェノール A について多くの研究が精力的になされており、低用量影響問題に関し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 (関澤、2005; 2006)。NTP が 2000 年の低用量影響評価ワークショップで検討した以降の 2000 年から 2004 年の 5 年間に報告された 168 件の文献について、低用量影響データの有無を確認し 12 名の専門家の協力を得てレビューとデータベースを作成した (表 1、2)。

その結果、この間に生殖系への影響については低用量作用を否定する論文が増えているが、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のほか、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)免疫系や神経系への影響、それも胎生期、授乳期暴露についての報告が急増しており、3)肝臓等における中間代謝産物はBPAよりも強いエストロゲン様活性を有する可能性があり、4)サルとげっ歯類で吸収・分布・代謝・排泄に違いがありヒトへの低用量でのリスクを考える上で考慮を要すると考えられた。さらにMEDLINE(2004年3月31日から2005年9月23日まで)で検索し得られた489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得られた135報についても解析を進めた。神経行動影響の一例をあげると、Kuboら(2003)はラットの胎児・乳児期に母獣の30 μ g/kg/日の曝露により、open-field behaviorの活発化、脳内 locus coeruleus (LC) volumeの増加、青斑核内のニューロン数の雌雄差逆転、性行為頻度の低下などを観察しており、その他の最近の研究報告を参照すると、じゅうらい問題が指摘されてきたエストロゲン作用以外に、神経・行動面で影響の可能性が否定できず、ヒトにおけるこの方面の影響の蓋然性が十分検討されるべきであると思われる。

表1 Bisphenol Aの低用量影響文献調査

文献検索

PubMedで2000-2004年発表の文献を検索・収集：216件
 水棲生物への影響分析の文献などは除外：168件
 さらに2005年も追加的に調査：113件

データベース化

低用量影響の有無の確認とデータの検討
 低用量影響の有無に関しクリティカルな文献の確認とデータの詳細な検討
 低用量影響の生物学的蓋然性の検討と結論の提示
 影響メカニズムと用量-反応関係の考察に基づく検討

表2 データベースのフォーマット

文献番号：

著者名：

論文題名：

出典：

チェック項目：1. 対象生物、2. 影響の標的臓器、3. 影響の種類、4. 曝露方法、5. 曝露時期、6. 曝露濃度 用量段階を記入、7. 観察された影響の種類と濃度：8. 観察時期 9. 論文中に低用量影響への関心、10. 試験の信頼性

論文の概要：(200~400字)

添付資料：文献の内容を理解する上で重要な図表

評価者のコメント：統計的な信頼性など報告の信頼性について記述

5. まとめ—内分泌かく乱化学物質の低用量影響リスクを検討する上での今後の課題

BPAについてはここ数年胎生期、授乳期暴露による神経系への影響の報告が急増し、この点に着目して検討した。個体レベルでは生殖器系への影響に関する報告が減り周産期の一過性曝露による神経系への影響に関する報告が相対的に多い。細胞レベルでは様々な報告があり遺伝子発現の網羅的解析も散見された。周産期は神経系の器官形成期で最もホルモン感受性が強い時期であり、行動レベルでの性差の消失と組織学的に青斑核や Bed nucleus の性差の消失に関する報告があるが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 bw 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。

社会的にインパクトを与えた点で類似した面があるが、20年以上前に変異原性試験が発癌性のスクリーニングに使えたとされ、食品中の焼けこげ物質が強い変異原性を示すことから人の発癌への寄与が疑われた。その後の研究により毎日数キログラムの焼けこげ物質を食べない限りヒトの発癌はあり得ないことが示された。試験管内の実験結果からは影響の可能性の示唆は得られても本当のリスクの大きさはわからないが、同時に変異原性に関する研究の多くは発癌メカニズムの理解に貢献した。

「内分泌かく乱化学物質」のリスクについて考えるにはまず科学的なリスク評価の基本について知ることが重要であろう。厚生労働科学研究班では、生殖系のみならず神経系、免疫系への影響を含め、高次生命機能における複雑な相互作用と、またそれを支える分子機構にメスを入れ、受容体間のクロストーク、シグナル伝達や遺伝子発現の制御と内分泌関連機能かく乱の生物学的な蓋然性について検討を重ねてきた。内分泌関連機能は環境要因、あるいは内因性のストレスに対する生体の防御や恒常性機能に深く関係している。毒作用と薬理作用の境界にもかかわり、影響の可逆性、天然の物質とりわけ食品中に含まれているような生理活性物質による作用と生体恒常性の関連なども今後さらに検討されねばならない。毒性学的には試験法や適切なエンドポイントの選択とも関連し、発生段階におけるクリティカルウィンドウの問題のより精細なメカニズムを説明してゆかねばならない(関澤、2006)。最後に毒性学およびリスク評価の立場から内分泌かく乱化学物質のリスク評価の原点について以下の諸点を確認しておく。

- (A) リスク評価は予測の科学と方法であり、リスク評価における不確実性の存在を前提に判断根拠を明確にしつつ評価を行い、不確実性についてはその要因と範囲を明示する
- (B) 定量的に現象をとらえるとともに、試験条件および結果の限界を理解する
- (C) 生物における知見をメカニズムの考察を基に総合的に検討し、単なる影響と有害影響を区別する
- (D) 人におけるリスクの可能性をデータに基づき検証する

謝辞とお断り

本研究は厚生労働省の研究費により支援を受けた。また本稿は筆者が「ホルモンと臨床」誌に寄稿した論文(関澤、2006)に加筆したものである。

参考文献/引用文献

- Ema M, Fujii S, Furukawa M, Kiguchi M, Ikka T & Harazono A (2001) Rat two-generation reproductive toxicity study of bisphenol A. *Reproductive Toxicology*, 15: 505-523
- European Chemicals Bureau (2003) European Union Risk Assessment, Volume 37

- 4,4'-isopropylidenediphenol (bisphenol-A), European Communities
- IPCS (2002) Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors, WHO/IPCS/ EDC/02.2, World Health Organization, Geneva, :厚生労働省による邦訳紹介ウェブページ:
<http://www.nihs.go.jp/edc/global-doc/index.html>
- Kubo K, Arai O, Omura M, Watanabe R, Ogata R, Aou S. (2003) Low dose effects of bisphenol A on sexual differentiation of the brain and behavior in rats. *Neurosci Res.* Mar;45(3):345-56.
- 内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会中間報告追補 (2002) 内分泌かく乱化学物質問題の現状と今後の取組, 化学工業日報社, 東京, 384頁
- NEDO/産総研(2005) 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・産総研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
- NTP (1982) Carcinogenesis Bioassay of Bisphenol A (CAS No. 80-05-7) in F344 Rats and B6C3F₁ Mice (Feed Study), TR-215, US DHHS, NIH
- NTP (2001) National Toxicology Program's Report of the Endocrine Disruptors Low Dose Peer Review, National Toxicology Program/National Institute of Environmental Health Sciences, <http://ntp-server.niehs.nih.gov/htdocs/liason/LowDosePeerFinalRpt.pdf>, August 2001
- Sakaue M, Ohsako S, Ishimura R, Kurosawa S, Kurohmaru M, Hayashi Y, Aoki Y, Yonemoto J, Tohyama C. (2001) Bisphenol A affects spermatogenesis in the adult rat even at low dose, *J. Occupational Health*, 43, 185-190
- 関澤 純、配島由二、土屋利江 (2001) ビスフェノールA重合樹脂成型血液透析器使用のリスク・ベネフィット分析、日本リスク研究学会第14回研究発表会講演論文集 73-76
- 関澤 純 (2005) 低用量問題—低用量影響の生物学的蓋然性、井上達・井口泰泉編「生体統御システムと内分泌攪乱」シュプリンガーフェアラーク東京、297-314 頁
- 関澤 純 (2005, 2006) ビスフェノールAの低用量影響評価の検討と評価情報データベースの作成、「平成16、17年度厚生労働科学研究内分泌かく乱化学物質の生体影響メカニズムに関する総合研究」(井上達代表)
- 関澤 純 (2006) 内分泌かく乱化学物質による低用量影響の考え方、ホルモンと臨床、54(3), 209-214
- Suter G, Vermeire T, Munns WR, Sekizawa J. (2003) Framework for the Integration of Health and Ecological Risk Assessment, *J. Human and Ecological Risk Assessment.* 9(1) 281-302.
- Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Thomas BF, Keimowitz AR, Brine DR, Veselica MM, Fail PA, Chang TY, Seely JC, Joiner RL, Butala JH, Dimond SS, Cagen SZ, Shiotsuka RN, Stropp GD, Waechter JM. (2002) Three-Generation Reproductive Toxicity Study of Dietary Bisphenol A in CD Sprague-Dawley Rats, *Toxicol. Sci.* 68, 121-146
- vom Saal, FS., Timms, BG., Montano, MM., Palanza, PP., Thayer, KA., Nagel, SC., Dhar, MD., Ganjam, VK., Parmigiani, S., and Welshons, WV. (1997) Prostate Enlargement in Mice due to Fetal Exposure to Low Doses of Estradiol or Diethylstilbestrol and Opposite effects at High Doses, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 2056-2061 .

Metabolic Enzyme Induction by HepG2 Cells Exposed to Oxygenated and Nonoxygenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

Kentaro Misaki,^{†,‡} Saburo Matsui,[†] and Tomonari Matsuda^{*,†}

Department of Environmental Engineering and Graduate School of Global Environmental Studies,
Kyoto University, Yoshidahonmachi, Kyoto 606-8501, Japan

Received August 18, 2006

Oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons (oxy-PAHs) such as polycyclic aromatic quinones and polycyclic aromatic ketones as well as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are abundant in the atmospheric environment. In this study, mRNA induction of six metabolic enzymes including P4501A1, 1A2, and 1B1, aldo-keto reductase 1C1 (AKR1C1), NAD(P)H-dependent quinone oxidoreductase 1 (NQO1), and glutathione S-transferase M1 (GSTM1) were examined in detail in human hepatoma (HepG2) cells exposed to environmentally relevant 13 PAHs and seven oxy-PAHs. Most PAHs such as benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P) showed significant induction of P4501A1 and 1A2 mRNA, while induction by oxy-PAHs such as 5,12-naphthacenequinone (NCQ) and 11*H*-benzo[*b*]fluoren-11-one (B[*b*]FO) occurred less strongly. AKR1C1 mRNA was significantly induced by oxy-PAHs, 11*H*-benzo[*a*]fluoren-11-one (B[*a*]FO), NCQ, cyclopenta[*cd*]pyren-3(4*H*)-one (CPPO), and B[*b*]FO and also by P450s-inducing PAHs such as B[*a*]P, benzo[*k*]fluoranthene (B[*k*]FA), and dibenz[*a,h*]anthracene (DB[*a,h*]A). Both chemical-dependent and time-dependent induction patterns of NQO1 mRNA were of the mixed types of P4501A1 and AKR1C1. The tendency for the decrease of GSTM1 mRNA was observed when exposed to PAHs B[*a*]P and B[*k*]FA.

Introduction

In various atmospheric and aquatic environments, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)¹ originally derived from oil fuel and its combustion are detected at high levels (1–4), and wildlife and humans have risk of exposure. Many studies in regard to PAH mutagenicity, carcinogenicity, and DNA adduct formation have been reported (5–9). According to the U.S. Environmental Protection Agency and the International Agency for Research on Cancer (IARC), PAHs such as benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P), benz[*a*]anthracene (B[*a*]A), chrysene (Chr), benzo[*b*]fluoranthene (B[*b*]FA), benzo[*k*]fluoranthene (B[*k*]FA), indeno[1,2,3-*cd*]pyrene (IdP), dibenz[*a,h*]anthracene (DB[*a,h*]A), and dibenzo[*a,l*]pyrene were listed as probable or possible carcinogens in humans (5, 6). IARC has recently changed the evaluation of

several PAHs, and B[*a*]P is now classified as carcinogenic to humans (group 1) (7).

Oxygenated PAHs (oxy-PAHs) such as polycyclic aromatic quinones and polycyclic aromatic ketones are also present in the atmospheric environment, diesel exhaust, and airborne particles as abundant as nonoxy-PAHs (1–4); however, the toxicological significance of these compounds is not well-studied (8, 10, 11).

PAHs are considered to induce many kinds of genes such as those coding for metabolic enzymes, P450s, and phase II detoxification enzymes. The pathways for enzyme induction are especially well-known for B[*a*]P (12). Metabolic enzymes such as P450s are induced via the aryl hydrocarbon receptor (AhR) by B[*a*]P. AhR is present in cytoplasm as a complex with dimeric heat-shock protein 90 prior to ligand interaction. Ligands such as 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and B[*a*]P activate AhR, and AhR transfers into the nucleus and interacts with the AhR nuclear translocator (ARNT) to form a heterodimeric transcription factor called the AhR complex, which binds xenobiotic response elements (XREs) and mediates the regulation of gene expression including specific P450s, glutathione-S-transferases (GSTs), NAD(P)H-dependent quinone oxidoreductase 1 (NQO1), growth factors, and cytokines.

B[*a*]P is metabolized to many oxygenated derivatives by P450s (9). Several electrophilic metabolites of B[*a*]P or reactive oxygen species (ROS) derived from them activate proteins such as activator protein 1 (AP-1) and/or the Nrf2/maf families. These activated proteins bind antioxidant response elements (AREs) or electrophilic response elements (EpREs) and enhance phase II detoxification enzymes such as aldo-keto reductases (AKRs), GSTs, NQO1, and γ -glutamylcystein synthetase (12–17).

The metabolism of B[*a*]P causes DNA damage, and three major mechanisms have been shown for the activation of DNA adduct formation by B[*a*]P. (i) A radical cation is formed

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +81-75-753-5171.
Fax: +81-75-753-3335. E-mail: matsuda@eden.env.kyoto-u.ac.jp.

[†] Department of Environmental Engineering.

[‡] Graduate School of Global Environmental Studies.

¹ Abbreviations: PAH, polycyclic aromatic hydrocarbon; IARC, International Agency for Research on Cancer; B[*a*]P, benzo[*a*]pyrene; B[*a*]A, benz[*a*]anthracene; Chr, chrysene; B[*b*]FA, benzo[*b*]fluoranthene; B[*k*]FA, benzo[*k*]fluoranthene; IdP, indeno[1,2,3-*cd*]pyrene; DB[*a,h*]A, dibenz[*a,h*]anthracene; oxy-PAH, oxygenated PAH; AhR, aryl hydrocarbon receptor; TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin; ARNT, aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator; XRE, xenobiotic response element; GST, glutathione-S-transferase; NQO1, NAD(P)H-dependent quinone oxidoreductase 1; ROS, reactive oxygen species; AP-1, activator protein 1; ARE, antioxidant response element; EpRE, electrophilic response element; AKR, aldo-keto reductase; B[*a*]P-7,8-diol, (\pm)-*trans*-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[*a*]pyrene; BPDE, (\pm)-*trans*-7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[*a*]pyrene; BPQ, benzo[*a*]pyrene-7,8-quinone; β -NF, β -naphthoflavone; TPh, triphenylene; B[*b*]F, benzo[*b*]fluorene; 3-MC, 3-methylcholanthrene; B[*ghi*]Pe, benzo[*ghi*]perylene; N[*a*]P, naphtho[2,3-*a*]pyrene; BAQ, 7,12-benz[*a*]anthracenequinone; DB[*a,c*]A, dibenz[*a,c*]anthracene; NCQ, 5,12-naphthacenequinone; B[*a*]FO, 11*H*-benzo[*a*]fluoren-11-one; B[*b*]FO, 11*H*-benzo[*b*]fluoren-11-one; B[*c*]FO, 7*H*-benzo[*c*]fluoren-7-one; CPPO, cyclopenta[*cd*]pyren-3(4*H*)-one; BPO, 6*H*-benzo[*cd*]pyren-6-one; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; IEF, induction equivalency factor.

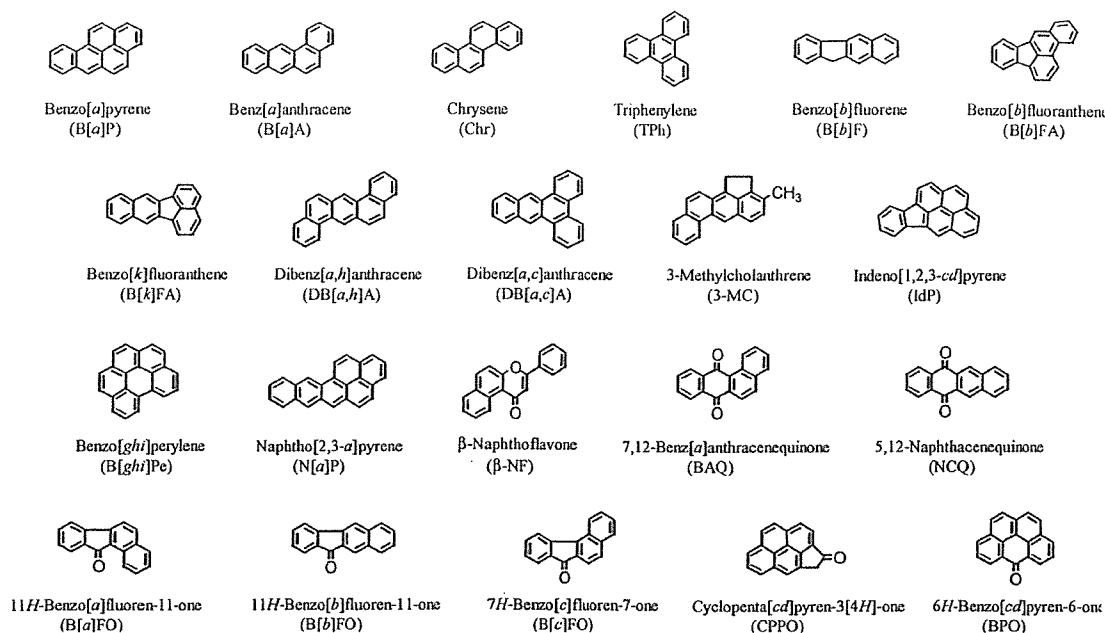


Figure 1. PAHs, oxy-PAHs, and β -NF that were examined in this study.

through a one-electron oxidation, probably via some P450s or peroxidases. This radical cation is considered to form depurinating bulky DNA adducts (18, 19). (ii) B[a]P is metabolized to *trans*-dihydrodiols by P450s such as P4501A1 and P4501B1. One, (\pm)-*trans*-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene (B[a]P-7,8-diol), is then changed into a bay region diol epoxide [(\pm)-*trans*-7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene (BPDE)], which forms stable and depurinating bulky DNA adducts (9, 19). (iii) Suggested by Penning et al. (12, 13, 20, 21), B[a]P *o*-quinone, benzo[a]pyrene-7,8-quinone (BPQ) is formed via AKRs. Four human AKR isoforms (AKR1C1–AKR1C4) catalyze the oxidation of B[a]P-7,8-diol to form a B[a]P catechol derivative, 7,8-dihydroxybenzo[a]pyrene. 7,8-Dihydroxybenzo[a]pyrene is then oxidized to BPQ. BPQ enters redox cycles, which are responsible for amplification of free radicals such as semiquinone anion radicals and ROS. This ROS formation is possibly related to both the initiation and the promotion stages of B[a]P-induced carcinogenesis (12, 22–26).

The reports about metabolic enzyme induction of PAHs except for B[a]P are few (9, 12, 13, 20, 21, 27–30). Therefore, in this study, either or both XRE (AhR) and EpRE (AP-1)-mediated typical metabolic enzyme mRNA induction levels (P450s, AKR1C1, GSTM1, and NQO1) in human hepatoma (HepG2) cells caused by 13 representative PAHs and seven oxy-PAHs were examined (Figure 1). These are representative enzymes related to the emergence of DNA adducts and detoxification.

Materials and Methods

Chemicals. TCDD was supplied by Cambridge Isotope Laboratories Inc. (Andover, MA). B[a]P, B[a]A, Chr, and β -naphthoflavone (β -NF) were supplied by Wako Chemical (Osaka, Japan). Triphenylene (TPh) and benzo[b]fluorene (B[b]F) were supplied by Tokyo Kasei Co. (Tokyo, Japan). IdP was supplied by Promochem (Wesel, Germany). The other test chemicals were supplied by Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO). The purity of many test chemicals was 99–100%. The purities of B[b]FA, B[k]FA, 3-methylcholanthrene (3-MC), benzo[ghi]perylene (B[ghi]Pe), naphtho[2,3-a]pyrene (N[a]P), 7,12-benz[a]anthracenequinone (BAQ), and β -NF were 98%. The purities of TPh, DB[a,h]A, dibenz[a,c]-

anthracene (DB[a,c]A), and 5,12-naphthacenequinone (NCQ) were 97%. The purity of B[b]F was 95%.

11H-Benzo[a]fluoren-11-one (B[a]FO), 11H-benzo[b]fluoren-11-one (B[b]FO), 7H-benzo[c]fluoren-7-one (B[c]FO), cyclopenta[cd]pyren-3(4H)-one (CPPO), and 6H-benzo[cd]pyren-6-one (BPO) were synthesized as previously described (31–34). These compounds were purified by column chromatography and recrystallization. Only the purity of B[c]FO was 98%, and the purities of the other four compounds synthesized were greater than 99%.

Qiagen's RNA extraction reagent was purchased from Qiagen (Valencia, CA). Random nonamer, avian myeloblastosis virus-reverse transcriptase, and Ex Taq DNA polymerase were purchased from Takara Bio, Inc. (Otsu, Japan). Me₂SO and methanol, HPLC grade, were purchased from Wako Chemical.

HepG2 Cell Culture and RNA Isolation. The human hepatoma cell line HepG2 was obtained from the Cell Resource Center for Biomedical Research, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, Japan. The cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% v/v fetal bovine serum (35). Cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Cells plated on 6 cm dishes were treated for 24 h with test chemicals. All chemicals were dissolved in Me₂SO, and the final concentration of the solvent in the culture medium was 0.1% v/v. Control cells were treated with 0.1% v/v Me₂SO. Total RNA was isolated from the cells using RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the protocol supplied by the manufacture. The RNA was dissolved in RNase free water, and the RNA concentration was determined spectrometrically. Cell cultures were conducted in triplicate for each chemical with each concentration. It was observed that HepG2 cells adhered to the dish were about half the levels in the controls when exposed to 5 μ M 3-MC for 24 h. However, such extreme decreases in cell adherence were not observed until 72 h in the case of HepG2 cells that were exposed to other test chemicals.

RT and Real-Time PCR. Total RNA (100 ng) was added to a reaction mixture containing 150 ng of random nonamer, 3.5 units of AMV-RT, 25 mM Tris-HCl buffer (pH 8.3), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM dithiothreitol, and 1 mM deoxyribonucleoside triphosphates in a final volume of 21 μ L (35). The reaction mixture was incubated at 37 °C for 10 min, heated at 55 °C for 30 min, and heated at 99 °C for 5 min to inactivate the enzyme.

Oligonucleotides used for PCR for four genes were commercially synthesized from Sigma Genosys Co. (Ishikari, Japan) as follows: