

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

平成16年度～18年度 総合研究報告書

主任研究者

井 上 達

平成19 (2007) 年 3 月

## 目 次

### I. 総合研究報告

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……………	1
井上 達	

資 料  
分担研究報告書

#### 1) プロジェクト課題研究

##### 【ビスフェノールA関連文献調査】

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……………	21
関澤 純	

##### 【食物等異物受容体結合物の調査】

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……………	34
松井三郎	

##### 【低用量エストロゲン様物質の前立腺影響研究】

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……………	38
杉村芳樹	

#### 2) 基盤研究

##### 【生殖・ステロイド代謝系研究】

雌性生殖器官への作用メカニズムの解明……………	45
井口泰泉	

ヒト骨芽細胞に対する内分泌かく乱化学物質の影響に関する研究……………	58
笹野公伸	

核内性ステロイドホルモンレセプターによる転写制御への 影響に関する研究……………	70
加藤茂明	

**【免疫・感染防御系】**

低用量内分泌かく乱化学物質の免疫系に及ぼす影響に関する研究……………	85
廣川勝昱	

内分泌かく乱物質の免疫機能に及ぼす影響及び低用量影響に関する研究……………	89
山崎聖美	

**【神経・行動】**

神経系初期発生における核内受容体の機能及び内分泌かく乱化学物質の 低用量影響に関する解析……………	94
菅野 純	

**【マイクロアレイ基盤整備】**

遺伝子発現の網羅的検索とインフォマティクスの確立……………	108
五十嵐勝秀	

II. 研究成果の刊行に関する一覧表……………	115
-------------------------	-----

# I. 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
総合研究報告書

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

主任研究者 井上 達  
国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・センター長

研究要旨

平成16年度より3年間にわたって行われた内分泌かく乱化学物質の生体影響に関する低用量効果や複合効果をも考慮したメカニズム研究の概略を報告する。研究の実施にあたっては中枢神経系、内分泌系、および免疫系などの記憶装置と遅延効果を有する高次生命系への影響を中心に、それぞれの分野における低用量効果や複合効果にも留意しました。それぞれの分野における網羅的遺伝子解析法を含む新規の技法をも取り上げ、この研究における未知の課題についても積極的に取り組み、銘記すべき成果をあげることができた。

医薬品はもとより、農薬、工業用化学物質などの中に、内分泌かく乱作用を示すホルモン様化学物質(HAC)と、その延長線上で、内分泌障害を引き起こす内分泌かく乱物質(EDC)があり得るとの生物学的蓋然性とこれに基く危惧により、当班における厚生科学研究がスタートして12年が経過した。併せて、後述のとおり今年には英国のウェイブリッジにてこの問題に関する世界最初の世界保健機構と経済開発協力機構の合同会議が欧州委員会の呼びかけで行われて10年になる。これらの研究の蓄積を背景に本研究は厚生労働科学研究第3期3年度の終了にあたり、各分担研究者によって遂行された研究成果を総括するものである。具体的には、申請時のスキームに沿って、生体影響のメカニズムの低用量効果・複合効果等に関わるトピックスにも焦点を当てたプロジェクト課題研究と、過去2期の当該研究で一層明らかになってきた中枢神経系、免疫系及び内分泌系に係る生体統御システムとしての高次生命系を取り上げた基盤研究との、二部構成として研究を進めて来た。

1. プロジェクト課題研究では、[ビスフェノールA関連文献調査] ビスフェノールA(BPA)による低用量影響に関する網羅的文献調査の結果従来RfDを導くために観察された影響よりも低濃度での神経・行動系を中心とした報告が認められた。[食物等ホルモン様物質の異物受容体活性] 芳香族炭化水素受容体(AhR)が比較的ルーズな基質特異性を持ち種々の化合物をリガンドとすること、食品中や環境中には未知のAhRリガンドが多数存在すること、それらAhRリガンドの毒性の決定に資する因子としてはCYP1A1等による易代謝性にあることなどを明らかにした。[低用量エストロゲン様作用物質の前立腺への影響] 前立腺に対するBPAの高・低用量作用はDESなどの異なった特異反応である

こと、胎児期の曝露の遅延性後思春期変化の認められることなどを明らかにした。[内分泌かく乱物質の発がん性の蓋然性]α-BHC(ベンゼンヘキサクロライド)をモデルとした低用量発がんホルミシスの存否について検討し、閾値が存在することが示唆されたが、ホルミシス現象についてはマウスでは認められないことなどが示唆された。また、テロメラーゼ活性及びその制御分子(human telomerase reverse transcriptase(hTERT))による制御をER原性エピジェネティック発がんの蓋然性探索の指標とする可能性を検討した。

II. 基盤研究においては、[生殖・ステロイド代謝系] 臨界期でのエストロゲンやアンドロゲン曝露によるマウス雌性生殖器官の不可逆性変化にはERαが必須でありERαのリン酸化-上皮成長因子の発現-上皮成長因子受容体のリン酸化-細胞内シグナルERαのリン酸化-細胞増殖に至るカスケードの形成が明らかとなった。また出生直後の臨界期と成獣とでのエストロゲンに応答する遺伝子のレパートリが異なっていることなど今後の研究課題を明らかにした。生殖組織以外の系ではヒト骨芽細胞を用いた研究で、核内レセプターSXRを介した増殖、細胞死の制御が検証された。核内ステロイドホルモンレセプターによる転写制御研究では、男性、女性ホルモンレセプターの転写共役因子を同定するとともに、これらの芳香族炭化水素受容体AhRとの相互作用を解析し、男性、女性ホルモンレセプターのユビキチン依存性分解の促進によるホルモン作用のかく乱の可能性を明らかにした。[免疫・感染防御系]では、BPAの胎仔影響を胸腺を標的臓器として検索し評価するエンドポイントの時期によって影響が異なることを見出したほか、マクロファージを介した脂肪組織へのサイトカイン産生に関する影響の可能性などについて検討が進んだ。また試験的ながらBPAの免疫応答制御、特に、Th1/Th2バランス制御に役割を果たすナチュラルキラーT細胞への影響偏位の可能性を認めた。[神経・行動系]では胎児脳や培養性神経幹細胞塊などを用い神経系とりわけ神経幹細胞への内分泌かく乱化学物質の影響を引き起こす遺伝子発現の方向性についての核内受容体発現に関する経時的解析を行ったほか、行動面でBPAが耐用1日摂取量以下の用量でも、探索行動の性分化の偏位をきたすこと、うつ反応を増強することなどを見出した。[マイクロアレイ基盤整備]網羅的遺伝子発現解析技術は、数万の遺伝子マーカーを迅速に検討可能な技術であり、当研究班における研究課題に見られるような既知の情報からの推測の困難な領域では新たな情報の得られる可能性を秘めた解析手法であり、各班員の研究課題に応じて適宜これを支援し成果をあげてきた。

以上、本課題では、内分泌かく乱化学物質に危惧されていた低用量効果や複合効果を含めた高次生命系に対する影響について基本的にそれらのメカニズム面からの蓋然性を明らかにした。従ってヒト影響についても危惧がないわけではないが、さしあたり直接の暴露対象とはなっていないものと考えられ、重要性は医療器具等への個別の対応に留まるものと思われる。

分担研究者

## I. プロジェクト課題研究

- 関澤 純 徳島大学総合科学部 教授  
松井三郎 京都大学大学院地球環境学  
堂環境毒性学 教授  
杉村芳樹 三重大学医学部泌尿器科学  
教授  
福島昭治 日本バイオアッセイ研究セ  
ンター 所長  
曾根秀子 国立環境研究所環境リスク  
研究センター 主任研究員  
(H18のみ)

## II. 基盤研究

- 井口泰泉 岡崎国立共同研究機構基礎  
生物学研究所生命環境研究  
領域 教授  
笹野公伸 東北大学大学院医学系研究  
科医科学専攻病理学講座  
教授  
加藤茂明 東京大学分子細胞生物学研  
究所分子生物部門 教授  
Ishwar S. Parhar 日本医科大学 医  
学部 生理学第一教室 講  
師(H16, H17)  
廣川勝昱 東京医科歯科大学医学部感  
染免疫病理学講座 教授  
山崎聖美 国立健康・栄養研究所生活習  
慣病研究部 主任研究員  
五十嵐美德 国立がんセンター研究  
所・化学療法部 主任研究官  
(H18のみ)  
菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センタ  
ー毒性部部長  
栗生修司 九州工業大学大学院・生命体  
工学研究科 教授

五十嵐勝秀 国立医薬品食品衛生研究  
所毒性部 主任研究官

## A. 研究目的

本総合研究で設定した統括的目的は、内  
分泌かく乱化学物質の高次生命系へのか  
く乱作用の背景にある分子機構を、核内受  
容体のシグナルネットワークを中軸とし  
た基盤研究をすすめ、生殖・ステロイド代  
謝系、免疫・感染防御系、神経・行動系へ  
の影響メカニズムを統一的に理解するこ  
とにあった。また現実課題となっている低  
用量効果・複合効果についても、プロジェ  
クト研究として、ホメオスタシスの背景に  
潜伏する比較的低用量レベルでの生体影  
響を視野に入れ、個別に時宜に応じた疑問  
に答える研究を図ることとしてきた。  
以下各課題で設定してきた研究の目的に  
ついて略記する。

## プロジェクト課題研究

### [ビスフェノールA関連文献調査]

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  
(BPA) について多くの研究が精力的に  
なされている。内分泌かく乱化学物質と  
りわけその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  
料としてこれを取りあげ文献的な評価  
を行うこととした。初年度 MEDLINE より  
約 168 報検出し、対象としているエンド  
ポイントごとに分類整理し、データベー  
ス基礎資料として出版することとした。  
次年度以降は、更に追加資料を加えると  
ともに、周産期曝露における神経・行動

影響に注目して文献解析を行い、この課題の焦点を明らかにすることとした(関澤)。

#### [食物等ホルモン様物質の異物受容体活性]

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して研究をすすめた。初期天然の AhR リガンド類を明らかにし、つづいて、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した。更に、食品中の AhR リガンドに関する知見をまとめるとともに、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試みるとともに、誘導される CYP1A1 による分解性の簡便な測定系を酵母株で作成することを目的とし、併せて、AhR リガンドによる細胞増殖機構の解明を目指した(松井)。

#### [低用量エストロゲン様作用物質の前立腺への影響]

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、低用量エストロゲン様物質(ビスフェノール A:BPA) 暴露を中心に、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ることにした(杉村)。

#### [内分泌かく乱物質の発がん性の蓋然性]

この課題については、発がん性をもつ内分泌かく乱性殺虫剤として知られる  $\alpha$ -BHC の低用量長期曝露における発がん性をモデルとして取りあげ、 $\alpha$ -BHC の低

用量曝露による発がんホルミシス現象など低用量発がん性の特徴を human TGF- $\alpha$  トランスジェニックマウス(TGF- $\alpha$ マウス)を用いて解析することとした(福島)。また第3年度については、細胞回転の制御の鍵となる分子のひとつであるテロメラーゼのがん発生に伴う発現応答に着目し、内分泌かく乱化学物質の曝露による細胞周期やテロメラーゼ活性及びその制御分子(human telomerase reverse transcriptase (hTERT))の発現に及ぼす影響を解析する課題についても研究をすすめた(曾根)。

### 基盤研究

#### [生殖・ステロイド代謝系]

この課題では、臨界期における内分泌かく乱化学物質曝露が生体に影響を及ぼすメカニズムを明らかにすること(井口)、及び非内分泌系臓器におけるエストロゲン様作用物質の生体作用を明らかにすること(笹野)を目的とした。また性ホルモン受容体作用点に関する研究では、低用量内分泌かく乱化学物質の性生殖への影響を及ぼす作用点を分子レベルで解明することを目的とし、ホルモンレセプターの転写制御機構に関する研究を行った(加藤)。性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)産生ニューロンに注目した、核内受容体ステロイド異物受容体(SXR)の局在の解析についてもイシュア・パルハーが平成16,17の2年だけの参加ながら成果をあげた。

#### [免疫・感染防御系]



この課題では、妊娠マウスに Bisphenol-A (BPA)を投与し、in vivoでその胎仔免疫系特に胸腺系への影響を明らかにすること(廣川)、およびリンパ球とマクロファージへの影響を明らかにすること(山崎)の二点を目的とした。尚、第3年度は、低用量のBPAの、ナチュラルキラーT(NKT)細胞による免疫制御機構に及ぼす影響についても目的を設定した(五十嵐<sup>美</sup>)。

#### [神経・行動系]

低用量内分泌かく乱化学物質の神経系初期発生に対する影響及び神経幹細胞における核内受容体機能を明らかにすること(菅野)、ならびに低用量のBPAを投与したラットの仔ラットの成長後の行動に与える影響を調べる(栗生)を目的とした。

#### [マイクロアレイ基盤整備]

当研究班での幅広い研究対象にDNAマイクロアレイ解析技術を適用することで、他の研究機関では得られないホルモン作用メカニズムを同定することを目的とし、研究支援を行うこととした(五十嵐<sup>勝</sup>・井上)。

## B. 方法

各々の研究の方法の概略は、それぞれ以下の通りである。

### プロジェクト課題研究

#### [ビスフェノールA関連文献調査]

BPAの公表文献を初年度(2000年1月から2004年6月まで)、第2年度(2004年7月から2005年9月まで)、第3年度(2005

年9月から2006年11月まで)の各期間についてそれぞれ200報、135報、及び55報をMEDLINEで選別し文献評価フォーマットに従って13名の専門家による調査を行った(関澤)。

#### [食物等ホルモン様物質の異物受容体活性]

食品中の芳香族炭化水素受容体AhR結合物質の探索やコーヒーなどに含まれる同物質の抽出、単離、更にそうした物質の検出系の樹立法の開発などを行った(松井)。

#### [低用量エストロゲン様作用物質の前立腺への影響]

マウス前立腺の腺管分子分葉の単離、解析ならびにこのものにおけるエストロゲン受容体 $\alpha$ の発現分布、これへのBPAの影響の免疫組織学およびRT-PCR法や遺伝子発現解析を行った(杉村)。

#### [内分泌かく乱物質の発がん性の蓋然性]

低用量発がんの蓋然性とホルミシスに関する $\alpha$ -BHC(ベンゼンヘキサクロライド)による肝発がん及び前駆像の検索(福島)とヒト胎盤絨毛がん細胞(BeWo)、ヒト乳がん細胞(MCF-7)及びヒト子宮内膜癌細胞(RL95-2)のTCDD及びBPA投与の影響をエストラジオール(E2)との比較のもとにテロメラーゼ活性測定によって評価した(曾根)。

### 基盤研究

#### [生殖・ステロイド代謝系]

生育過程にあるマウスや妊娠マウスに合成エストロゲンを投与し、それらの雌性生殖器官における応答や出産直前の

胎児組織における応答遺伝子発現などの検討（井口）、いわゆる内分泌臓器以外の標的としてのヒト骨芽細胞由来株 hFOB1.19 などの株細胞へのエストラジオール、5 $\alpha$ -DHT（デヒドロキシテストステロン）、DES、ジェニシュタイン、BPA などの影響の検討（笹野）、さらに男性ホルモン、女性ホルモン受容体の転写機能を伴う転写共役因子のダイオキシンレセプターとのクロストークの検討（加藤）や、ティラピア肝由来の PXR や RXR 核内受容体遺伝子の同定や GnRH（ゴナドトロピン分泌ホルモン）受容体の同定によるそこでの PXR の発現の意義の検討（イシュア・パルハー）を方法として研究を進めた。

#### [免疫・感染防御系]

ビスフェノールA(BPA)の免疫系への胸腺T細胞系への影響を母体への経口投与後のリンパ球増殖能やサイトカイン産生能で観察した（廣川）ほか、HL60細胞に対するBPAの低用量B細胞効果やC57BL/6マウスへの投与後のマクロファージを介した脂肪組織への影響の観察（山崎）などを行った。また五十嵐<sup>美</sup>は、BPAのNKT細胞の増殖及びTh1/Th2サイトカイン産生バランスに対する影響を解析した。

#### [神経・行動系]

C57BL/6 マウス妊娠 11.5 日から 14.5 日各日の胎生期後期胎児脳神経幹細胞を対象とし、7 日間培養後の神経細胞増殖塊（ニューロスフェア）の遺伝子発現を用いた（菅野）ほか、発達期の諸段階における低用量 BPA 投与後の仔ラットの成長後の行動特性の検討および評価法

の確立（粟生）を研究方法とした。

#### [マイクロアレイ基盤整備]

プロジェクト課題研究および基盤研究の中から若干の課題について年次ごとにマイクロアレイ発現検討を行い個別研究への支援を行った（五十嵐<sup>勝</sup>・井上）。

## C. 結果

### プロジェクト課題研究

#### [ビスフェノールA関連文献調査]

神経・免疫毒性に焦点をあてて、しかしながら全般的に抽出論文の検討を行い初年度分 168 件、および次年度分 102 件については低用量評価データ集を仮出版した。また最終年度分 55 編については仮印刷原稿の最終段階にある。全般的に神経系の器官形成期でホルモン感受性の高い周産期での一過性曝露による神経系への影響の報告が多く認められる。これらの中には NTP 長期毒性試験での LOEL 5mg/kg 体重よりも低い曝露濃度での体重減少の影響なども観察されている。これにともなってエストロゲン様作用以外のエンドポイントに焦点をあてた毒性学的な試験と考察の必要性が指摘されている（関澤）。

#### [食物等ホルモン様物質の異物受容体活性]

初年度、芳香族炭化水素受容体結合性の食品中の AhR リガンド物質を分析整理し、更に単離精製を進めた。食品、嗜好飲料などをそれらの物質の性質から分類した。アゴニスト群の中には生体内物質インディルビンも同定されこれに対する TNF- $\alpha$  の共存はヒト白血病細胞株

ML1の増殖抑制を導いた。なおコーヒー中のリガンドの構造決定は進行中。異物代謝酵素検出系の樹立のために CYP1A1 導入酵母株 YCM3 はリガンドの分解と結果としての不活化程度の評価系として機能した(松井)。

#### [低用量エストロゲン様作用物質の前立腺への影響]

マウス前立腺上皮由来細胞株 mPr の試験管内細胞増殖維持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の樹立を行った。また BPA の経皮下投与により成獣マウス前立腺に角化性病変が認められ、これは BPA 経胎盤投与による仔雄マウスの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角化に関与する遺伝子群のほか、性分化に関与する SF1 および、その関連遺伝子群であった。これらの変化は、用量レベルは異なるが、雌の BPA による膺上皮角化性変化と対応的である(杉村)。

#### [内分泌かく乱物質の発がん性の蓋然性]

内分泌かく乱性を持つ発がん物質  $\alpha$ -BHC の肝発がんプロモーション作用は高用量で強く、低用量で抑制的であった。これに伴う腫瘍周囲の c-jun 発現の低下、TGF- $\beta$  の上昇を観察した。また肝がん・類前駆所見 GST-P 陽性細胞巢の発生は低用量 (0.01~50 ppm) で対照群との差が見られず、高用量群 500 ppm でのみ有意差が見られた。がんホルミシスについては肝腫瘍の発生は、 $\alpha$ -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(福

島)。テロメロース発現ではヒト乳がん細胞 MCF-7 とヒト子宮内膜癌細胞 RL95-2 のステロイドホルモン受容体の mRNA 発現レベルを RT-PCR で調べた。BPA を用いて、MCF-7 における hTERT 及びテロメラーゼ活性に対する影響では、 $10^{-6}$ ~ $10^{-8}$  M の範囲で有意な増加が認められた(曾根)。

#### [生殖・ステロイド代謝系]

マウスの成育過程ごとのエストロゲンの影響は、新生仔期から成長が進むにつれてその応答遺伝子の数が増加していた。様々な生育段階にあるマウスにエストロゲンを投与し、雌性生殖器官における応答遺伝子について解析を行った。その結果、新生仔期(0日、5日)と成熟期(70日)とで応答遺伝子のレパートリも大きく異なることがわかり、新生仔期特異的な遺伝子発現が曝露影響の不可逆性とあいまって重要な意味をもつことが示唆された。

新生仔期へのエストロゲンの曝露の後の子宮における遺伝子発現変化は、解析した1万2千の遺伝子のうちおよそ30遺伝子の発現上昇が認められた。これに対し、出生70日後のマウスでは600以上の遺伝子がエストロゲンにより発現が誘導されていた(発現期特異的遺伝子発現)。さらに、エストロゲン応答遺伝子について、詳細な解析を行い、クロマチン免疫沈降法により、エストロゲンが受容体を介して直接的に発現を制御している遺伝子としてアドレノメジュリンを同定するとともにこれと強調的にマウス子宮の間質で機能を果たす RAMP3 も同定した。また、TBT は RXR  $\alpha$  および

PPAR $\gamma$ のリガンドとして機能することが明らかになった(井口)。いわゆる内分泌臓器以外の標的としてのヒト骨芽細胞由来株 hFOB1.19 などの株細胞へのエストラジオール、5 $\alpha$ -DHT(デヒドロキシテストステロン)、DES、ジェニシュタイン、BPA などの影響の検討の結果については、BPA は培養細胞 hFOB の増殖を促した。(笹野)。性生殖へ影響を及ぼす性ホルモン作用点の探索については、男性ホルモン及び女性ホルモンレセプターに結合する新しい転写共役因子のいくつかを同定した。また、ダイオキシンレセプターと女性ホルモンレセプターが核内で会合することを見出した。次年度以降については、男性ホルモン及び女性ホルモンレセプターに結合する新しい転写共役因子のいくつかを同定し、また、ダイオキシンレセプターと女性ホルモンレセプターが核内で会合することを見出した。すなわち 1) 女性ホルモンレセプターに結合する新しい転写共役因子複合体として、RNA のスプライシングに関与する複合体の構成因子 (SF3a p120) を含む新規転写共役因子複合体を同定したこと、このものが女性ホルモンレセプター N 末端側の転写促進領域のリン酸化を認識して特異的結合を生じ、転写機能を活性化すること、さらに、このものが女性ホルモンレセプター依存的な RNA のスプライシングにも関与していることなどが明らかになった。2) 芳香族炭化水素受容体 (AhR) とエストロゲン受容体との関連については、活性化された AhR の核内移行の結果として、女性ホルモン受容体と会合することが見出されたこと、

この時、エストロゲン非存在下ではエストロゲン受容体は、AhR との結合により、転写が促進した。また、エストロゲン受容体結合状態下では、AhR はその機能は抑制され分解されること。これに関与する新規複合体は AhR へのリガンド結合に依存的に、エストロゲン受容体のユビキチン化を起こすという AhR の新しい分子機能として見出された。3) なお、こうした転写共役因子については、既知の 3 つの複合体に加え、新規のそれが存在すること、これにヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) があることなどの研究も進展している。4) 1)、2) の研究とあいまって性ホルモン受容体と転写共役因子の相互作用を解析する。ショウジョウバエにおける GFP リポーターシステムを構築し個体レベルでの ER の転写活性の増強状態を観察する系の樹立に成功した(加藤)。

なお、シクリッド科魚類(ティラピア)より GnRH 受容体及び GPR54 遺伝子を同定した。レーザーキャプチャー顕微鏡を用いて採取した単一 GnRH ニューロンおよび下垂体細胞における GnRH 受容体および GPR54 遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法によって解析した結果 GnRH 1~3 受容体遺伝子の 3 種類すべての発現が GnRH ニューロンにおいて確認された。また 8 種類の下垂体細胞のすべてにおいて、数種類の GnRH 受容体遺伝子が同一の細胞内に発現していた。一方、GPR54 は未熟ニューロンに比べ成熟個体の GnRH ニューロン中に有意に高頻度で発現が認められた(イシュア・パルファー)。

[免疫・感染防御系]

胸腺T細胞系への影響研究ではBPAを含む飲料水の摂取(妊娠7日目から15日目まで)により、子宮内死亡胎仔の増加と胸腺萎縮が特に低用量のBPA摂取群に認められた。次に妊娠7日目より出産までの母親への経口投与による新生仔マウスへの影響をみると胸腺内リンパ球数はBPAの投与群では用量に係わらず対照群に比較して低値を示し、未熟胸腺細胞亜集団(CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>)の割合が高値を示した。最後にBPAの免疫系への長期的な影響を追跡するため曝露6ヶ月のマウスの胸腺・脾臓の重量、リンパ球の構成、リンパ球の増殖能と各種サイトカイン産生を検討したが、BPAの影響は認められなかった(廣川)。内分泌かく乱物質のマクロファージ遊走能への影響についてはノニルフェノール、BPA、フタル酸ジブチルなどの高用量(0.1mM)で遊走能の低下をみたが低用量では増加傾向も認められた。フタル酸ブチルベンジルでは低用量で有意に遊走能が増加しフタル酸ジブチルでも同様であった。(なお、それぞれに高用量から低用量にいたるTNF- $\alpha$ の対照をおいた)。BPAのマクロファージを介した脂肪織への影響については、コントロール群に比べてBPA投与群に大きな変化はみられなかったが、白色脂肪組織重量及び褐色脂肪組織重量が増加する傾向にあった。また、精巣周囲脂肪組織では、脂肪細胞の増大、機能の悪化、マクロファージの浸潤を示す遺伝子の発現が増加していた。また、TNF $\alpha$ の亢進や、マクロファージ遊走能の亢進を見た(山崎)。さらにナチュラル・キラーT細胞に対する影響でについ

ては、NKT細胞はin vitroでBPA $10^{-7}$ ~ $10^{-5}$ Mの濃度で、濃度依存的にTh2優位なサイトカイン産生パターンを示した。さらにBPA濃度依存的にTh2優位なサイトカイン産生が見られた(五十嵐<sup>美</sup>)。

#### [神経・行動系]

発現が高い核内受容体群は、終脳とニューロスフェアではレパトリの多くが一致した。終脳では発現が低いにもかかわらずニューロスフェアで高いものとして、ESRRa、GR、NGFI-Ba、などが同定され、これらを終脳全体でみると、発現は低いが発現が神経幹細胞に於いて高発現を示す核内受容体であることが推量された(菅野)。

行動影響研究については、BPAは主として雄に作用し、探索行動の性分化を障害し、うつ反応を増強した。前者は出産前1週間、後者は出産後1週間とくに感受性が高いことがわかった。すなわちBPAは主として雄に作用し、探索行動の性分化を障害し、雄のうつ反応を増強した。前者は出産前1週間、後者は出産後1週間とくに感受性が高い。1-BPは主として雌に影響を及ぼし探索行動やうつ反応の性分化を障害した。BPAは立ち上がり行動の性差を消失させたが、その効果は胎児期曝露がより強かった。一方、強制水泳試験における不動時間の増加作用は新生児期曝露のほうが効果が強かった。高架十字迷路試験、受動的回避学習試験では影響は認められなかった(粟生)。

#### [マイクロアレイ基盤整備]

生殖・ステロイド代謝系に関する雌性生殖器官への作用等、ヒト骨芽細胞に対する影響及び男性ホルモン及び女性ホル

モンレセプターに結合する新しい転写共役因子の研究、また神経・行動系では、発生中期から後期にかけての胎児終脳におけるニューロン分化について、それぞれマイクロアレイ解析による網羅的遺伝解析支援を行った(五十嵐<sup>勝</sup>・井上)。

#### D. 考 察

各々研究の主だった考察点は以下のとおりである。

#### プロジェクト課題研究

##### [ビスフェノールA関連文献調査]

都合7年間のBPA関連文献調査を行ってきた。時あたかも当班研究の最終年2006年秋には米国国立環境健康科学研究所がヒト影響、メカニズム、実験動物、環境影響などの分科会を置いて横断的なBPAの影響に対する総合討議を行った。結果のまとめはまだ公表されていないが当班における文献調査とともにこの問題の分野別認識にデータギャップがありこれをどう整理してゆくかが課題と考えられる(関澤)。

##### [食物等ホルモン様物質の異物受容体活性]

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。次年度研究においてAhRリガンドとTNF $\alpha$ によってp21が誘導され、CDK6がダウンレギュレートされることは、細胞増殖のメカニズムを良く説明している。また、IL-1 $\beta$ やTNF $\alpha$ などのサイトカインもAhRによって相乗的に発現することがわかり、ダイオキシンの免疫毒性との関連性が示唆された。第3年度には、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、新しいタイプのAhRリガンドである(松井)。

##### [低用量エストロゲン様作用物質の前立腺への影響]

今般の初年度研究で、マウス前立腺のBPAに対する感受性は領域ごとに異なっており、前立腺の元となる泌尿生殖洞におけるER $\alpha$ の発現分布と強く相関する(前葉>後側葉>腹葉)ことが明らかとなった。一方、アンドロゲン受容体(AR)の発現とは逆相関しており、ARの発現が強い領域ほどER $\alpha$ の発現が弱く、BPAに対する反応性も低かった。これらの結果より、組織内の不均一性がBPAに対する感受性を左右し、領域特有の異常増殖性疾患を引き起こす要因となると考えられた。問題点は、無血清器官培養法において高用量のBPA(>100 nM)はE2(1 nM)、TGF $\alpha$ (20 ng/mL)と同様のSQMを誘導したものの、低用量での形態学的変

化は認められなかったことである。続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、マウス前立腺の分葉 lobe に特異的であった (AP>DLP>VP)。そこで、各 lobe におけるエストロゲン受容体  $\alpha$  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  $\alpha$  の発現量に強い相関が認められた。BPA 投与により変化する泌尿生殖洞内の遺伝子変化は、BPA に特徴的な発現変化が多く認められる。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。今後、BPA に特徴的な作用を検討する必要がある (杉村)。

#### [内分泌かく乱物質の発がん性の蓋然性]

「発がんホルミシス研究」では、肝における  $\alpha$ -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の差がなく、500 ppm 群でのみ有意な増加を見た。この事実は、 $\alpha$ -BHC のマウス肝発がん性には閾値が存在することを示唆している。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、マウスではみられなかった。このことは、DEN によるイニシエーションが適切な用量域になかったこと、低用量域における  $\alpha$ -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、等が関与しているものと考えられた (福島)。

「テロメラーゼ研究」については、TCDD のテロメラーゼに対する増強作用には、

ER 依存及び ER 非依存経路のあることが明らかとなった。しかし、細胞の倍加時間とテロメラーゼ活性の強さは相関しなかったことから、細胞回転の速度には、テロメラーゼの活性化以外の因子が関わっており、それらと ER シグナル伝達 の関係を明らかにすることが、内分泌かく乱化学物質の癌化への関与のメカニズムを解明するうえで、重要であると考えられた (曾根)。

#### [生殖・ステロイド代謝系]

雌性生殖器官への作用メカニズムの研究については、マウスの新生仔期によるエストロゲン影響は既に多くの報告があるが、不可逆的な影響を受けるのは、出生後一定の期間に限定される。こうした感受性の高い期間は臨界期とよばれそれぞれの影響によりその期間は異なる。例えば、膣上皮のエストロゲン非依存的な増殖は、出生後 5 日以内にエストロゲン曝露があると誘発される。従来は、この曝露と最終的な発現系 (エンドポイント) との関連、エンドポイントの解析が主であったが、本研究によりエストロゲン曝露により引き起こされる初期の変化について明らかにすることができた。

エストロゲン受容体は胎仔期から発現していることが知られているが、実際にエストロゲンを産生する思春期以前から受容体が機能しているのかについては、いまだ明確になっていない。本研究の結果、エストロゲン曝露により強制的にエストロゲン受容体を機能させた場合、雌性生殖器官における反応は成育段階で異なっていることが示された。こ

うした変化は比較的急速におきており、臨界期が終了する生後5日では、エストロゲンにより誘導される遺伝子数は出生直後のものに比べて増加しているだけでなく、遺伝子の種類も異なっていた。したがって新生仔期においてのみ反応するエストロゲン応答遺伝子について、発現パターンや機能解析を進めていくことにより、最終的に引き起こされる不可逆的な影響の発現メカニズムを解明できると思われる。第2年度計画については、エストロゲン受容体は胎仔期から発現していることが知られているが、実際にエストロゲンを産生するのは思春期以降である。思春期以前のエストロゲン受容体が機能しているのかについては、いまだ明確になっていない。今回の胎生期のエストロゲン影響研究により、胎児期のエストロゲン曝露によって強制的にエストロゲン受容体を機能させた場合、雌性生殖器官における反応は成体とは異なっていることが明らかとなり、胎生期特異応答と考えられた(井口)。つづいて、骨代謝系への影響研究は、内分泌かく乱研究の枠組みを大きく拡張した。内分泌かく乱化学物質の骨組織への影響は魚類や爬虫類で注目されつつあり Tsukamoto ら(2004, *Biochem Pharmacol*) はトリブチルスズ化合物の添加によってマウス胎児の骨形成が妨げられることを示した。このことはヒトを含めたほ乳類の骨組織に内分泌かく乱化学物質が影響を及ぼす可能性を示唆している。本研究では BPA による骨芽細胞の増殖機序として、SXR に注目した。骨芽細胞における SXR を介した細胞増殖経路が骨組織の維持に重

要な働きを担っていると考えられた。内分泌かく乱化学物質を含めた化学物質の骨組織への影響をさらに検討し、明らかにすることが必要と考えられる(笹野)。性ホルモンレセプター研究では、数多くの転写共役因子及び複合体がこのものに結合することが分かった。これら因子複合体の中でいずれが最も重要であるかは未だ判断できない。今後遺伝子ノックアウト等により、確認する必要があると思われる。また、ダイオキシンレセプターと性ホルモンレセプターが会合することから、性ホルモンかく乱作用の一つは、この分子機構を介するものと考えられた(加藤)。

#### [免疫・感染防御系]

BPA を摂取した妊娠マウスでは、胎仔が早期の段階で子宮内死亡をすることが示唆された。この場合、興味あることは EDC s が高濃度より低濃度に含まれた飲料水を摂取したときに、子宮内胎仔死亡が有意に増加することである。

生存した胎仔では胎盤を介した EDC s が胸腺に作用し、胎仔および新生仔の胸腺内胸腺リンパ球の増殖・分化を抑制することが分かった。

これらの結果から in vivo 実験系においても低用量の BPA が胎仔の未熟胸腺細胞の増殖分化に抑制的に作用することがわかった。

これからの問題点はこのようにして、胎仔期から新生仔期に BPA に暴露された個体において、長期的に見た場合にどのような BPA の影響が見られるかを検討することである。低用量の BPA 摂取による子宮内胎仔死亡については、飲料水中



のアルコールが 1%であったため、アルコールの影響を除外できなかった。次年度、アルコール濃度を 0.01%の 100 分の 1 に減らして実験を行った。その結果、子宮内胎仔死亡は BPA を含んだ飲料水の摂取した群では、14/71 (19.7%) であったが、コントロールでは 0/70 (0%) となり、母マウスへの低濃度の BPA 投与が胎仔死亡を起こすことが明らかになった。免疫系形成の要となる胎仔胸腺について見ると、胸腺内リンパ球の減少があり、増殖が抑制されていることが明らかになった。また、T リンパ球の分化度を見ると、最も未熟な段階にあるものが多く、分化の抑制もあることが確認された。

胸腺内における T 細胞の増殖・分化はリンパ球と胸腺ストローマの相互作用に依存している。BPA のリンパ球への影響は *in vitro* の実験で既に確認した。そこで BPA の胸腺ストローマへの影響を見るために、胎仔胸腺よりストローマを分離し、BPA の影響を見た。胎仔期に低用量の BPA が暴露されると、Notch-1 リガンド、Glia maturation factor、Thymic stromal-derived lymphopoietin receptor などの遺伝子発現は低下し、一方、エストロゲン受容体をはじめ、ACTH-R、TSH-R 及び TRH-R などの発現は増強した。このようなマウスの出生後、同じように、低用量の BPA 飲料水を摂取した母マウスに保育させ、離乳後も、6 ヶ月齢まで BPA を含む飲料水を摂取させた F1 の免疫系を検索した結果では、検索したいずれの免疫系の指標や機能も対照群と比べて、差がなかった。これ

は、胎仔期に認められた変化が修復可能な可能性を示唆している (廣川)。内分泌かく乱物質の免疫系への影響について、特にリンパ球への影響について調べてきたが、その影響はカルシウムイオン濃度の上昇や細胞内蛋白質のチロシンリン酸化といったシグナル伝達系を介して瞬時に伝わることを見い出した。一方、IL-2 などのサイトカイン産生に変化があることも見出し、リンパ球内では遺伝子レベルで変化が起きている可能性も示唆された。しかし、エストロゲンレセプターアンタゴニストを用いてもリンパ球への内分泌かく乱物質の影響に変化が無かったことから、内分泌かく乱物質のリンパ球への影響は、生殖系への影響のようなエストログレセプターなどを介したのではないことが考えられた。本研究により、リンパ球への影響が遺伝子レベルで解明されることが期待される。マクロファージは自然免疫を担う細胞の 1 つであり、多数の表面レセプターによって異物を認識し、迅速に貪食、排除を行うとともに、炎症性サイトカインを産生する。この機構は、免疫系の中でも最も原始的なものであり、高等生物のみならず生物が広く持っているシステムである。感染防御機構において、自然免疫は感染早期の防御機構のみならず、適応免疫の Th1/Th2 細胞への分化を決定する大きな要因となる。そこで行ったマクロファージを介した脂肪織への影響研究では、脂肪組織に浸潤したマクロファージは脂肪組織へ大きな影響を与えていることが明らかになった。マクロファージや脂肪細胞からは、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) が分泌される。単球のマクロフ

マクロファージへの分化、MCP-1等のケモカインやTNF等のサイトカインの分泌促進へと反応性ループの形成が示唆される。本研究により、BPAはマクロファージを介した脂肪組織に影響を与えている可能性のあることが示唆された。結果として、BPAのような内分泌かく乱物質は、マクロファージを介して肥満に関与し、ひいては生活習慣病につながるような状態に陥りやすくしている可能性が考えられた(山崎)。またT細胞亜分画バランスの研究では、内分泌かく乱化学物質が免疫系のTh1/Th2バランスに影響を及ぼし、Th2優位な反応を引き起こすことが知られている。Th1およびTh2両者のサイトカインを産生し免疫応答を制御するNKT細胞に対しても、内分泌かく乱化学物質が影響を及ぼし、NKT細胞の関与する自己免疫やアレルギー疾患に影響を及ぼすと考えられる。NKT細胞の抗原特異的な反応は、BPA $10^{-7}$ ~ $10^{-5}$ Mの濃度で、増殖およびサイトカイン産生に影響を及ぼすと考えられた(五十嵐<sup>美</sup>)。

#### [神経・行動系]

初年度は胎児神経幹細胞における核内受容体発現について、後期胎児神経幹細胞では多種類の核内受容体mRNAが発現していることを明らかにした。特に、オーファンレセプターのRVR, TR4に加え、COUP-TF1, GR, PPAR $\beta$ , TRaなどの発現が高かった。一方で、ERはalpha, betaともにこれらの受容体より発現が相対的に低いことが判明した。核内受容体の神経幹細胞における機能に関する情報は少ないが、GRに関連する可能性を示す情報として、胎児期に母胎がストレス

を受けると、グルココルチコイドを介して胎児神経幹細胞の数が減り、その数の減少は生涯持続するとの報告がある。今回、GRの発現が高いことが確認されたことは、神経幹細胞においてGRシグナル系は作動しており、神経幹細胞は母胎ストレスを始めとする環境要因による影響を受けやすい細胞であることが示唆された。また、甲状腺ホルモンには神経幹細胞からのオリゴデンドロサイト分化誘導作用があることが報告されているが、TRaの発現が高いことは甲状腺ホルモン様物質が神経幹細胞に影響を与えやすいことを支持するものと考えられる。内分泌かく乱化学物質の標的として重要度の高いエストロゲンレセプターに関する研究として実施しているDESの作用については、終脳を用いた網羅的遺伝子発現解析を追加実施し、神経幹細胞のそれとの対比により下流遺伝子群描出を目指した。次年度の網羅的遺伝子発現解析により、甲状腺ホルモンがNotchシグナル系を活性化することが示唆されたがその生理的意義の検証が必要である。甲状腺ホルモンと他の核内受容体系とのクロストークについてはエストロゲン受容体に注目した解析を主としたが、エストロゲン受容体以外にも多数の核内受容体の発現が上昇することが示唆された。これらの結果は、神経幹細胞における核内受容体間のクロストークは想像通りに多岐に渡り複雑であることを示唆し、1つの核内受容体系のかく乱により、他の核内受容体系にも影響が及ぶことを念頭に置いた研究の重要性を確認するものである。

神経幹細胞の増殖、分化は、塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス型 (bHLH) 転写因子による制御を受けていることが知られている。bHLH 型転写因子の中で、神経幹細胞の未分化型増殖を担う HES1 は、エストロゲンによる発現低下が知られている。これは、神経幹細胞に於いて核内受容体間の多岐に渡るクロストークが存在することを示唆し、1つの核内受容体系のかく乱により、他の核内受容体系にも影響が及ぶ可能性を示唆している (菅野)。

行動面から見ると、BPA は、出産前後いずれの曝露でも探索行動の性差を障害させ、不応時間を増強させる。しかし、探索行動の性差は出産前曝露による影響により強く影響され、不応時間の増強は出産後の追加曝露においてより顕著に確認された。探索行動の発現には海馬、青斑核が関与していることが示唆されており、胎生期間におけるこれらの発達には BPA が関わっていると考えられる。今回の不応行動の結果が新生児期の強く発現したことは、BPA が特に新生児期のセロトニン系の発達に影響を与えた可能性がある (栗生)。

#### [マイクロアレイ基盤整備]

マイクロアレイ技術支援の課題では 3 年間の研究期間に、プロジェクト研究、基盤研究のステロイド代謝系、同神経系および核内受容体系の各研究カテゴリーから一題ずつ支援研究を行った。

プロジェクト課題の低用量エストロゲン様作用物質の前立腺への影響については杉村班員との研究で BPA による前立腺上皮の角化と SF-1 の発現上昇を介

した抗ミューラー管シグナルの活性化の可能性を見出した。

ステロイド代謝系については笹野班員の共同研究でヒト骨芽細胞株に対するエストロゲン、テストステロン、アロマターゼ阻害剤等の引き起こす遺伝子発現変化を解析した。この中でアロマターゼ阻害剤による発現変化特に Hox11、ADCYAPP1 の発現の抑制は注目された。神経・行動系では神経幹細胞のグリア細胞への分化過程で生ずる発現変動の試験的観察を行った。

核内受容体系では加藤班員との共同研究でエストロゲンの骨代謝制御機構との関連で破骨細胞でのエストロゲン標的遺伝子を特定することを目的として検討を行った。破骨細胞にはエストロゲン受容体の発現がありこのシグナルによる作用はアポトーシスの誘導であるものとの仮説が支持された。(五十嵐勝・井上)

## E. 結 論

### プロジェクト課題研究

[ビスフェノール A 関連文献調査] BPA による低用量影響に関する網羅的文献調査の結果従来 RfD を導くために観察された影響よりも低濃度での神経・行動系を中心とした報告が認められた (関澤)。

[食物等ホルモン様物質の異物受容体活性] AhR が比較的ルーズな基質特異性を持ち種々の化合物をリガンドとすること、食品中や環境中には未知の AhR リガンドが多数存在すること、それら AhR リ

ガンドの毒性の決定に資する因子としては CYP1A1 等による易代謝性にあることなどを明らかにした(松井)。

**[低用量エストロゲン様作用物質の前立腺への影響]** 前立腺に対するBPAの高・低用量作用はDESなどの異なった特異反応であること、胎児期の曝露の遅延性後思春期変化の認められることなどを明らかにした(杉村)。

**[内分泌かく乱物質の発がん性の蓋然性]**  $\alpha$ -BHC をモデルとした低用量発がんホルミシスの存否について検討し、閾値が存在することが示唆されたがホルミシス現象についてはマウスでは認められないことなどが示唆された(福島)。  
また、テロメラーゼ活性及びその hTERT による制御を ER 原性エピジェネティック発がんの蓋然性探索の指標とする可能性を検討した(曾根)。

**基盤研究**においては、**[生殖・ステロイド代謝系]** 臨界期でのエストロゲンやアンドロゲン曝露によるマウス雌性生殖器官の不可逆性変化には ER $\alpha$  が必須であり ER $\alpha$  のリン酸化—上皮成長因子の発現—上皮成長因子受容体のリン酸化—細胞内シグナル ER $\alpha$  のリン酸化—細胞増殖に至るカスケードの形成が明らかとなった。また出生直後の臨界期と成獣とでのエストロゲンに応答する遺伝子のレパートリが異なっていることなど今後の研究課題を明らかにした(井口)。

生殖組織以外の系ではヒト骨芽細胞を用いた研究で、核内レセプター-SXR を介した増殖、細胞死の制御が検証された(笹野)。

核内ステロイドホルモンレセプターによる転写制御研究では、男性、女性ホルモンレセプターの転写共役因子を同定するとともに、これらの芳香族炭化水素受容体 AhR との相互作用を解析し、男性、女性ホルモンレセプターのユビキチン依存性分解の促進によるホルモン作用のかく乱の可能性を明らかにした(加藤)。

**[免疫・感染防御系]** では BPA の胎仔影響を胸腺を標的臓器として検索し評価するエンドポイントの時期によって影響が異なることを見出したほか(廣川)、マクロファージを介した脂肪組織へのサイトカイン産生に関する影響の可能性などについて検討が進んだ(山崎)。  
また試験的ながら BPA の免疫応答制御、特に、Th1/Th2 バランス制御に役割を果たすナチュラルキラーT細胞への影響偏位の可能性を認めた(五十嵐<sup>美</sup>)。

**[神経・行動系]** では胎児脳や培養性神経幹細胞塊などを用い神経系とりわけ神経幹細胞への内分泌かく乱化学物質の影響を引き起こす遺伝子発現の方向性についての核内受容体発現に関する経時的解析を行った(菅野)ほか、行動面で BPA が耐用 1 日摂取量以下の用量でも、探索行動の性分化の偏位をきたすこと、うつ反応を増強することなどを見出した(栗生)。

#### **[マイクロアレイ基盤整備]**

網羅的遺伝子発現解析技術は、数万の遺伝子マーカーを迅速に検討可能な技術であり、当研究班における研究課題にみられるような既知の情報からの推測の困難な領域では新たな情報の得られる