

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。

明確な表現型を伴って影響が現れることが少ない内分泌かく乱化学物質の作用を、その作用メカニズムに立ち入って解析する際に今後も有効活用していくことが望ましい(五十嵐^勝)。

F. 健康危惧情報

直接該当する事柄は認められなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

Hirabayashi Y, Yoon BI, Li GX, Fujii-Kuriyama Y, Kaneko T, Kanno J, Inoue T: Benzene-induced hematopoietic toxicity transmitted by AhR in wild-type mouse and nullified by repopulation with AhR-deficient bone marrow cells: time after benzene treatment and recovery. *Chemosphere*, in press.

Hirabayashi Y, Yoon BI, Tsuboi I, Huo Y, Kodama Y, Kanno J, Ott T, Trosko JE Inoue T,: Protective role of connexin 32 in steady-state hematopoiesis, regeneration state and leukemogenesis. *Exp Biol Med* (Maywood), in press.

Yoshida K, Hirabayashi Y, Watanabe F, Sado T, Inoue T. (2006). Caloric restriction prevents radiation-induced myeloid leukemia in C3H/HeMs mice and inversely increases incidence of

tumor-free death: implications in changes in number of hemopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* **34**, 274-83.

Yoon BI, Kaneko T, Hirabayashi Y, Imazawa T, Nishikawa A, Kodama Y, Kanno J, Yodoi J, Han JH, Hirose M, Inoue T. Electron microscopical evidence of the protective function of thioredoxin (Trx/ADF) transgene against 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced cellular toxicity in the liver and brain. *J Toxicol Pathol*. 2005, 18:41-46.

Hirabayashi Y, Li GX, Yoon BI, Fujii-Kuriyama Y, Kaneko T, Kanno J, Inoue T. Benzene-induced hematopoietic toxicity transmitted by AhR in the wild-type mouse was negated by repopulation of AhR deficient bone marrow cells. *Organohalogen Compounds* 2005, 67: 2280-2283.

Inoue T. Potential applications of toxicogenomics in risk assessment. In: *Evolving Genetics and Its Global Impact*. (The Fifth Princess Chulabhorn International Science congress), Amarin Printing and Publishing Public Company Limited, Bangkok, Thailand, 2004, pp. 255-257.

Hirabayashi Y, Yoon B-I, Li G-X, Kanno J, and Inoue T. Mechanism of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: Current review with

- implication of microarray analyses. *Toxicologic Pathology* 2004, 32 (suppl. 2): 12-16.
- Tsuboi I, Morimoto K, Hirabayashi Y, Li G-X, Aizawa S, Mori KJ, Kanno J, and Inoue T. Senescent B lymphopoiesis is balanced in suppressive homeostasis: decrease in interleukin-7 and transforming growth factor-beta levels in stromal cells of senescence-accelerated mice. *Exp. Biol. Med.* 2004, 229:494-502.
- Yoon B-I, Hirabayashi Y, Kawasaki Y, Tsuboi I, Ott T, Kodama Y, Kanno J, Kim D-Y, Willecke K, and Inoue T. Exacerbation of benzene pneumotoxicity in connexin 32 knockout mice: enhanced proliferation of CYP2E1-immunoreactive alveolar epithelial cells. *Toxicol.* 2004, 195: 19-29.
- Hirabayashi Y, Yoon BI, Li GX, Kanno J, Inoue T: Mechanism of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: current review with implication of microarray analyses. *Toxicol Pathol* 32 Suppl 2: 12-6, 2004.
- 井上 達 第4章健康医学「環境ストレス応答と生体ホメオスターシス」: 淀井淳司／松尾禎之編 別冊医学のあゆみ「レドックスーストレス防御の医学」医薬出版(株)、東京(2005)、194-199.
- 井上 達 環境生体応答—*Toxicogenomics* 「はじめに」医学のあゆみ(2005) 213(4): 221.
- 井上 達／井口泰泉編:「生体防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、東京、2005、pp321.
- 井上 達: 医薬品の毒性評価、その未来—実験動物と動物試験の展望—*Biophilia*, 2005, 1(1), 51-57
2. 学会発表
- Inoue T: Effect of endocrine disruptors on health: possible underlying mechanistic background of low-dose and synergistic actions. Weybridge+10 Workshop “Impacts of Endocrine Disrupters (2006. 11.10) [Helsinki, Finland, Meeting abstract, 7: 2006]
- Inoue T, Yoon BI, Igarashi K, Kanno J, Yodoi J, Hirabayashi Y Global Gene-Expression Profilings of Steady-State Mice Carrying A Graded Dosage of Trx-Gene Elucidate Major Principal Gene-Component for the ROS-removal and for Trx-Dependent Anti-Oxidative Stress. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology (2006.6.23) [Kyoto, Meeting abstract pp 797]
- Inoue T: Summary and Future Directions “Regulation of hematopoiesis”. *Pathophysiology & Molecular Biology of Hematopoiesis, Malignancy & Radiation Response* “International Symposium in Memory of Eugene P. Cronkite, M.D.” (2006.5.12) [Brookhaven National

Laboratory, NY, No abstract]

Inoue T: The Use of Toxicogenomics data in risk assessment— Potential applications of Toxicogenomics in risk assessment—. The 5th Princess Chulabhorn International Science Congress (2004.8.22) [Bangkok, Thailand, 2004]

Inoue T: Toxicogenomics as a tool of predictive toxicology. 10th International Congress of Toxicology. (2004.7.13) [Tampere, Finland, Toxicology and Applied Pharmacology 197 (3): 265, 2004]

Hirabayashi Y, Yoon BI, Kitada K, Kawasaki Y, Igarashi K, Kodama Y, Li GX, Kim DY, Kanno J, Inoue T: Hematological toxicogenomics addressing the mechanisms of benzene-induced epigenetic /genotoxic changes. (2004.7.13) [Tampere, Finland, Toxicology and Applied Pharmacology 197 (3): 277, 2004]

Hirabayashi Y, Yoon BI, Li GX, Kanno J, Fujii-Kuriyama Y, Inoue T: Aryl-hydrocarbon- receptor-signaling keeps stem cell kinetics dormant. International Society for Stem Cell Research 2nd Annual Meeting (2004.6.11) [Boston MA, Final Program p104; 2004]

Inoue T: Symposium 5. Pharmaco- & Toxicogenomics Symposium: S5-3. Strategy of predictive Toxicogenomics a reverse toxicogenomics. Korean

Society for Biochemistry and Molecular Biology The 61st Annual Meeting 2004 (2004.5.27) [Seoul, Korea, Meeting abstract 100; 2004]

H. 知的財産所有権の取得状況

1. 特許取得：

該当しない

2. 実用新案登録

該当しない

3. その他（データベース等）

該当しない

資 料

分担研究報告

平成16-18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」 分担研究総括報告書

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。その結果、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データが見られヒトにおける曝露レベルの推計結果と比較した結果、影響の可能性について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考えられた。さらにこのように妊娠の特定の時期の比較的低用量への曝露により発達の過程で形態のみならず機能面で影響を及ぼす可能性を考慮に入れた毒性およびリスク評価の手法の検討と確立が望まれる。PubMed 医学文献データベースを用いてビスフェノールAの生物影響に関する米国 National Toxicology Program が網羅的な文献評価を実施した 2000 年以降の新たな研究論文の所在を網羅的に検索した。ヒットした文献のうち分析や野生生物への影響の文献を除き、内容により神経行動影響、免疫影響、生殖影響、体内動態などに分類し評価した結果をデータ集にまとめ公表した。ここ数年胎生期、授乳期暴露による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認められ、この点に着目して検討したところきわめて低用量（20 ng/kg 体重/日）での影響観察も報告されていた。

A. 研究目的

免疫系、神経系は内分泌系と緊密な関係を持ち、生体の生理作用の制御やホメオスタシスに関与しており、化学物質による作用は単一の標的における一個の影響に留まらない。人が暴露される低用量の内分泌かく乱化学物質による生殖系、免疫系、神経系への影響リスクの可能性について文献調査により検討した。MEDLINE 医学文献データベースを駆使してビスフェノールA (BPA) の低用量影響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（2000 年 4 月 1 日から 2006 年 11 月 9 日まで）で検索し得られた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た。これらの文献の原報を入手し、影響の種別などにより分別した。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。2004, 2005 年度は表 1 に示すフォーマットで表 2 に示す専門家の協力を得てデータ集に結果の要約をデータ集としてまとめた。

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(ECB, 2003)や産業技術総合研究所化学物質リスク管理研究センター

(NEDO/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。

表1 フォーマット

文献番号：

担当者_____

著者名：

論文題名：.

出典：

チェック項目：

1. 対象生物 ()ラット、()マウス、()人、()その他_____
2. 影響の標的臓器 ()神経系、()免疫系、()生殖系、()その他_____
3. 影響の種類 ()細胞、()組織、()個体、()その他_____
4. 曝露方法 ()経口、()埋め込み、その他_____
5. 曝露時期 ()胚・胎児、()周産期、()出生後、()成熟動物、()細胞
6. 曝露濃度 用量段階(記入_____)
7. 観察された影響の種類と濃度：一番低い影響濃度のみ記入。複数あれば記入。
統計的な信頼性などの問題はコメント欄に記す。(_____
(_____) (_____)
8. 観察時期 ()出生前、()出生後、()思春期、()成熟期
9. 論文中に低用量影響への関心 ()あり、()なし
10. 試験の信頼性について下記項目でチェックする。
EU リスク評価 ()あり、()なし：EU リスク評価文献リスト中の掲載の有無
GLP に準拠 ()はい、()いいえ 論文中に「GLP に準拠」の記述の有無
ガイドラインへの準拠 ()はい：ガイドラインの名称____、()いいえ
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) 論文中からそのまま使えるようにコピーして添付。添付した図表の番号を記す。

評価者のコメント：(200 字程度以下で記述) 報告の信頼性について前記項目でチェックした以外に、評価者のコメントについての注意をよく読み、気付いた点を記す。

表2 ビスフェノールAの低用量影響データ集作成に協力した文献調査専門家（50音順、所属はいずれも当時）

稲葉 克彦	(株)三井化学分析センター	安全科学研究部化学品安全性試験センター
内田 康一	三菱化学(株)	技術・生産センター 環境安全・品質保証部
大関 一男	ダウ・ケミカル日本(株)	エポキシ製品・中間体事業本部
大西 純一	(社)日本化学物質安全・情報センター	
川島 浩	新日鐵化学(株)	環境・安全・品質保証部
迫田 篤信	出光石油化学(株)	安全環境品質保証室
佐二木順子	千葉県衛生研究所	食品化学研究室
関澤 純	徳島大学総合科学部	
中西 義則	ジャパンエポキシレジン(株)	技術環境室
根岸 隆之	青山学院大学理工学部	化学・生命科学分子生物学研究室
花田 秀一	(社)日本化学工業協会	
吉塚 直伸	花王(株)	安全性評価研究センター

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文献の原報を入手し、影響の詳細について検討した。標的臓器別に、生殖系、免疫系、神経系、その他（レビュー、遺伝子発現、曝露および代謝を含む）の報告に分別しデータの要約をまとめるとともに中でも低用量による影響の有無とその試験の信頼性を中心に検討した。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。以下最近のデータを中心に幾つかの報告の概要を記す。

(2) 生殖系への影響

WHO/IPCS(2002)でも指摘されたように高感受性期としての胚、胎児、新生児期における生体側の状況についての知見が報告されている。受容体の発現については、新生児雄ラットの発生段階でARを発現している細胞はすべてERを発現し、セルトリ細胞でER β はARよりはるかに早く発現しており、胎児の生殖細胞を含むほとんどの芽細胞ではER β を発現しているがARは発現しておらず、外部からのEDCへの応答を考える上で重要である²⁾。

しかしヒトにおける状況がどのような知見が決定的に参考となる。この意味では、NTPの低用量影響ワークショップでも検討されなかった事柄のひとつとしてヒトとマウスの妊娠における内分泌学的な種差につき、性ホルモンの生成・変換臓器とその時期、および濃度と存在状況の違いが指摘され、その結果マウスで観察された生殖系への影響がヒトでは見られないであろうと推論されている。すなわちマウス・ラットは17beta-estradiol (E2)とエストロンを生産するがヒトはこれに加えてエストリオールを生産するという違いのみならず、ヒト母親の妊娠後期における血中E2は15-20 ng/mLでラット・マウスの妊娠後期の30-60 pg/mLの数百倍である。胎児中濃度はヒト(5-10 ng/mL)、マウス(100-150 pg/mL)と50-100倍である。ヒト胎児血ではさらに妊娠後期にエストロン(10-15 ng/mL)、エストリオール(50-100 ng/mL)濃度も高い。ヒトでは性分化は7-14週(胎児血中のE2は2-6 ng/mL)と早期であるがマウスで15日以降(胎児血中のE2は100-150 pg/mL)ですと後になる。さらにヒト胎児血漿中遊離E2は1-4.5%だが、マウス血漿中遊離E2は0.2%

と推定される。ちなみにvom Saalらがマウスの子宮内での胎児の位置による分娩後の前立腺のアンドロゲン感受性効果(オスに挟まれるか、メスにはさまれるか)を示すために投与で用いたE2レベルは子宮血中の遊離体で0.11 pg/mLから0.21 pg/mLへの増加に相当し、より高い濃度では変化は見られなかった。ヒトにおいては遥かに高濃度の天然エストロゲンにさらされており微量の比較的に弱い外界からのホルモン活性物質にさらされたとしてもマウスやラットで見られたと同じ現象が起こるとは考えにくい(Witorsch, 2002)。

良性および悪性の子宮内膜過形成症患者、閉経後の子宮癌患者、閉経前の正常女性の血清中BPA平均値はそれぞれ、 2.9 ± 2.0 ng/ml, 1.4 ± 0.4 ng/ml 1.4 ± 0.5 ng/ml 2.5 ± 1.5 ng/mlであった。この結果はエストロゲン作用を示すBPAの亢進が子宮内膜症に関与しているという予想を覆した(Hiroiら, 2004)。

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Thh1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・性行動に関係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 , $2 \times 10^3 \mu$ 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, 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)。

ラットに GD0-PND21 の間、ビスフェノール A (40 μ g/kg/day) を強制経口した (Della Seta et al., 2005)。妊娠期、授乳期にビスフェノール A を暴露した母親ラットの仔ラットに対する行動が変化し、新生仔に対する Licking-grooming (舐める、身づくろいする行動) が対照群に比較し有意に減少した。この報告は、母子行動はその後の行動に影響をおよぼすことが古くから心理学的、生理学的に知られている事実であることから他の論文で行っている周産期暴露→次世代個体への影響という実験系において次世代個体へのビスフェノール A 暴露の影響に加え、ビスフェノール A 暴露を受けている母親の行動の影響を考慮にいれるべきであることを示したという点で重要である。これについては同様の実験が過去にある (Palanza et al., 2002)。

ラットに GD0-PNW3 の間、10mg/L ビスフェノール A を 2.5mg/kg/day 相当を飲水経路で自由に摂取させた (Funabashi et al., 2004)。周産期ビスフェノール A 暴露により Bed nucleus of the stria terminalis (BST) と呼ばれる神経核におけるコルチコトロピン産生神経細胞の数における性差 (メスの方が多い) が消失したが、性的二型核である SDN-POA の性差には影響を与えなかった。性差の消失という点ではラットにおいて青斑核 (ノルアドレナリン産生神経細胞が集まる神経核) についても同様の報告 (Kubo et al., 2003) がある。

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+xylazine で麻酔、脳解剖時に BPA ($10^{-12} \sim 10^{-6}$ 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徹透析還流により 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 μ 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 μ 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 μ 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 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・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 μ 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 μ 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 μ g/kg 体重/日 (95 パーセンタイルで 4 μ g/kg 体重/日)と推定した。

マウスの妊娠期間中の 0.02 μ 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 μ 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 μ 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, Dessi-Fulgheri F, Farabollini F. Bisphenol-A exposure during pregnancy and lactation affects maternal behavior in rats. Brain Res Bull. 2005 Apr 15;65(3):255-60.

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'-isopropylidenediphenol (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.
- Funabashi T, Kawaguchi M, Furuta M, Fukushima A, Kimura F. Exposure to bisphenol A during gestation and lactation causes loss of sex difference in corticotropin-releasing hormone-immunoreactive neurons in the bed nucleus of the stria terminalis of rats. *Psychoneuroendocrinology.* 2004 May;29(4):475-85.
- Hiroi, H, Tsutsumi O, Takeuchi T, Momoeda M, Ikezaki Y, Okamura A, yokota H, Taketani Y.: Differences in serum bisphenol A concentrations in premenopausal normal women and women with endometrial hyperplasia, *Endocr. J.* 2004, 51 (6) 595-600
- 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
- IPCS: Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors , WHO/IPCS/EDC/02.2, World Health Organization, Geneva, 2002
- IRIS: Bisphenol A (CASRN 80-05-7) Integrated Risk Information System, US Environmental Protection Agency http://cfpub.epa.gov/iris/quickview.cfm?substance_nmbr=0356 (1988)
- 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.
- Kubo K, Arai O, Omura M, Watanabe R, Ogata R, Aou S. Low dose effects of bisphenol A on sexual differentiation of the brain and behavior in rats. *Neurosci Res.* 2003 Mar;45(3):345-56.
- 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.
- Palanza PL, Howdeshell KL, Parmigiani S, vom Saal FS. Exposure to a low dose of bisphenol A during fetal life or in adulthood alters maternal behavior in mice. *Environ Health Perspect.* 2002 Jun;110 Suppl 3:415-22.
- 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
- Williams K, McKinnell C, Saunders PTK, Walker M, Fisher JS, Turner KJ, Atanassova N, SharpeRM: Neonatal exposure to potent and environmental oestrogens and abnormalities of the male reproductive system in the rat: evidence for importance of the androgen-oestrogen balance and assessment of the relevance to man, *Human Reproduction Update* 7, 3 (2001) 236-247
- Witorsch RJ: Low-dose in utero effects of xenoestrogens in mice and their relevance to humans: an analytical review of the literature, *Food and Chemical Toxicology* 40(2002)905-912
- Ye X, Kuklennyik 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を収集し評価した。

(A) BPAの公表文献をMEDLINE(2000年4月から2006年11月9日)で検索された文献より、低用量に該当する影響が見られた主要なデータを表3にまとめた。ここで低用量とは、USEPA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。

以上これまで見られた低用量での影響データを濃度順に影響標的との関連で図示した結果を示す(図1)。

(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。

図1の縦軸は対数であるが、少なくとも左端の2用量は、前記曝露平均濃度以下の観察データである。図1で最も低い用量による影響は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 mRNA 発現に変化が見られ、妊娠3日から授乳期間中の 2 μg/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 μg/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っ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う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。

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)

Sekizawa J, Tanabe S.: A comparison between integrated risk assessment and classical health/environmental risk assessment: emerging beneficial properties, Toxicol. Appl. Pharmacol. 197 (3) 144

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) 297-314

関澤 純 (2004) 第5章環境ホルモンのヒトへのリスク、「環境ホルモンの基礎と最前線—水環境を中心にして—」技報堂出版

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

なし

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堂教授

研究要旨

AhR は比較的ルーズな基質特異性を持ち、様々な化合物をリガンドとする。食品中や環境中には未知の AhR リガンドが多数存在する。本研究では、染色工場の廃水から AhR リガンドを単離精製し、それらが Disperse Red 92, Disperse Yellow 64, および 3'-hydroxybenzo[b]quinophthalone であることを突き止めた。また、コーヒーやウーロン茶中に AhR リガンドが存在することを明らかにし、コーヒー中の AhR リガンドを単離精製した。また、インディルビンなどの代謝について調べ、AhR リガンドの毒性を決定する重要な因子は、自らが誘導する CYP1A1 などによる代謝のされやすさであることを示した。さらに、AhR が p21 の転写誘導を介して細胞周期の G1 アレストを引き起こすことを明らかにした。

A. 研究目的

ダイオキシンや多環芳香族炭化水素類などの環境汚染物質だけでなく、生体内や食品中にも AhR のリガンドは存在する。3年間の分担研究で、①食品中及び環境中の AhR リガンドの単離同定を試み、②天然の AhR リガンドの代謝について調べ、③AhR を介した細胞周期調節のメカニズムについて調べた。

B. 研究方法

① 食品中及び環境中の AhR リガンドの単離同定

コーヒー、ウーロン茶、緑茶、リンゴジュース、トマトジュースなどに含まれる平面構造を有する有機物を、ブルーレーヨンを用いて濃縮した。また、染料工場廃水、都市下水処理場方流水などを、ブルーレーヨン、または Sep-Pack C18 カートリッジを用いて濃縮した。抽出物を HPLC で分画し、各分画について酵母株 YCM3 を用いて AhR リガンド活性の評価を行った。活性の見られた分画をさらに HPLC で分画し、AhR リガンドを単離精製した。精密質量分析、UV スペクトル等のデータよりその化学構造を決定した。

② 天然の AhR リガンドの代謝

天然に存在する AhR リガンドのうちで、特に活性の強い、インディルビン、Indole[3,2-b]carbazole (ICZ)、6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ)につ

いて、精製した各種シトクロム p450 と反応させ、AhR リガンド活性の変化を調べた。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。

③AhR を介した細胞周期調節のメカニズム
白血病細胞株 ML-1 に AhR リガンドと TNF- α を併用曝露をすると、細胞増殖が相乗的に抑制されることを見出した。そこで、細胞周期調節に関連する遺伝子の発現を RT-PCR で網羅的に調べた。

C. 研究結果

①食品中および環境中の AhR リガンドの単離同定

コーヒー、ウーロン茶、緑茶、リンゴジュース、トマトジュースの抽出物の AhR リガンド活性を調べたところすべて検出され、中でもコーヒーがもっとも強い活性を示した。コーヒー中には複数の AhR リガンドが存在し、そのうちの一つを単離精製し精密質量の測定を行ったが、まだ構造の決定には至っていない。

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。

②天然のAhRリガンドの代謝

天然物質のうち、特に強いAhR活性を示すインドール系化合物、インディルビン、ICZ、FICZについて、AhRにより誘導されるCYP1A1、1A2及び1B1、また、AhR非依存的なCYP2B6、2C9及び3A4による代謝を調べたところ、インディルビンとFICZはCYP1A1、1A2及び1B1によって速やかに代謝された。ICZはCYP1B1でよく代謝されたが、1A1ではわずかに代謝され、1A2では代謝されなかった。インディルビンとFICZはCYP2B6でもわずかに代謝された。

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。

③AhRを介した細胞周期調節のメカニズム

ヒト白血病細胞株ML-1にインディルビンやTCDDなどのAhRリガンドと、TNF- α を同時曝露すると増殖が相乗的に抑制された。細胞増殖関連遺伝子、p15,p16,p18,p19,p21,p57, CyclinD1, D2,D3,E1,E2, CDK2,4,6について調べた結果、この処理により変動があったのはp21とCDK6のみであった。p21は相乗的に誘導され、CDK6は相乗的にダウンレギュレートされた。また、IL-1 β ,IL-2, IL-6, TNF- α , TNF- β ,TNFR2などのサイトカイン、4種類のNF κ B遺伝子、AhR, Arnt,CYP1A1についてそれぞれ調べた結果、IL-1 β , TNF- α ,COX2遺伝子などで、AhRリガンドとTNF- α による相乗的な発現誘導がみられた。

D. 考察

①食品中のAhRリガンド活性について

食品中のAhRリガンドとして最もよく調べられているのはキャベツやブロッコリーに含まれるindore 3-carbinol (I3C)である。I3C自体のリガンド活性はあまり強くないが、体内で2分子縮合して活性の高いICZを生じると考えられている。また、とうもろこし、ピーマン、ジャガイモ、唐辛子の抽出物中にもAhRリガンド活性が報告されている。このように食品中には普遍的にAhRリガンドが存在している。しかし、リガンドの化学構造はいまだ同定されていない。今回、コーヒー中のAhRリガンドの同定を試みたが、コーヒー中には数種類のリガンドが存在することが明らかとなった。今後、これら物質の化学構造を決定し、その性質を調べる必要がある。

②染色工場廃水中のAhRリガンドについて

今回、我々は染色工場の廃水から強力なAhRリガンド、DY64と3'-HB[b]QPを単離同定した。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。身のまわりの製品にこれら染料が使用されている可能性があり、今後環境中の挙動や生物影響について調査する必要がある。

③AhRリガンドの代謝について

天然に存在するAhRリガンドのなかでも特に強力なインディルビン、ICZ、FICZなどは、自らが誘導するCYP1A1や1B1などで分解されることがわかった。これに対し、TCDDはこれら酵素によって分解されにくいことが知られている。この分解のされやすさが、TCDDとインドール化合物の毒性の差を説明する一つの根拠になる。今回作成したヒトCYP1A1を組み込んだ酵母株、YCM3-CYP1A1をもちいれば、新規に同定したAhRリガンドが生体内で代謝されやすいかどうかを簡単に調べることができるだろう。

④AhRによる細胞周期調節のメカニズム

白血病細胞株ML-1で観察される、AhRリガンドとTNF- α による相乗的な細胞増殖阻害のメカニズムとして、p21の誘導とCDK6のダウンレギュレートによるG1アレストの誘導であるところまでは明らかとなった。現在、AhRリガンドとTNF- α によるp21遺伝子誘導のメカニズムの研究を進めている。

E. 結論

AhR は比較的ルーズな基質特異性を持ち、様々な化合物をリガンドとする。食品中や環境中には未知の AhR リガンドが多数存在する。また、AhR リガンドの毒性を決定する重要な因子は、自らが誘導する CYP1A1 などによる代謝のされやすさである。TCDD などの環境汚染物質による毒性リスクを評価するうえで、これら未知の AhR リガンドの構造を決定し、その代謝や生理活性について調査する必要がある。

F. 研究発表

1. 研究論文

- Misaki, Kentaro; Matsui, Saburo; Matsuda, Tomonari: Metabolic Enzyme Induction by HepG2 Cells Exposed to Oxygenated and Non-oxygenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, *Chem. Res. Toxicol.* 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.*, 41, 652-657, 2007
- 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*、第 43 巻、113-118, 2006
- 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
- BC. Lee, S. Matsui, Y. Shimizu, T. Matsuda: Characterizations of the first flush in storm water runoff from an urban roadway, *Environ. Tech.*, 26, 773-782, 2005
- Kawanishi M, Takamura-Enya T, Ermawati R, Shimohara C, Sakamoto M, Matsukawa K, Matsuda T, Murahashi T, Matsui S, Wakabayashi K, Watanabe T, Tashiro Y, Yagi T: Detection of genistein as an estrogenic contaminant of river water in Osaka, *Environ. Sci. Technol.*, 38, 6424-6429, 2004
- M. Yasui, N. Suzuki, H. Miller, T. Matsuda, S. Matsui, S. Shibutani: Translesion Synthesis past 2'-Deoxyxanthosine, a Nitric Oxide-derived DNA Adduct, by Mammalian DNA Polymerases, *J. Mol. Biol.*, 344, 665-674, 2004
- K. Sugihara, S. Kitamura, T. Yamada, T. Okayama, S. Ohta, K. Yamashita, M. Yasuda, Y. Fujii-Kuriyama, K. Saeki, S. Matsui, T. Matsuda: Aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of microsomal drug-metabolizing enzyme activity by indirubin and indigo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 318, 571-578, 2004
- J. Adachi, Y. Mori, S. Matsui, T. Matsuda: Comparison of Gene Expression Patterns between 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and a Natural Arylhydrocarbon Receptor Ligand, Indirubin, *Toxicol.Sci.*, 80, 161-169, 2004

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
- P. Chou, S. Matsui, K. Misaki, T. Matsuda: Isolation and Identification of a New AhR Ligand 3'-Hydroxybenzo[b]quinophthalone in Dyeing Wastewater, *Organohalogen Compounds (CD-ROM of Proceedings of Dioxin 2005)*, vol. 67, 1746, 2005
- H. Kaji, Y. Kida, J. Adachi, Y. Mori, Y. Sakata, K. Saeki, H. Watanabe, S. Matsui, T. Matsuda: A natural aryl hydrocarbon receptor ligand, indirubin, causes the p21(waf1/cip1) up-regulation cooperated with tumor necrosis factor-alpha, *Organohalogen Compounds (CD-ROM of Proceedings of Dioxin 2005)*, vol. 67, 745, 2005
- P. Chou, S. Matsui, T. Matsuda: Detection and Identification of Dyes Showing AhR Binding Affinity in Treated Sewage Effluents, *Proceedings of IWA international*