

200 7360-27A

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

形態形成期・思春期などの高感受性期にある集団での  
核内受容体作動性化学物質等の有害性発現メカニズムの  
解明及びその評価手法にかかる総合研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

井 上 達

平成20（2008）年3月

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

形態形成期・思春期などの高感受性期にある集団での  
核内受容体作動性化学物質等の有害性発現メカニズムの  
解明及びその評価手法にかかる総合研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

井 上 達

平成20（2008）年3月

# 厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次

## 目 次

### I. 総括研究報告書

形態形成期・思春期などの高感受性期にある集団での核内受容体作動性 化学物質等の有害性発現メカニズムの解明及びその評価手法 にかかる総合研究 .....	1
井上 達	

### II. 分担研究報告書

#### I. プロジェクト課題研究

##### 【低用量作用に関する文献調査】

高次生命系における核内受容体作動性化学物質の低用量影響に関する検討 .....	11
関澤 純	

##### 【前立腺影響研究】

低用量核内受容体作動性化学物質による前立腺重量や発育などに対する 影響に関する研究 .....	27
杉村芳樹	

##### 【発がんの蓋然性研究】

核内受容体作動性化学物質の発がん・加齢などに及ぼす影響の 分子メカニズムに関する研究 .....	32
曾根秀子	

#### II. 基盤研究

##### 【生殖・核内受容体系】

核内受容体作動性化学物質の雌性生殖器官への作用メカニズムの解明 .....	35
井口泰泉	

ヒト骨芽細胞に対する核内受容体作動性化学物質の影響に関する研究 .....	43
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 .....	48
加藤茂明	

【免疫・感染防御系】

核内受容体作動性化学物質の免疫担当細胞やマクロファージ、脂肪細胞への影響に関する研究 .....	57
山崎聖美	

核内受容体作動性化学物質の免疫応答制御に及ぼす影響に関する研究 .....	60
五十嵐美德	

【中枢神経・行動系】

神経系初期発生における核内受容体の機能及び核内受容体作動性化学物質の低用量影響に関する解析 .....	63
菅野 純	

核内受容体作動性化学物質の海馬記憶過程に及ぼす影響 .....	73
川戸 佳	

核内受容体作動性化学物質の中枢影響に関する研究 .....	76
栗生修司	

【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 .....	80
五十嵐勝秀	

【資料】

特別講演	
化学物質の胎盤機能修飾を考慮した発生毒性に関する研究 .....	85
中西 剛 大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野	

話題提供

アリールハイドロカーボン受容体の生物作用： 自然発生腫瘍の抑制と寿命の延長 .....	88
平林 容子 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	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	89
---------------------------	----

# I . 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

総括研究報告書

形態形成期・思春期などの高感受性期にある集団での核内受容体作動性化学物質等の有害性発現メカニズムの解明及びその評価手法にかかる総合研究

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

1996年12月ロンドン郊外のWeybridgeで内分泌かく乱化学物質問題に関する最初の国際ワークショップが開催されて以来10年が経過した。医薬品はもとより農薬、工業用化学物質の中に内分泌系受容体作用を引き起こすホルモン様化学物質と、その延長線上で内分泌障害をひき起こす内分泌かく乱物質がありうるものとの生物学的蓋然性はこの会議をもって世界保健機構(WHO)と、経済開発協力機構(OECD)とによって協同作業が取り決められ、その後のとりくみが始まった。

当研究班は、性ステロイドホルモンの投与が、生殖機能のかく乱更には生殖器系腫瘍の誘発につながる旨の既知の知見に立脚し、この問題の生物学的蓋然性を基礎として、その生物影響の本質がホルモン受容体、ひいては核内受容体を介した化学物質の高次生命系機能に及ぼすものとの仮説的認識に立って新たな3年間の研究に着手した。

具体的には、申請時のスキームに沿って、引き続き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焦点を当てたプロジェクト課題研究と、生殖・核内受容体系、免疫・感染防御系および中枢神経・行動系に係る生体統御システムとしての高次生命系、ならびにその他の核内受容体作動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た。なおこれらの研究推進の留意点として、本邦における研究の進展とも相俟って明らかになったホルモン様化学物質の種々の核内受容体群間での作用の相互修飾や生殖器系や本研究で取り上げてきた高次生命系以外の諸臓器（肝、脂肪、骨組織、マクロファージ、胎盤等）でのホルモン受容体作動臓器としての新たな役割を拡張すること、併せてもって胎児期・新生児期や思春期など形態形成期での不可逆的高感受性の問題を追及するものとする。

以上のような総合的な立場から、本研究でのテーマを、いわゆる内分泌かく乱化学物質に限定せず、核内受容体作動性化学物質の生体影響研究として、核内受容体フィ

ードバック系の認められる高次生命系全般を対象とし、そこにおける蓋然性としての有害性発現メカニズムの解明を研究目的とし、ここから導き出される標的分子と応答遺伝子の相互関係によって総合的な評価手法の開発を行うことを目標とすることとした。

[プロジェクト課題研究]では、引き続き[低用量作用に関する文献調査]の一環としてビスフェノールA(BPA)に関する文献を中心に検索を続けた。結果、新たに17方が選別された。またこのNTPの環境健康リスク専門家(CERHR)のBPAレビュー結果についても取り上げた。[前立腺影響研究]についてはBPA特異的発現遺伝子SF1の基底上皮限局性発現を見出した他、[発がんの蓋然性研究]については、BPAがヒト乳腺上皮細胞の増殖を用量依存的に促進したこと、これに伴う変動遺伝子群86個を定量的に同定した。

また、[基盤研究]においては、[生殖・核内受容体系]では、臨界期における核内受容体作動性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を目的として、出生直後のマウスに合成エストロゲン、エストロゲン受容体(ER)αおよびβの特異的リガンドを投与し、関与する受容体サブタイプを検討した。核内レセプターの転写制御機能の分子レベルでの解析については男性、女性ホルモンレセプターおよびダイオキシンレセプターに相互作用する複合体を解析した。またBPAのSteroid Xenobiotic Receptor(SXR)を介した骨芽細胞に対する影響について細胞増殖作用の如何についての検討が行われた。[免疫・感染防御系]については核内受容体に作用する化学物質がマクロファージなどの免疫担当細胞ならびに脂肪組織細胞に及ぼす影響、Tヘルパーリンパ球前駆細胞の分化に及ぼす影響の2点について研究した。[中枢神経・行動系]では、マウス胎児神経幹細胞初期培養系における増殖、分化への影響を検討する。海馬スライス中の神経スパイン形成への影響ならびに中枢影響の行動およびニューロン変化に基づく評価法の確立に向けての研究を行った。なお[マイクロアレイ基盤整備]課題として破骨細胞特異的ERαノックアウトマウス骨髄細胞の網羅的遺伝子発現解析とAndrogen受容体変異体(T877A)ノックインマウスにおける前立腺癌増悪に関わる遺伝子のそれぞれ網羅的検索解析を行った。

分担研究者

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

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

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

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  
 川戸 佳 東京大学大学院総合文化研  
 究科広域科学専攻 教授  
 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  
 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  
 杉村芳樹 三重大学医学部泌尿器科学  
 教授  
 関澤 純 徳島大学総合科学部 教授  
 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  
 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

#### A. 研究目的

本総合研究で設定した統括的目的は、核内受容体作動性の生殖・核内受容体系、免疫・感染防御系および中枢神経・行動系などの高次生命系における発現遺伝子シグナルのかく乱を指標として形態形成期や思春期にある高感受性集団に想定される影響について各々の系における影響メカニズムを統一的に理解し、もって評価法の確立にむけて研究を推進することにある。対象器官としては核内受容体の分布に応じて肝、心、血管組織、脂肪織をはじめマクロファージ系へも対象を拡張し、実験動物におけるこれまで観察された表現型を内分泌かく乱症候群として位置づけ化学物質の惹起しうる有害性評価を念頭におきつつ安全管理へ向けての

方策の確立を目指す。[プロジェクト研究]の個別課題としては[低用量作用に関する文献調査]では核内受容体作動性化学物質 BPA の低用量影響を中心に 2006 年 10 月から 2007 年 11 月までの文献調査及び米国 NTP の CERHR における生殖・発生毒性に関するレビューの結果との評価の照合、相互対比を行う。また[前立腺影響研究]では、成獣マウスでの低用量 BPA 暴露による前立腺基底上皮の異常増殖機構の解明に向けて研究を行う。[発がんの蓋然性研究]では BPA の発がん促進作用の分子メカニズムを明らかにすることを目的として、ヒト乳腺上皮細胞 (HMEC) における BPA の細胞増殖・細胞老化への影響を調べる。[生殖・核内受容体系]では各種エストロゲン作動性物質の標的をエストロゲン受容体  $\alpha$  および  $\beta$  を用いて明らかにする。かく乱物質による修飾影響の観察を目的とし出生直後に DES を投与されたマウス雌性生殖器官の遺伝子のメチル化の変動も解析する。核内性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低容量内分泌かく乱化学物質の性生殖へ影響を及ぼす作用点を分子レベルで解明する。ヒト骨芽細胞影響研究では BPA の Steroid Xenobiotic Receptor (SXR) を介した骨芽細胞に対する影響を検討することを目的とする。[免疫・感染防御系]では核内受容体に作用する化学物質のマクロファージなどの免疫担当細胞に及ぼす影響と同じく BPA が T 細胞ヘルパー前駆細胞の Th1 および Th2 への分



化バランス制御に対する影響とを観察する。[中枢神経・行動系]では、神経幹細胞の増殖分化における核内受容体機能の解明、神経細胞の女性ホルモンによる分化の可塑性ならびに核内受容体作動性化学物質の中枢性行動制御とニューロンレベルの分化との関連に注目した評価法を確立することなどを目的とした。[マイクロアレイ基盤整備]では、当研究班での相互的関連研究分野に DNA マイクロアレイ解析技術を適用することで、核内受容体作動性化学物質に関連する遺伝子の網羅的発現解析を行い、各班員の研究の基盤を支えることを目的とする。

## 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。[プロジェクト研究]では[低用量作用に関する文献調査]については、2006年11月10月から2007年11月までに新たに公表された BPA の哺乳類への影響報告を MEDLINE を用いて調査し、あわせて EPA の報告を入手し詳細の検討を行った。CERHR 専門家グループによる BPA の生殖・発生毒性レビューと照合を進めつつある。[前立腺影響研究]については BPA 経胎盤投与による仔雄マウス泌尿生殖洞の形態組織学的変化と遺伝子発現変化を解析した。[発がん蓋然性研究]についてはヒト乳がん上皮細胞 HMEC (6 世代目) を培養し、9 世代目にて、0.5%DMSO に溶解した  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  M の BPA の BrdU の取り込み量による細胞周期の検索、

細胞老化のマーカー (ヘテロクロマチンプロテイン-1 $\gamma$ ) の検索を行った。また同時に、選択発現遺伝子 86 個について、定量的リアルタイム PCR を施行した。[生殖・核内受容体系]では、出生直後から 5 日間、C56BL 系雌マウスに合成エストロゲン (DES)、ER $\alpha$  および ER $\beta$  特異的リガンドを投与して、雌性生殖器官への影響を調べた。(ER $\alpha$  特異的リガンドとしては propyl pyrazole triol (PPT)、ER $\beta$  特異的リガンドとしては diarylpropion-nitrate (DPN) を用いた。) また男性ホルモン-女性ホルモンレセプターおよびダイオキシンレセプターに結合する転写共役因子複合体に関する研究ではこれらレセプター群に結合する転写共役因子複合体を生化学的に精製及びその構成因子群の同定を行い、また複合体としての機能を *in vitro* 系で評価した。さらに骨細胞への影響については、ヒト骨芽細胞株 hFOB に SXR を安定発現させ、BPA の影響 (増殖、遺伝子発現及びコラーゲンの蓄積) を確認した。さらに BPA による hFOB の微細構造の変化を電子顕微鏡にて観察した。[免疫・感染防御系]では、マクロファージ、脂肪組織の検索では C57BL/6 マウスに総エネルギー比 30% (30en%) の脂肪を含むエサを与え、さらに BPA を 0.005  $\mu$ g、0.05  $\mu$ g、0.5  $\mu$ g/ml になるように飲料水に加え、30 週間投与し肝臓、脂肪組織について調べたほか、T 細胞分化研究では、5 週齢オスの BALB/c マウスの脾細胞を NKT 細胞特異的脂質抗原  $\alpha$

-galactosylceramid ( $\alpha$ -GalCer) で刺激し、同時に種々の濃度の BPA を添加して培養した際のサイトカインの産生 IFN- $\gamma$  を ELISA 法で解析した。[中枢神経・行動系]では、マウス胎児神経幹細胞初期培養系を用いて諸々の核内受容体を化学物質で刺激もしくは発現の抑制下で増殖、分化への影響を観察した他、ラット海馬のスライスによる蛍光色素の微細注入法による神経スパインの密度の増減解析、ならびに電気生理学的解析を行ったほか、行動評価では、探索行動、ストレス対処行動などの指標と電気生理学的、神経化学的検討を比較した。[マイクロアレイ基盤研究]では各班員との協議の下、共同研究を行い、組織もしくは細胞の検体の供与を受け、DNA マイクロアレイ解析データ解析結果を班員にフィードバックした。

### C. 結果・考察

本研究の初年度開始以来約 8 ヶ月において当研究班からの英文国際誌における成果の発信は Nature 誌及び Nature 関連誌 4 報を含む 83 報であった。この他米国 EPA など核内受容体関連物質研究機関の企画する国際的学術講演会等での当研究班からの参画は注目すべき結果であった。個々の結果内容としては[プロジェクト研究]では[低用量作用に関する文献調査]では従来指摘されたエストロゲン受容体経路だけではなく SXR 経路などの他のメカニズムも指摘されていた。米国の NTP の CERHR による生殖・発生毒性に関する低用量影響調査との比較

では CERHR と本研究での重複例が 7 報のみ見出された。これは CERHR の調査が標準的な試験法に限定したことによるものと判断された。また[前立腺影響研究]では BPA および DES の経胎盤投与とともに仔雄マウス泌尿生殖洞の ER $\alpha$  発現量を上昇させたが、SF1 の発現誘導は BPA に特異的であった。SF1 発現は基底上皮に限局していたものの、扁平上皮化は認められなかった。また、BPA および DES 投与群では基底上皮の過増殖や腺周囲に ER・陽性の間質細胞が出現した。[発がん蓋然性研究]については BPA は、用量依存的に細胞の増殖を促進した。BrdU の取り込み細胞の分布では S 期の細胞が増加し、アポトーシス細胞の割合では BPA 曝露群で減少が見られ、HP1 gamma 陽性細胞の割合も用量依存的に増加傾向にあった。第 11 世代目の HMEC での発現遺伝子 86 個についての定量的リアルタイム PCR の結果では 10<sup>-9</sup>M においては、Nexin/plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI/PAI-1, SERPINE1)、Estrogen receptor 1 (ESR1)、Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2, COX-2/COX2)などで BPA 曝露により 2 倍以上の活性の上昇を認めた(詳細は分担報告書参照)。また[基盤研究]では[生殖・核内受容体系]では出生直後の DES および ER $\alpha$  リガンド投与では、無排卵、子宮筋の乱れ、恒久的な遺伝子発現を伴う卵巣非依存の膈上皮の増殖が誘起されたが、ER $\beta$  リガンドでは異常は起こらなかった。ER を介した雌性生殖器官の異常の誘起は、主として ER を介していることが明らかとなっ

た。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では同因子をを同定するとともにダイオキシンレセプターが女性ホルモンレセプターの蛋白分解を促進することを見出した。さらに脂肪細分化制御におけるダイオキシンレセプター複合体を同定した。骨細胞影響研究では、SXR を安定発現した hFOB では BPA の細胞増殖作用が強く認められた。また、BPA の添加によって SXR 応答遺伝子群の発現が誘導され、細胞内のコラーゲンが蓄積する傾向が認められた。[免疫・感染防御系]の研究では BPA の脂肪組織に対する影響研究については、脂肪組織重量、肝臓 TG 量が増加しており、肝臓においては、TG 合成にかかわる核内受容体 PPAR $\gamma$  やその標的遺伝子 CD36、マクロファージの浸潤や炎症マーカーである TNF $\alpha$ 、CD68 などの mRNA の発現が増加していた。また BPA の T 細胞分化に与える影響研究では BPA ( $10^{-8}$ ~ $10^{-5}$ M) は *in vitro* で Th2 優位なサイトカイン産生を誘導した。また、*in vivo* では投与量依存的に血中 IgE が増加する傾向を示した。[中枢神経・行動系]では胎児由来神経幹細胞の培養系では胎生 11 日、14 日の胎児終脳から神経上皮細胞を分離し、bFGF と同時に EGF を添加して培養する NS cell 培養法を試したところ、ともに少なくとも 10 回以上未分化状態を保ったまま継代可能であることを確認した。また、成獣ラット海馬スライスを用いた研究では、10 nM ビスフェノール A (BPA)、1 nM DES、10 nM エストラジオールは 2 時間以内で、CA1 領域の神経の樹状突起上のスパイ

ン (シナプス後部) 数を増加させることを画像解析で確認した。頭の直径の細い thin type というスパインが特に増加したが、CA3 領域ではエストラジオールはスパイン密度を低下させた(詳細は分担報告書参照)。また、行動研究では環境中に存在する核内受容体作動性化学物質は性依存的に探索行動やストレス対処行動、体重のセットポイントに影響を及ぼし、情動行動については性非依存的に影響を及ぼした。大脳辺縁系への影響も認められた。[マイクロアレイ基盤整備]では次の 2 研究への支援を行った。すなわち 1) 破骨細胞特異的 ER $\alpha$  ノックアウトマウス骨髄細胞の網羅的遺伝子発現解析追加解析、2) Androgen receptor 変異体 (T877A) ノックインマウスを用いた前立腺癌増悪に関わる遺伝子の網羅的検索を実施した。

## E. 結論

概略ならびに結果と考察の項でもふれたが以下に個々の研究の結論を簡潔に述べる。すなわち、[プロジェクト研究]では、[低用量作用に関する文献調査]では、2006 年 11 月以降 2007 年 11 月までの文献調査により得られた 17 報と米国 NTP の CERHR による生殖発生毒性論文評価 42 報とを総合的に比較検討した。また [前立腺影響研究]では、マウス胎児期への低用量 BPA 暴露が泌尿生殖洞間質細胞における性ホルモン受容体発現を変化させ、発生初期の腺周囲に筋線維芽細胞が増加することで基底上皮の増殖が刺激される可能

性を示した。ヒト前立腺疾患（肥大症結節や前立腺癌）では筋線維芽細胞が増加していることと併せて考えると、BPA への暴露による前立腺組織構築の変化が、肥大症結節の発生や癌の悪性化に関与していると推察された。[発がんの蓋然性研究]では、BPA は、HMEC の増殖を用量依存的に促進した。またヒト乳がん組織における変動の知られる遺伝子群 86 個について定量的な遺伝子発現量を調べた結果、BPA は、細胞周期の停止やアポトーシスの誘発を阻止し、増殖のみ促進する作用が見出された。[基盤研究]では、[生殖・核内受容体系]についてはエストロゲン作用物質が主として ER $\alpha$  を介して、雌性生殖器官に影響を及ぼすことが明らかとなった。すなわち、エストロゲン作用を持つ物質が臨界期のマウスに作用する場合、視床下部下垂体卵巣系の無排卵、子宮筋層の乱れ、膣上皮の不可逆的増殖といった影響は、エストロゲン受容体 $\alpha$  を介して作用する可能性が高いことが明らかとなり、不可逆的に上皮が増殖している膣ではいくつかの遺伝子が恒久的に発現していることを明らかにした。また性ホルモンレセプターの転写制御能研究では、レセプター相互作用因子としての異物受容体の役割を中心に研究を行った。骨影響研究では、hFOB に対する BPA 添加による細胞増殖とコラーゲン蓄積に SXR が関与することが明らかとなった。[免疫・感染防御系]では、BPA 投与群では、脂肪組織重量、肝臓 TG 量が増加した。マクロフ

ージによる炎症性マーカーも増加しており、摂取した BPA が肥満や脂肪肝に関与していることが明らかとなり、また T ヘルパー前駆細胞 NKT 細胞への BPA 曝露は IL4 産生にリンクした Th2 優位なサイトカイン産生バランスを誘導した。[中枢神経・行動系]では、神経幹細胞の分化増殖において核内受容体が重要な役割をしていることを始めとした基礎的な解析を行った他、成獣ラット海馬スライスにおける ex vivo 研究では BPA、DES がスパイン形成に女性ホルモンの作用と類似の影響を与えることを観察した。さらに行動研究では、核内受容体作動化学物質の発達期曝露は耐用 1 日摂取量以下の濃度でも中枢神経系に作用し、性依存的あるいは性非依存的に非生殖行動に影響を及ぼす。[マイクロアレイ基盤整備]では、網羅的遺伝子発現解析を用いることで、各班員の研究方向決定に影響を与える情報を短期間のうちに得ることを狙いとして実施した。網羅的遺伝子発現解析技術は、数万の遺伝子の発現を迅速に検討できる有効な技術であり、既知の情報から推測することが困難な新たな情報を提供してくれる可能性を秘めた解析手法であり、明確な表現型を伴って影響が現れることが少ない核内受容体作動性化学物質の作用を、その作用メカニズムに立ち入って解析する際に有力な手法となることが示された。

## 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

原著

Hirabayashi Y, Inoue T. 2007. Implications of hemopoietic progenitor cell kinetics and experimental leukemogenesis: Relevance to Gompertzian mortality as possible hematotoxicological endpoint. *Exp Hematol.* **35**: 125-133.

Hirabayashi Y, Yoon BI, Tsuboi I, Huo Y, Kodama Y, Kanno J, Ott T, Trosko JE, Inoue T. 2007. Membrane Channel Connexin 32 Maintains Lin(-)/c-kit (+) Hematopoietic Progenitor Cell Compartment: Analysis of the Cell Cycle. *J Membr Biol.* **217**: 105-113.

Hirabayashi Y, Yoon BI, Tsuboi I, Huo Y, Kodama Y, Kanno J, Ott T, Trosko JE, Inoue T. 2007. Protective role of connexin 32 in steady-state hematopoiesis, regeneration state, and leukemogenesis. *Exp Biol Med (Maywood).* **232**: 700-712.

Minami A, Tsuboi I, Harada T, Fukumoto T, Hiramoto M, Koshinaga M, Hirabayashi Y, Kanno J, Inoue T, Aizawa S. 2007. Inflammatory biomarker, neopterin, suppresses B lymphopoiesis for possible facilitation of granulocyte responses, which is severely altered in age-related stromal-cell-impaired mice, SCI/SAM. *Exp Biol Med (Maywood).* **232**: 134-145.

Yoshida K, Hirabayashi Y, Wada S, Watanabe F, Watanabe K, Aizawa S, Inoue T. 2007. p53 (TRP53) deficiency-mediated antiapoptosis escape after 5 Gy X irradiation still induces stem cell leukemia in C3H/He mice: comparison between whole-body assay and bone marrow transplantation (BMT) assay. *Radiat Res.* **167**: 703-710.

### 2. 学会発表

Hirabayashi Y, Yoon BI, Igarashi K, Kanno J, Yodoi J, Inoue T. Xenobiotic response in Thioredoxin gene modified mice. The 4<sup>th</sup> Meeting of International REDOX Network (2007.10.30) [Jeju Island, Korea, Meeting Abstract 78; 2007]

Tohru Inoue. Attenuation of oxidative stress in the Trx-overexpression mice: Study on benzene induced hemopoietic malignancies. The 4<sup>th</sup> Meeting of International REDOX Network (2007.11.2) [Jeju Island, Korea, Meeting Abstract 53; 2007]

井上 達、尹 秉一、児玉幸夫、菅野 純、藤井義明、平林容子：ベンゼンの造血障害発現機構：多環芳香族炭化水素受容体の関与と骨髄特異的異物代謝の関与の役割について。第 69 回日本血液学会総会 (2007.10.11) [横浜, プログラム・抄録集 pp159; 2007] [Inoue T, Yoon BI, Kodama Y, Kanno J, Fujii-Kuriyama Y, Hirabayashi Y. Benzene induced hematotoxicity: Role of AhR and possible bone marrow specific

- Cyp2E1 expression. 69<sup>th</sup> Annual Meeting for the Japanese Society of Hematology (2007.10.11) [Yokohama, Meeting Abstract 159; 2007]]
- 井上 達、尹 秉一、李 光勳、金子豊蔵、黒川雄二、菅野 純、藤井義明、平林容子 : AhR, a suppressor gene: mice with low AhR or KO exhibit a shortened lifespan with early onset of spontaneous neoplasms. 第 66 回日本癌学会総会 (2007.10.3) [横浜, (日本癌学会総会記事 pp122; 2007)] [Inoue T, Yoon BI, Li GX, Kaneko T, Kurokawa Y, Kanno J, Fujii-Kuriyama Y, Hirabayashi Y. AhR, a suppressor gene: mice with low AhR or KO exhibit a shortened lifespan with early onset of spontaneous neoplasms. 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2007.10.3) [Yokohama, Proceedings 122; 2007]]
- Hirabayashi Y, Yoon BI, Li GX, Kanno J, Fujii-Kuriyama Y, Inoue T. Aryl hydrocarbon receptor suppresses spontaneous neoplasms and extends life span: possible mechanism implied by hematopoietic stem cell kinetics. 27<sup>th</sup> International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (Dioxin 2007) (2007.9.4) [Tokyo, (Meeting abstract p18, 2007)]
- Hirabayashi Y, Yoon BI, Tsuboi I, Huo Y, Kodama Y, Kanno J, Ott T, Trosko JE, Inoue T. A new toxicological biomarker, connexin 32, in the hematopoietic stem cells: the deficiency induced a prolongation of chemical damage and an increased incidence of leukemogenesis. International Congress of Toxicology XI (2007. 7.18) [Montréal, Canada, Meeting abstract PW3.54]
- Inoue T, Hirabayashi Y. Gompertzian expression of the lifespan elucidates a theoretical and toxicological ultimate risk. International Congress of Toxicology XI (2007. 7.18) [Montréal, Canada, Meeting abstract PW12.259]
- Hirabayashi Y, Yoon BI, Tsuboi I, Huo Y, Kodama Y, Kanno J, Ott T, Trosko JE, Inoue T. Hematopoietic progenitor cell specific expression of Cx32: Possible role in the steady state hematopoiesis and the leukemogenesis 5<sup>th</sup> ISSCR Annual Meeting (2007.6.20) [Cairns, Australia, Meeting abstract p344]
- 井上 達、平林容子 : 話題提供「老化と環境化学物質生体応答」日本基礎老化学会第 30 回大会 (2007.6.22) [札幌, (基礎老化研究 31(2); 44, 2007) ] ) [Sapporo, Biomedical Gerontology 31(2); 44, 2007]]
- Hirabayashi Y, Yoon BI, Li GX, Fujii-Kuriyama Y, Kaneko T, Kanno J, Inoue T: Aryl hydrocarbon receptor (AhR): dual functions, one for tumor promotion through drug metabolism and the other for tumor suppression. Society of Toxicology 46<sup>th</sup> Annual Meeting & ToxExpo (2007.3.27) [Charlotte, NC, USA, The Toxicologist 96 (1), 157,

2007]

井上 達、松下智哉、五十嵐勝秀、菅野  
純、平林容子：一般口演「環境因子」  
第 96 回日本病理学会総会(2007.3.15)  
[大阪、日本病理学会会誌 96: 224;  
2007] [Inoue T, Matsushita T, Igarashi K,  
Kanno J, Hirabayashi Y: (英文タイトルの  
登録無し) . 96<sup>th</sup> Annual Meeting for  
the Japanese Society of Pathology  
(2007.3.15) [Osaka, Proceedings of the  
Japanese Society of Pathology 96(1):  
224; 2007]]

#### 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

## Ⅱ. 分担研究報告書

### I. プロジェクト課題研究



厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

高次生命系における核内受容体作動性化学物質の低用量影響に関する検討

分担研究者 関澤 純 徳島大学総合科学部 教授

研究要旨 (1)ビスフェノールAはきわめて低用量の曝露により核内受容体経由で通常の毒性試験では検出されない生殖・発生影響を誘起する可能性が指摘された。(2)関澤はビスフェノールAに関し2003年以降公表された報文からこれら影響の報告を抽出し影響が観察された濃度の低い順に17報を影響の種類毎に分類・整理した。(3)米国National Toxicology Program(NTP)のCERHR専門家グループの2007年中間報告はビスフェノールAの毒性試験報告をレビューし試験計画や条件・データの統計処理などで毒性評価上適切と判断される試験報告42報を指摘、抽出した。(4)本研究で2007年11月末までに新たに公表されたビスフェノールAの文献につき低用量影響の有無を検討したところ12報が該当した。経口投与で最も低い投与濃度は2 µg/kg bw/dayで神経系への影響に関するものであった。また発生期間中の曝露によるepigeneticな影響と考えられる報告も注目された。(5) 昨年までに関澤が抽出した17報の低用量影響報告のうちCERHRが影響評価に適切と判断した報告は6報だったが、CERHRも指摘したように神経行動への影響の報告が多く子供は成人に比べUDPGTの発現が低く親化合物により多く暴露する可能性があるため影響の性質と毒性試験の標準化の点から検討を進める必要があり、OECDは2007年に発生神経毒性試験指針を公表し今後の研究成果の検討に参考となる。

#### A. 研究目的

核内受容体作動性物質ビスフェノールA(Fig.1)の低用量影響の可能性が注目され、米国National Toxicology Program(NTP)のCERHR(Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction)は2007年に毒性に関するレビューの検討結果を中間報告した。関澤がこれまで独自に行った低用量影響報告の検討結果とCERHRのそれを相互参照し、現時点におけるビスフェノールA

の低用量影響の蓋然性について検討する。CERHRがカバーしていない2007年11月末までの新たな報告を入手し検討する。

#### B. 研究方法

(1) CERHR専門家グループによるビスフェノールAの生殖・発生毒性レビューの2007年中間報告を入手し、試験計画、条件、データの統計処理などの観点から試験の適切さを評価した部分を調査した。  
(2) 関澤は2004年以降に出版されたビス

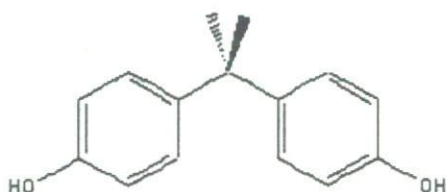


Fig. 1 Chemical Structure of Bisphenol A

フェノールAの試験報告について、低用量影響を報告していると考えられた報告を抽出し、CERHR専門家グループによる試験報告の計画、データの統計的な処理などの適切さ判定を参照して信頼性の高い低用量試験報告の選別を行ない、低用量影響の蓋然性とメカニズムについて考察する。

(3) 昨年調査以降2007年11月末までに新たに公表されたビスフェノールAの影響報告をMEDLINEを用いCAS番号(80-05-7)で検索し121件を得た。このうち分析法、環境中生物への影響、プラスチック製品などに関する文献を除き、50件を抽出しそれらの原報を入手し、低用量影響に関わるデータの有無ほかの詳細について検討した。

(4) 毒性試験の標準化についてのOECDの情報も入手した。

(倫理面への配慮)

特になし

### C. 研究結果

(1) 高次生命系における核内受容体作動性化学物質であるビスフェノールAについては、従来指摘されたエストロゲン受容体経路だけでなくSXR経路他のメカニズムも指摘されている。ビスフェノールAの低用量影響の可能性は数年前より注目され、多

くの研究がなされてきた。米国のNational Toxicology Program/米国保健省のCERHRは2000年の専門家グループによる低用量影響レビュー(NTP, 2000)に引き続き2006年から2007年にかけて生殖・発生毒性の検討を行い中間報告を公表した(CERHR, 2007)。(2) CERHR専門家グループがビスフェノールAの生殖・発生毒性評価の観点から、適切と判断した試験報告は42報であった(表1)。

(3) CERHRは以下のように結論草案をまとめている。妊婦と胎児、子供について、ビスフェノールAへの子宮内と子供の暴露により神経・行動影響の懸念はあるが、前立腺への影響への影響や、早熟な思春期の可能性についてはほとんど、出産と奇形については懸念はない。成人については生殖への影響の懸念はない。レビューでは、ヒトの曝露、生殖および発生毒性について、科学的な証拠の質と量、強さを検討し、いくつかのギャップと共に追加の研究の必要性を指摘した。

遺伝毒性については、20  $\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$ に皮下埋設ペレットからの曝露により減数分裂に影響を及ぼす可能性が指摘され、この影響はエストロゲン受容体B(ERB)KOマウスでERBをブロックすることでも見られた(Susiargo et al., 2007)。発ガンの可能性はこれまでの試験結果から否定される。子供は成人に比べてUDPGTの発現が5分の1程度であるため抱合されない親化合物により多く曝露する可能性がある。発生毒性データについては、多くの試験で、同腹効果や多群の検定について説明不足、試験動物数の不足、ケージ内のクロスコンタミネーションの可能性などが指摘された。また溶

媒に用いたDMSOが生物影響する可能性があるなどの問題が見られた。

(4) 2007年に公表されたビスフェノールA投与動物試験の文献中で用いられた動物種などの内訳は、マウス16件、ラット11件、ヒト6件、細胞14件、レビュー2件、他3件であった。これら報告のうち低用量影響を報告した12文献とin vitro試験報告の要約を以下に記す(表2)。

ICRマウスに妊娠11日から17日まで2 µg/kg bw/日のビスフェノールAを投与したところ、雄新生児脳内背側縫線核におけるER $\alpha$ とER $\beta$ の免疫抗体反応は5週と13週で上昇したが9週では差は消失した。セロトニン、セロトニントランスポーター陽性細胞数、血清テストステロン濃度は上昇したが有意差は見られなかった(Kawaiら2007)。

C57BL/6Jマウスに2 µgまたは300mg/kgbw/日のビスフェノールAを経口投与(交配前から離乳期まで)し得られた雄児(7-11週令)は、不安誘発行動、運動学習障害、elevated plus maze test, rota-rod testにおいては対照と有意な違いを示さなかった。しかしstep-through passive avoidance testでは記憶障害が両投与群で見られ、acetylcholine生成のマーカであるcholine acetyltransferase様免疫活性の大きな減少を示し、海馬でのacetylcholine生成減少による記憶障害の可能性が示された(Miyagawaら2007)。

CD-1マウスに妊娠11日から分娩8日まで10 µg/kgbw/日のビスフェノールA, または20 µg/kgbw/日のMthoxychlor(MXC)を経口投与した。出生30日(思春期前)にNovelty-seeking testと出生70日(成熟期)Free-exploratory open-field test, Elevated

plus maze testを実施した。ビスフェノールA暴露によりいずれの試験でも、またMXC暴露により一部の試験で行動における性差に変化が見られた(Gioiosaら2007)。

ddYマウスにビスフェノールAを450 µg/kg bw/日を妊娠から離乳に至るまでの期間、経口投与した。胎児暴露された雌での出生後8-11週目の大脳基底核の黒質(substantia nigra)におけるtyrosineからDOPAを生成するtyrosine hydroxylase免疫抗体陽性の神経細胞が有意に減少したが雄では変わらなかった。Calbindinやcalretinineなどのカルシウム結合タンパクには変化は見られなかった(Tandoら2007)。

母獣(樹立されたA<sup>vy</sup>マウス)への10 mg/kgbw/日のビスフェノールA経口投与(交配2週間前から妊娠期を経て離乳期まで)により胎児のAgouti遺伝子上流のIAP (Intracisternal A-particle) と呼ばれるレトロトランスポゾン型配列の9つのサイトでCpGにおけるメチル化が(27%±から2.8%39±2.6%へ)減少しViable yellow agouti (A<sup>vy</sup>)マウスの背毛の色は黄色から黒味がかかった色の割合が10%から21%に増す。Methyl donorである0.7 mg/kgbwのFollic acid (+vit.B12, betaine, choline chloride)またはGenistein(40 mg/kgbw)を同じ時期に併用するとこの影響を逆転できる。発生初期のビスフェノールA暴露がepigenomeに変化を与えることで子の表現型に影響し、さらにその影響は母獣の食餌にある成分を添加することで抑制可能なことを示す(Dolinoyら2007)。

Wistarラット受胎9日に浸透圧ポンプを埋めこみ2.5, 25, 250, 1000 µg/kg bwビスフェ

ノールA/日を出生まで投与した。全ての投与群で出生後50日あるいは95日目に乳腺の管に過形成が増加し、その中に非浸潤性癌(Carcinoma in situ:CIS)が観察された。細胞増殖の指標であるKi67やER $\alpha$ 陽性の細胞数がCISにおいて増加しビスフェノールA暴露により細胞増殖性の前がん病変が誘起された(Murrayら 2007)。

JCR/Jclマウスに受胎0.5日から12.5, 14.5, あるいは16.5日のBrdU投与直前まで、20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw ビスフェノールA/日を皮下投与した。出生3週後には14.5日BrdU投与群で、大脳皮質のV層とVI層のBrdU陽性細胞の頻度と割合がビスフェノールA投与群で増加したがIV3層についてはBrdU陽性細胞の割合が対照に比べて少なかった。この差は出生12週後では見られなかった。視床皮質投射(thalamocortical projection)でもビスフェノールA投与群の異常が観察された(Nakamuraら 2007)。

妊娠11.5日のC57BL/6マウスにビスフェノールAを20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw/日放出するペレットを埋設し、妊娠18.5日に母獣から雌胎児を得、減数分裂前期の卵母細胞を摘出した。ビスフェノールA処理により対合の障害や組換えの増加が起き、分娩された雌胎児を用いてこのような異常から成熟雌で異数性の卵や胚を生じることが見られた。MLH1はマウスの減数分裂組換えに必要なミスマッチ修復たんぱくでMLH1 fociは交叉のサイトの標識に用いられるが、MLH1 fociの数で比較して無処理 $\beta$ ERKOの減数分裂前期細胞は、ビスフェノールA処理の野生型マウスと同じ障害を示し、ビスフェノールA処理によりさらに悪化することはなかった(Susiarjoら 2007)。

妊娠8日(胎児の器官形成開始期)の雌Wistarラットに皮下ミニチュアポンプを埋め込み離乳期までビスフェノールAを25  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ となるように暴露した。さらに出生後50日(思春期)に仔に25mg/kg(発癌量以下)のN-Nitroso-N-Methylurea(NMU)を腹腔内投与したところ、前がん病変(管過形成, BrdU/Apoptotic cell Indexの上昇、支持組織の核濃度のマスト細胞増加)が見られ、出生前暴露は乳がん感受性を上昇させたと考えられた(Durandoら 2007)。

雌Wistarラットに出生後1日から7日まで48時間おきに20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bwのDESまたは50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bwあるいは20mg/kg bw(EPAの認められたLOWELの2.5分の1量、NTPによる時期・投与経路に関わらないLow dose cutoff値の4倍量)のビスフェノールAを皮下投与した。50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bwビスフェノールA投与群で出生8日および21日後に視床下部視策前野(黄体形成ホルモン放出ホルモンの周期的制御に関わる前腹側視床脳室周囲核がある)のER $\alpha$  mRNAの発現が上昇したが、20mg/kg bw投与群では出生8日目に低下、出生21日後には上昇した。出生8日目と出生21日目にER $\alpha$ の異なる5つのpromoter毎に特徴的なER $\alpha$  mRNAの発現パターンを示した。ER $\alpha$ たんぱくについては20mg/kg bw投与群では出生8日と出生21日ともに低下し、50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bwビスフェノールA投与群では上昇した。異なるpromoterはdifferential methylationにより部位と発生段階別のER $\alpha$ の発現制御に関係していると考えられるが、O regionではmethylationは見られずOT regionの処理に関わらないCpG island methylationが見られた(Monjeら 2007)。

妊娠8日のCD-1マウスに浸透圧ポンプを