

埋め込み18日（胎児摘出）までビスフェノールAを250 µg/kg bw/日（妊娠8日目体重換算）となるように暴露した。胎児の乳腺の管部の伸張と大きさは曝露により有意に増加した。基質ではfat padの成熟を促進しコラーゲンの局在を換えた。上皮細胞の縮小とルーメン形成の遅れを生じた。胎児期曝露が成熟後に乳腺の表現型が変化することに関与すると考えられる（Vandenbergら 2007）。

妊娠8日のCD-1あるいはC57BL/6マウスに浸透圧ポンプを埋め込み出生2日までビスフェノールAを250 µg/kg bw/日（妊娠8日目体重換算）となるように暴露した。出生25日に子宮を摘出し種々濃度のE2に浸透圧ポンプを用いて10日間曝露しビスフェノールAによる乳腺発達への影響の系統差の有無を見たところterminal end budの数や大きさにCD-1にやや影響が強く出たが両系統においてほぼ同程度であり、この試験では系統による感受性の差は説明できなかった（Wadiaら 2007）。

in vitroの飽和結合試験および放射性4-hydroxy tamoxifen (4-OHT)をトレーサーに用いた競合試験からビスフェノールAはEstrogen-related receptor (ERR)γ タンパクと極めて強く相互作用(IC50=13 nM)することがわかった。Reporter gene assayから4-OHTに強力なantagonist活性を示した。ERRγは哺乳類の発生段階の脳、成熟段階の脳、肺ほかの組織に強く発現している（Takayanagiら 2007）。

(5) 関澤はビスフェノールAについて2004年以降に出版された試験報告を詳細に検討し、筆者が低用量影響を報告していた報告を抽出し影響の種別にまとめ、

さらに用量の低い順に結果を整理した。この際に従来指摘されてきた生殖・発生毒性に限らず、免疫影響、神経行動影響試験の報告も検討した。

(6) 関澤が検討し影響濃度の低い順に整理した試験報告17報のうちCERHRが生殖・発生毒性評価の観点から適切と判断した試験報告は6報あった(表3)。ビスフェノールAの核内受容体作動性の高次系影響については、新たなメカニズムの可能性が指摘されており、より詳細な検討をさらに進める必要があると考えられる。(7) OECDは毒性試験の標準化に一環として発生神経毒性試験法を公表した(OECD, 2007)。

参考文献

- CERHR (2007) Interim draft report on the reproductive and developmental toxicity of Bisphenol A, Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction,
- Dolinoy DC, Huang D, Jirtle RL. (2007) Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. Proc Natl Acad Sci U S A. 104(32) 13056-61
- Durando M, Kass L, Piva J, Sonnenschein C, Soto AM, Luque EH, Muñoz-de-Toro M. (2007) Prenatal bisphenol A exposure induces preneoplastic lesions in the mammary gland in Wistar rats. Environ Health Perspect. 115(1):80-6.
- Gioiosa L, Fissore E, Ghirardelli G, Parmigiani S, Palanza P. (2007) Developmental exposure to low-dose estrogenic endocrine disruptors alters sex differences in exploration and

- emotional responses in mice. *Horm Behav.* 52(3):307-16.
- Kawai K, Murakami S, Senba E, Yamanaka T, Fujiwara Y, Arimura C, Nozaki T, Takii M, Kubo C. (2007) Changes in estrogen receptors alpha and beta expression in the brain of mice exposed prenatally to bisphenol A. *Regul Toxicol Pharmacol.* 47(2):166-70.
- Miyagawa K, Narita M, Narita M, Niikura K, Akama H, Tsurukawa Y, Suzuki T. (2007) Memory impairment associated with a dysfunction of the hippocampal cholinergic system induced by prenatal and neonatal exposures to bisphenol-A. *Neurosci. Lett.* 418(3): 236-41
- Monje L, Varayoud J, Luque EH, Ramos JG. (2007) Neonatal exposure to bisphenol A modifies the abundance of estrogen receptor alpha transcripts with alternative 5'-untranslated regions in the female rat preoptic area. *J Endocrinol.* 200 Jul;194(1):201-12
- Murray TJ, Maffini MV, Ucci AA, Sonnenschein C, Soto AM. (2007) Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure. *Reprod Toxicol.* 23(3):383-90.
- Nakamura K, Itoh K, Sugimoto T, Fushiki S. (2007) Prenatal exposure to bisphenol A affects adult murine neocortical structure. *Neurosci Lett.* 420(2):100-5.
- National Toxicology Program - US Department of Health and Human Services, April 2007 http://cerhr.niehs.nih.gov/chemicals/bisphenol/BPA_Interim_DraftRpt.pdf
- NTP (2001) National Toxicology Program's Report of *the* Endocrine Disruptors Low- Dose Peer Review, US Environmental Protection Agency/NIH National Toxicology Program., August 2001, <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/liason/LowDosePeerFinalRpt.pdf>
- OECD (2007) OECD Guideline for the Testing of Chemicals : Developmental Neurotoxicity Study OECD Guideline Testing Guideline 426, 16 October 2007
- Susiarjo M, Hassold TJ, Freeman E, Hunt PA. (2007) Bisphenol A exposure in utero disrupts early oogenesis in the mouse. *PLoS Genet.* 3(1):63-70
- Takayanagi S, Tokunaga T, Liu X, Okada H, Matsushima A, Shimohigashi Y. (2006) Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor gamma (ERRgamma) with high constitutive activity. *Toxicol Lett.* 167(2):95-105.
- Tando S, Itoh K, Yaoi T, Ikeda J, Fujiwara Y, Fushiki S. (2007) Effects of pre- and neonatal exposure to bisphenol A on murine brain development. *Brain Dev.* 29(6):352-6.
- Vandenberg LN, Maffini MV, Wadia PR, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM. (2007) Exposure to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol-A alters development of the fetal mouse mammary gland. *Endocrinology.* 148(1):116-27.
- Wadia PR, Vandenberg LN, Schaeberle CM, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM. (2007) Perinatal bisphenol A exposure increases estrogen sensitivity of the mammary gland in diverse mouse strains. *Environ Health Perspect.* 115(4):592-8.

D. 考察

(1) CERHRがビスフェノールAに関し、適切と判断した42報の報告は必ずしもすべて低用量に関する報告ではなく、たとえば多世代試験として適切になされ報告されたというものもあった。

(2) 表3の17報の中でCERHRが適切とは判断した文献に入らなかった報告は最近のものが多く、これらについては影響の性質と試験法の標準化という観点からもさらに検討を進める必要がある。

(3) 表2に見るようにCERHRのレビュー以後もビスフェノールAの低用量影響に関する報告は引き続きあり、その多くが神経系に関するものであり、さらに特徴的にはCpGにおけるメチル化など発生期間中の曝露によるepigeneticな影響の可能性を示すと考えられる報告もあった。

E. 結論

(1) 米国 National Toxicology Program (NTP)のCERHRは2007年に生殖・発生毒性の検討を行ったところ、CERHR専門家グループがビスフェノールAの生殖・発生毒性評価にとり適切と判断した試験報告は42報であった。

(2) 2003年以降公表の文献のうち、関澤が影響の見られた濃度の低い順に17報について検討結果とCERHRの判断基準により選別された結果を相互参照し現時点でビスフェノールAの低用量影響の蓋然性について検討したうちCERHRが適切と判断した試験報告は6報であった。

(3) 17報の中でCERHRが適切とは判断した文献に入らなかった報告は最近多く報告のある神経行動影響に関するものだった。

た。子供は成人に比べてUDPGTの発現が5分の1程度であり親化合物により多く暴露する可能性があり、これらの点については影響の性質と試験法の標準化という観点からもさらに検討を進める必要があると考える。OECDはこのために発生神経毒性試験指針を公表しており、今後の研究成果の検討に参考となる。

(4) 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であり神経系への影響に関するものであった。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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Vermeire T, Munns WR Jr, **Sekizawa J**, ほか2名, An assessment of Integrated Risk Assessment::, *Hum. Ecol. Risk Assess*, (査読有)13, 339-354 (2007)
- 2 **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* (査読有)17(1), 79-84 (2007)
- 3 **Sekizawa J**, Ohtawa H, Yamamoto H, ほか5名 Evaluation of Human Health Risks From Exposures to Four Air Pollutants in the Indoor and the Outdoor Environments in Tokushima, and Communication of the Outcomes to the Local People: *J. Risk Res.*, (査読有)10(5/6) 841-851(2007)

- 4 Nakamura Y, Yamamoto H, **Sekizawa J**, Kondo T, Hirai N, Tatarazako N: The Effects of pH on Fluoxetine in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*): Acute Toxicity in Fish Larvae and Bioaccumulation in Juvenile Fish, *Chemosphere* 70, 865-873 (2007)
- 5 **Sekizawa J**, Kojima Y, Mihara K, Yamamoto H, Ohta N, Harada A, Takeda E, Miyairi S, Nakamura Y, Imamura Y, Ikeuchi T, Yamada N: Urine Concentrations of Indirubin in Rats and Humans and Its Possible Interaction with Other Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands *Organohalogen Compounds* Vol 69 (2007) O-088 369- 372
- 6 田村生弥, 太田美菜子, **関澤 純**, 山本裕史 (2007): 下水道未普及地域における河川生物膜による直鎖アルキルベンゼンスルホン酸浄化作用の評価、*環境工学研究論文集* 44, 127-134
- 7 Yamamoto H, Nakamura Y, Nakamura Y, Kitani C, Imari T **Sekizawa J**, Takao Y, Yama-shitaN, Hirai N, Oda S, Tatarazako N (2007) : Initial Ecological Risk Assessment of Eight Select-ed Pharmaceuticals in Japan, *Env. Sci.*, 14(4) 177-193
- 8 山本 裕史, 中村 友紀, 木谷 智世, 中村 雄大, **関澤 純**, 鏑迫 典久 (2007) : 非ステロイド系医薬品の生態リスク初期評価, *環境衛生工学研究*, Vol.21, No.3, 71-78
2. 学会発表
- 1 **Sekizawa J**, Yamamoto H, Takeda E, Miyairi S,ほか 8名 Urine concentrations of indirubin in rats and human and its possible interaction with other arylhydrocarbon receptor ligands: *Organohalogen Compounds* 69, 369-372 (2007)
- 2 **関澤純**, 土田昭司, 上野伸子, 大坪寛子, 辻川典文, 小池芙美代:食品安全のリスクコミュニケーションとステーキホルダーの役割, 日本リスク研究学会第20回研究発表会論文集, vol.20, 317-322
- 3 藤川弘安, **関澤純**, 内山巖雄, 山本裕史, 中野武, 津田芳見, 岡田泰史:室内外空気汚染による子どもと高齢者の健康リスクに関する予備的検討, 日本リスク研究学会第20回研究発表会論文集, vol.20, 85-90 (2007)
- 4 香月翔太, 山本裕史, 渡辺美佳子, 中村雄大, **関澤 純**, 水環境中におけるパラベン類の挙動・分配, 第10回内分泌かく乱化学物質学会研究発表会 (2007年12月, 大宮)
- 5 平田佳子, 渡辺美佳子, 中村雄大, 山本裕史, **関澤 純**, 鏡 良弘, 鏑迫典久 防腐剤パラベン類による生態系への影響, 第10回内分泌かく乱化学物質学会研究発表会 (2007年12月, 大宮)
- 6 辻川典文, 小池芙美代, **関澤 純**, 土田昭司: 食品購買時の安全性検討行動に影響を与える要因の検討, 第20回日本リスク研究学会研究発表会講演論文集, (2007) 403-406
- 7 岡田泰史, 中野 武, 藤川弘安, **関澤純**: 工業地帯周辺における大気中揮発性有機化合物の濃度分布と健康リスク評価, 第20回日本リスク研究学会研究発表会講演論文集 (2007) 93-94
- 8 渡辺 美佳子, 山本 裕史, 中村 雄大, 中村 友紀, **関澤 純**, 木谷 智世, 山下 尚之, 小塩 正朗, 平井 慈恵, 鏑迫 典久: ブチルパラベンとベンジルパラベンの生

- | | |
|---|---|
| <p>態・環境リスク初期評価, 第41回水環境学会年次講演会(2007年3月, 大阪)</p> <p>9 中村 友紀、山本 裕史、中村 雄大、渡辺美佳子、<u>関澤 純</u>、森口 茂美、木谷 智世、山下尚之、<u>鑑迫 典久</u>: 医薬品類8種の水環境中動態を考慮した生態・環境リスク初期評価, 第41回水環境学会年次講演会(2007年3月, 大阪),</p> <p>10 中村 雄大、中村 友紀、森口 茂美、山本 裕史、<u>関澤 純</u>: 医薬品類8種の水環境中動態と環境負荷の評価, 第41回水環境学会年次講演会(2007年3月, 大阪).</p> <p>11 木谷 智世、今利 哲也、山本 裕史、中村 雄大、渡辺 美佳子、<u>関澤 純</u>、中村 友紀、中村雄大、<u>鑑迫 典久</u>: 水棲生物3種の慢性影響を考慮した医薬品類8種の生態リスク初期評価, 第41回水環境学会年次講演会(2007年3月, 大阪).</p> <p>12 森口 茂美、中村 雄大、林 昭秀、山本 裕史、<u>関澤 純</u>: 医薬品類の水環境中挙動・分配に対する物理化学的性質の影響, 第41回水環境学会年次講演会(2007年3月, 大阪),</p> <p>13 田村 生弥、太田 美菜子、山本 裕史、<u>関澤 純</u>、葛西 博文、山田 登志夫: 生態系支援コンクリートに付着する河川生物膜による直鎖アルキルベンゼンスルホン酸浄化能の評価、第41回水環境学会年次講演会(2007年3月, 大阪)</p> <p>14 太田 美菜子、田村 生弥、山本 裕史、<u>関澤 純</u>: 徳島市近郊6河川における生物膜による自浄作用の実験的比較・検討, 第41回水環境学会年次講演会(2007年3月, 大阪)</p> | <p>1. 特許取得 なし</p> <p>2. 実用新案登録 なし</p> <p>3.その他 なし</p> |
|---|---|

H. 知的財産権の出願・登録状況

表1 CERHR専門家グループがビスフェノールAの生殖・発生毒性を検討する上で試験計画と実施条件、統計処理が適切と評価した報告(CERHR, April, 2007)

Akingbemi, B. T., Sottas, C. M., Koulova, A. I., Klinefelter, G. R. and Hardy, M. P. Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. *Endocrinology* 2004; 145: 592-603.

Ashby, J., Tinwell, H. and Haseman, J. Lack of effects for low dose levels of bisphenol A and diethylstilbestrol on the prostate gland of CF1 mice exposed in utero. *Regul Toxicol Pharmacol* 1999; 30: 156-66.

Atanassova, N., McKinnell, C., Turner, K. J., Walker, M., Fisher, J. S., Morley, M., Millar, M. R., Groome, N. P. and Sharpe, R. M. Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogens on spermatogenesis at puberty and the relationship to adult testis size and fertility: evidence for stimulatory effects of low estrogen levels. *Endocrinology* 2000; 141: 3898-907.

Cagen, S. Z., Waechter, J. M., Jr., Dimond, S. S., Breslin, W. J., Butala, J. H., Jekat, F. W., Joiner, R. L., Shiotsuka, R. N., Veenstra, G. E. and Harris, L. R. Normal reproductive organ development in Wistar rats exposed to bisphenol A in the drinking water. *Regul Toxicol Pharmacol* 1999; 30: 130-9

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

Ema, M., Fujii, S., Furukawa, M., Kiguchi, M., Ikka, T. and Harazono, A. Rat twogeneration reproductive toxicity study of bisphenol A. *Reprod Toxicol* 2001; 15: 505-23.

Evans, N. P., North, T., Dye, S. and Sweeney, T. Differential effects of the endocrinedisrupting compounds bisphenol-A and octylphenol on gonadotropin secretion, in prepubertal ewe lambs. *Domest Anim Endocrinol* 2004; 26: 61-73.

Fisher, J. S., Turner, K. J., Brown, D. and Sharpe, R. M. Effect of neonatal exposure to estrogenic compounds on development of the excurrent ducts of the rat testis through puberty to adulthood. *Environ Health Perspect* 1999; 107: 397-405.

Funabashi, T., Kawaguchi, M., Furuta, M., Fukushima, A. and Kimura, F. Exposure to bisphenol A during gestation and lactation causes loss of sex difference in corticotropinreleasing hormone-immunoreactive neurons in the bed nucleus of the stria terminalis of rats. *Psychoneuroendocrinology* 2004; 29: 475-85

Fukumori, N., Tayama, K., Ando, H., Kubo, Y., Yano, N., Takahashi, H., Nagasawa, A., Yuzawa, K., Sakamoto, Y. and Ogata, A. Low dose effects of bisphenol A on the ultrastructure of prostate in suckling male rats. *Ann Rep Tokyo Metr Inst PH* 2003; 54: 347-352

Gupta, C. Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000; 224: 61-8.

Ho, S. M., Tang, W. Y., Belmonte de Frausto, J. and Prins, G. S. Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Res* 2006; 66: 5624-32.

Honma, S., Suzuki, A., Buchanan, D. L., Katsu, Y., Watanabe, H. and Iguchi, T. Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. *Reprod Toxicol* 2002; 16: 117-22

Howdeshell, K. L., Hotchkiss, A. K., Thayer, K. A., Vandenberg, J. G. and vom Saal, F. S. Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature* 1999; 401: 763-4.

Kato, H., Ota, T., Furuhashi, T., Ohta, Y. and Iguchi, T. Changes in reproductive organs of female rats treated with bisphenol A during the neonatal period. *Reprod Toxicol* 2003; 17: 283-8.

Kim, J. C., Shin, H. C., Cha, S. W., Koh, W. S., Chung, M. K. and Han, S. S. Evaluation of developmental toxicity in rats exposed to the environmental estrogen bisphenol A during pregnancy. *Life Sci* 2001; 69: 2611-25

Kwon, S., Stedman, D. B., Elswick, B. A., Cattley, R. C. and Welsch, F. Pubertal development and reproductive functions of Crl:CD BR Sprague-Dawley rats exposed to bisphenol A during prenatal and postnatal development. *Toxicol Sci* 2000; 55: 399-406.

Laviola, G., Gioiosa, L., Adriani, W. and Palanza, P. D-amphetamine-related reinforcing effects are reduced in mice exposed prenatally to estrogenic endocrine disruptors. *Brain Res Bull* 2005; 65: 235-40.

Morrison, A. G., Callanan, J. J., Evans, N. P., Aldridge, T. C. and Sweeney, T. Effects of endocrine disrupting compounds on the pathology and oestrogen receptor alpha and beta distribution in the uterus and cervix of ewe lambs. *Domest Anim Endocrinol* 2003; 25: 329-43

Morrissey, R. E., George, J. D., Price, C. J., Tyl, R. W., Marr, M. C. and Kimmel, C. A. The Developmental Toxicity of Bisphenol A in Rats and Mice. *Fundamental and Applied Toxicology* 1987; 8: 571-582

Nagel, S. C., vom Saal, F. S., Thayer, K. A., Dhar, M. G., Boehler, M. and Welshons, W. V. Relative Binding Affinity-Serum Modified Access (RBA-SMA) Assay Predicts the Relative In Vivo Bioactivity of the Xenoestrogens Bisphenol A and Octylphenol. *Environmental Health Perspectives* 1997; 105: 70-76.

Nagao, T., Saito, Y., Usumi, K., Kuwagata, M. and Imai, K. Reproductive function in rats exposed neonatally to bisphenol A and estradiol benzoate. *Reprod Toxicol* 1999; 13:

303-11.

Nagao, T., Saito, Y., Usumi, K., Yoshimura, S. and Ono, H. Low-dose bisphenol A does not affect reproductive organs in estrogen-sensitive C57BL/6N mice exposed at the sexually mature, juvenile, or embryonic stage. *Reprod Toxicol* 2002; 16: 123-30.

Negishi, T., Kawasaki, K., Suzaki, S., Maeda, H., Ishii, Y., Kyuwa, S., Kuroda, Y. and Yoshikawa, Y. Behavioral alterations in response to fear-provoking stimuli and tranylcypromine induced by perinatal exposure to bisphenol A and nonylphenol in male rats. *Environ Health Perspect* 2004; 112: 1159-64.

Nishizawa, H., Manabe, N., Morita, M., Sugimoto, M., Imanishi, S. and Miyamoto, H. Effects of in utero exposure to bisphenol A on expression of RARalpha and RXRalpha mRNAs in murine embryos. *J Reprod Dev* 2003; 49: 539-45.

Nishizawa, H., Morita, M., Sugimoto, M., Imanishi, S. and Manabe, N. Effects of in utero exposure to bisphenol A on mRNA expression of arylhydrocarbon and retinoid receptors in murine embryos. *J Reprod Dev* 2005; 51: 315-24.

Nishizawa, H., Imanishi, S. and 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; 51: 593-605.

Palanza, P. L., Howdeshell, K. L., Parmigiani, S. and vom Saal, F. S. Exposure to a low dose of bisphenol A during fetal life or in adulthood alters maternal behavior in mice. *Environ Health Perspect* 2002; 110: 415-22

Ramos, J. G., Varayoud, J., Kass, L., Rodriguez, H., Costabel, L., Munoz-De-Toro, M. and Luque, E. H. Bisphenol A induces both transient and permanent histofunctional alterations of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in prenatally exposed male rats. *Endocrinology* 2003; 144: 3206-15

Rivas, A., Fisher, J. S., McKinnell, C., Atanassova, N. and Sharpe, R. M. Induction of reproductive tract developmental abnormalities in the male rat by lowering androgen production or action in combination with a low dose of diethylstilbestrol: evidence for importance of the androgen-estrogen balance. *Endocrinology* 2002; 143: 4797-808

Ryan, B. C. and Vandenberg, J. G. Developmental exposure to environmental estrogens alters anxiety and spatial memory in female mice. *Horm Behav* 2006; 50: 85-93

Stoker, T. E., Robinette, C. L., Britt, B. H., Laws, S. C. and Cooper, R. L. Prepubertal exposure to compounds that increase prolactin secretion in the male rat: effects on the adult prostate. *Biol Reprod* 1999; 61: 1636-43.

Suzuki, A., Sugihara, A., Uchida, K., Sato, T., Ohta, Y., Katsu, Y., Watanabe, H. and Iguchi, T. Developmental effects of perinatal exposure to bisphenol-A and diethylstilbestrol on reproductive organs in female mice. *Reprod Toxicol* 2002; 16: 107-16.

Takao, T., Nanamiya, W., Nazarloo, H. P., Matsumoto, R., Asaba, K. and Hashimoto, K. Exposure to the environmental estrogen bisphenol A differentially modulated estrogen receptor-alpha and -beta immunoreactivity and mRNA in male mouse testis. *Life Sci* 2003; 72: 1159-69.

Tan, B. L., Kassim, N. M. and Mohd, M. A. Assessment of pubertal development in juvenile male rats after sub-acute exposure to bisphenol A and nonylphenol. *Toxicol Lett* 2003; 143: 261-70

Timms, B. G., Howdeshell, K. L., Barton, L., Bradley, S., Richter, C. A. and vom Saal, F. S. Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 7014-9

Tinwell, H., Haseman, J., Lefevre, P. A., Wallis, N. and Ashby, J. Normal sexual development of two strains of rat exposed in utero to low doses of bisphenol A. *Toxicol Sci* 2002; 68: 339-48.

..
Tyl, R. W., Myers, C. B., Marr, M. C., Thomas, B. F., Keimowitz, A. R., Brine, D. R., Veselica, M. M., Fail, P. A., Chang, T. Y., Seely, J. C., Joiner, R. L., Butala, J. H., Dimond, S. S., Cagen, S. Z., Shiotsuka, R. N., Stropp, G. D. and Waechter, J. M. Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci* 2002; 68: 121-46.

Tyl, R. W., Myers, C. B. and Marr, M. C. Two-Generation Reproductive Toxicity Evaluation of Bisphenol A (BPA; CAS No. 80-05-7) Administered in the Feed to CD-1® Swiss Mice (Modified OECD 416) - AUDITED DRAFT REVISED FINAL REPORT. Sponsored by American Plastics Council; 2006

Vom Saal, F. S., Cooke, P. S., Buchanan, D. L., Palanza, P., Thayer, K. A., Nagel, S. C., Parmigiani, S. and Welshons, W. V. A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol Ind Health* 1998; 14: 239-60

Williams, K., Fisher, J. S., Turner, K. J., McKinnell, C., Saunders, P. T. and Sharpe, R. M. Relationship between expression of sex steroid receptors and structure of the seminal vesicles after neonatal treatment of rats with potent or weak estrogens. *Environ Health Perspect* 2001; 109: 1227-35.

Yoshikawa, Y. Behavioral alterations in response to fear-provoking stimuli and tranlycypromine induced by perinatal exposure to bisphenol A and nonylphenol in male rats. *Environ Health Perspect* 2004; 112: 1159-64.

表2 2007年の報告の要約(投与経路別、影響濃度順):本文参照

| 対象 | 投与経路と期間 | 影響 | 影響観察濃度 | 注 | 引用 |
|-------------|----------------------------|---|------------------------------------|---|----------------|
| マウスICR | 妊娠11日から17日まで | 雄新生児脳の背側縫線核におけるER α とER β の免疫抗体反応は5週と13週で上昇したが9週で差は消失 | 2 μ g/kg bw/日 | セロニン、セロ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上昇するも有意差はなし | Kawaiら 2007 |
| マウスC57BL/6J | 交配前から離乳期まで | 雄児(7-11週令)step-through passive avoidance testで記憶障害、acetylcholine生成マーカーcholine acetyltransferase様免疫活性性の大きな減少 | 2 μ g/kgbw/日 | 海馬acetylcholine生成減少による記憶障害の可能性。不安誘発行動、運動学習障害、elevated plus maze test, rota-rod testでは曝露による有意な違いなし | Miyagawaら 2007 |
| マウスCD-1 | 妊娠11日から分娩8日まで | 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において行動における性差に変化が見られた | 10 μ g/kgbw/日 | Mthoxychlor(20 μ g/kgbw/日)でも一部の試験で変化あり | Gioiosaら 2007 |
| マウスddy | 妊娠から離乳まで | 出生後8-11週目の雌仔の脳基底核の黒質(substantia nigra)のDOPAを生成するtyrosine hydroxylase免疫抗体陽性神経細胞が減少、雄では変化せず | 450 μ g/kg bw/日 | Calbindinやcalretinineなどのカルシウム結合タンパクに変化なし | Tandoら 2007 |
| マウスAwy | 交配2週前から離乳期まで | レトロウイルスポゾン型配列の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%)減少しViable yellow agouti(Avy)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 | 10 mg/kgbw/日 | 発生初期のBPA暴露がepigenomeに変化を与え子の表現型に影響。影響は食餌に0.7 mg/kgbwのFollic acid (+vit B12, betaine, choline chloride)またはGenistein(40 mg/kgbw)添加で抑制可能 | Dolinoyら 2007 |
| ラットWistar | 皮下投与 埋込ポンプ使用:受胎9日から出生まで | 全ての投与群で出生後50日、95日目に乳腺の管に過形成増加、非浸潤性癌(Carcinoma in situ:CIS)あり | 2.5, 25, 250, 1000 μ g/kg bw/日 | 細胞増殖の指標Ki67やER α 陽性細胞数がCISで増加、細胞増殖性の前がん病変を誘起 | Murrayら 2007 |

| | | | | | |
|---------------------|--|---|---------------------------------------|---|----------------------|
| マウス JCR/Jcl | 受胎0.5日から 12.5, 14.5, 16.5日 のBrdU投与まで | 出生3週後に14.5日BrdU投与群大脳皮質 V, VI層のBrdU陽性細胞の頻度と割合が 増加、IV3層でBrdU陽性細胞が対照に比 べ減少 | 20 μ g/kg bw/ 日 | 視床皮質投射(thalamocortical projection)で投与群の異常が観察さ れた | Nakamuraら 2007 |
| マウス C57BL/6 | ペレット埋設:妊 娠11.5日から 18.5日まで | 妊娠18.5日に雌胎児から減数分裂前期卵 母細胞を摘出、BPA処理で対合の障害や 組換えの増加あり分婍雌胎児の成熟時に 異数性の卵や胚を生じた | 20 μ g/kg bw/ 日 | 減数分裂組換えに必要なミスマッチ 修復たんぱくMLH1のfociは交叉サ イトの標識だがfoci数は無処理 β ERKOの減数分裂前期細胞はBPA 処理野生型マウスと同じ障害を示し 処理によりさらに悪化しなかった | Susiarjoら 2007 |
| ラットWistar | 埋込ポンプ使 用:妊娠8日=器 官形成開始期か ら離乳期まで | 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、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)が見られた | 25 μ g/kg/日 | 出生前暴露は乳がん感受性を上昇 | Durandoら 2007 |
| ラット雌 Wistar | 出生後1日から7 日まで48時間お き | 出生8日、21日後に視床下部視索前野(黄 体形成ホルモン放出ホルモン周期的制御 する前腹側視床脳室周囲核あり)のER α mRNAの発現とER α たんぱく上昇 | 50 μ g/kg bw/2 日 | ER α の異なる5つのpromoterの CpG island differential methylation は部位と発段階別のER α 発現制 御に関係すると考えられpromoter毎 に特徴的なER α mRNAの発現パ ターンを示した | Monjeら 2007 |
| マウスCD-1 | 埋込ポンプ使 用:妊娠8日から 18日(胎児摘出) まで | 胎児の乳腺の管部の伸張と大きさは曝露 により有意に増加、基質ではfat padの成 熟を促進しコラーゲンの局在を換え、上皮 細胞の縮小とルーメン形成の遅れを生じ た | 250 μ g/kg bw/ 日(妊娠8日目 重換算) | 胎児期曝露が成熟後に乳腺の表現 型が変化することに関与すると思わ れる | Vandenberglら 2007 |
| マウスCD-1, C57BL/6 | 埋込ポンプ使 用:妊娠8日から 出生2日まで | 出生25日に子宮摘出し種々濃度のE2に10 日間曝露しBPAIによる乳腺発達への影響で はterminal end budの数や大きさにCD-1に や影響が強くなった | 250 μ g/kg bw/日(妊娠8日 目体重換算) | この試験では系統による感受性の 差は説明できなかった | Wadiaら 2007 |
| in vitro | | | | | |

| | | | | |
|----------|--|----------------------|-------------------------------------|------------------|
| in vitro | 飽和結合試験、放射性4-hydroxy tamoxifen (4-OHT)による競合試験でBPAはEstrogen-related receptor (ERR) γタンパクと極めて強く相互作用、Reporter gene assayで4-OHTに強力なantagonist活性を示した | 4-OHT競合試験のIC50=13 nM | ERR γは哺乳類の発生段階の脳、成熟段階の脳、肺ほかの組織に強く発現 | Takayanagiら 2007 |
|----------|--|----------------------|-------------------------------------|------------------|

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

分担研究者 杉村 芳樹 三重大学大学院医学系研究科・腎泌尿器外科学・教授

研究要旨

低用量ビスフェノール A (BPA) の暴露による成獣マウス前立腺基底上皮の異常増殖機構解明に向けて、前立腺の発生母体となる泌尿生殖洞に着目し、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。BPA および DES 経胎盤投与ともに仔雄マウス泌尿生殖洞の ER α 発現量を上昇させたが、SF1 の発現誘導は BPA に特徴的であった。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 α 陽性の間質細胞が出現した。低用量 BPA の暴露により間質細胞の性ホルモン受容体発現が変化し、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が示唆された。

A. 研究目的

低用量ビスフェノール A (BPA) の暴露による成獣マウス前立腺基底上皮の異常増殖機構解明に向けて、前立腺の発生母体となる泌尿生殖洞に着目した。すなわち、性ホルモンに依存する前立腺では腺管の発生から増殖、細胞分化に至るまで上皮や間質細胞に存在する性ホルモン受容体を介した上皮-間質の相互作用に制御されている。我々は、低用量 BPA の暴露による成獣マウス前立腺基底上皮の異常増殖が、投与直後に起こる体内ホルモ

ンバランスの不均衡と、それに関わる遺伝子レベルでの変化に起因していると考え、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に着目した。

B. 研究方法

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。すなわち、妊娠 13-16 日目の間、雌 C57BL/6 マウ

スに対して、トコフェロール除去済みのコーンオイルに溶解した BPA (20 mg/kg/day) もしくは DES (0.2 mg/kg/day) を強制胃内投与し、出生前後 (E17 および P1) の泌尿生殖洞を回収、形態組織学的な変化を評価した。遺伝子発現変動解析については RT-PCR、リアルタイム PCR を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究では、やむを得ず実験動物を使用した、その使用数は最小限にとどめ、当大学の実験動物取り扱い倫理規定に準拠し、十分な配慮を行った。

C. 研究結果

BPA および DES 経胎盤投与ともに仔雄マウス泌尿生殖洞の ER α 発現量を上昇させたが、SF1 の発現誘導は BPA に特徴的であった。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 α 陽性の間質細胞が出現した。すなわち、

出生後 (P1) の仔雄マウス泌尿生殖洞において、BPA および DES 投与群ともにアンドロゲン受容体 (AR) の発現減少と、エストロゲン受容体 α (ER α) の発現上昇を認めた。しかし、steroidogenic factor 1 (SF1) の発現上昇は BPA に特徴的であった。

一方、仔雌マウス泌尿生殖洞では、BPA および DES 投与群ともに AR の発現を誘導

したものの、ER α 発現には変化を認めなかった。雄の場合と同様に、SF1 の発現上昇は BPA に特徴的であった。

次に、仔雄マウス泌尿生殖洞を形態組織学的に解析した結果、BPA および DES 投与群では基底上皮の増殖が上昇していた (Ki67 index)。上皮における性ホルモン受容体の発現誘導は認められなかったものの、間質では AR 陽性細胞が減少し、ER α 陽性細胞が出現した。なお、雌については、BPA および DES 投与で間質に AR 陽性細胞の増加を認めた。

BPA 投与で mRNA の発現上昇を確認した SF1 は基底上皮に限局していたが、扁平上皮化のマーカー (CK10) 発現は認められなかった。

D. 考察

我々は、低用量 BPA の経胎盤投与が合成エストロゲン剤 DES と同様に、仔雄マウス成獣時前立腺の基底上皮に限局して扁平上皮化を誘導することを報告した (Ogura et al., 2007)。次に、BPA や DES の作用は遺伝子レベルでの変化を介していると考え、前立腺の発生母体となる泌尿生殖洞について網羅的遺伝子発現変動解析を行ったところ、BPA 投与群に特徴的な遺伝子変化として、性分化に関与する SF1 と、そのターゲット遺伝子 AMH や Cyp11a1 の発現上昇を見出した (平成 18 年度に報告)。以上を踏まえて、本年度は 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について、DES 投与群を対象として比較検討した。

出生後 (P1) の仔雄マウス泌尿生殖洞では、BPA および DES 投与群ともに AR mRNA の発現減少と、ER α mRNA の発現上昇を認めたことから、BPA は DES と同様にエストロゲン様作用を有することが示された。しかし、ER α が豊富で、AR が極めて少ない仔雌マウス泌尿生殖洞については両化学物質ともに AR の発現誘導を来したことから、雄と雌ではエストロゲン様化学物質に対する反応性が一致しないことが示された。AR や ER α mRNA の発現量が雌雄の形態学的変化 (雄のメス化、雌のオス化) に直結するとは考えにくいものの、BPA や DES 投与により体内のホルモンバランスに不均衡が生じると、細胞レベルでは大きな問題になると推察される。

仔雄マウス泌尿生殖洞について、性ホルモン受容体 mRNA の発現変動と、その局在・発現変化から考えると、BPA や DES は間質細胞の性ホルモン受容体を介してエストロゲン様作用を発揮する。その結果、BPA および DES 投与群では発生初期の腺周囲に筋線維芽細胞が優位な状態になっていると考えられた。筋線維芽細胞は、線維芽細胞を TGF β 等のサイトカインで刺激すると得られる細胞種であり、癌間質や肥大症結節における間質との極似が示唆されている。これら筋線維芽細胞は線維芽細胞よりも多量の細胞増殖因子を産生するため、BPA および DES 投与群におけ

る筋線維芽細胞数の増加が基底上皮の過増殖に関連していると考えられた。

次に、SF1 の発現誘導については、AR 優位な雄、ER α 優位な雌ともに BPA 投与により SF1 の発現が上昇したこと、さらに SF1 の発現上昇が性ホルモン受容体の発現変動と一致しなかったことから、性ホルモン受容体を介した遺伝子変化ではないと考えられた。昨年度に実施した GeneChip 解析の結果においても、BPA 投与により変化する仔雄マウス泌尿生殖洞内の遺伝子すべてが DES 投与の結果と一致することはなく、SF1 の発現上昇のように、むしろ BPA に特徴的な発現変化が多く認められている。現在、SF1 の発現誘導に関わる受容体として steroid and xenobiotic receptor (SXR) を候補として、BPA 投与による発現変動を解析中である。

E. 結論

我々は、マウス胎児期に低用量 BPA の暴露を受けると、泌尿生殖洞間質細胞における性ホルモン受容体発現が変化し、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考えられた。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kanda H, Ishii K, Ogura Y, Imamura T, Kanai M, Arima K, Sugimura Y. Naftopidil, a selective alpha-1 adrenoceptor antagonist, inhibits growth of human prostate cancer cells by G1 cell cycle arrest. *Int J Cancer*, in press

© Ogura Y, Ishii K, Kanda H, Kanai M, Arima K, Wang YZ, Sugimura Y. Bisphenol A induces permanent squamous change in mouse prostatic epithelium. *Differentiation*, 75: 745-756 (2007)

Uchida K, Kanai M, Yonemura S, Ishii K, Hirokawa Y, Sugimura Y. Proprotein convertases modulate budding and branching morphogenesis of rat ventral prostate. *Int J Dev Biol*. 51: 229-233 (2007)

Iguchi K, Ishii K, Nakano T, Otsuka T, Usui S, Sugimura Y, Hirano K. Isolation and characterization of LNCaP sublines differing in hormone sensitivity. *J Androl*. 28: 670-678 (2007)

2. 学会発表

石井 健一朗、今中 恭子、神田 英輝、小倉 友二、今村 哲也、金井 優博、有馬 公伸、吉田 利通、杉村 芳樹：テネイシンC

欠損マウス前立腺の病理組織学的解析：第16回泌尿器科分子・細胞研究会（福岡）2007年2月23-24日

神田 英輝、石井 健一朗、金井 優博、今村 哲也、有馬 公伸、杉村 芳樹：Naftopidil inhibits proliferation of human prostate cancer cells by G1 cell cycle arrest：第16回泌尿器科分子・細胞研究会（福岡）2007年2月23-24日

石井 健一朗、Karin Williams、井口 和弘、有馬 公伸、平野 和行、Simon W. Hayward、杉村 芳樹：前立腺の腺構造構築における前立腺特異抗原 PSA の役割：第95回日本泌尿器科学会総会（神戸）2007年4月14-17日

神田 英輝、石井 健一朗、小倉 友二、金井 優博、今村 哲也、金原 弘幸、有馬 公伸、杉村 芳樹：Naftopidil Inhibits Proliferation of Human Prostate Cancer Cells by G1 Cell Cycle Arrest：第95回日本泌尿器科学会総会（神戸）2007年4月14-17日

石井 健一朗、今村 哲也、井口 和弘、吉尾 裕子、荒瀬 栄樹、有馬 公伸、平野 和行、杉村 芳樹：間質細胞を標的としたアンドロゲン不応性前立腺癌細胞の増殖抑制：第8回ホルモンと癌研究会（東京）2007年7月27-28日

石井 健一朗、今中 恭子、小倉 友二、金井 優博、有馬 公伸、吉田 利通、杉村 芳樹：Tenascin-C regulates epithelial-stromal interactions in mouse prostate：第66回日本癌学会学術総会（横浜）2007年10月3-5日

今村 哲也、石井 健一朗、吉尾 裕子、荒瀬 栄樹、曾我 倫久人、木瀬 英明、有馬 公伸、杉村 芳樹：前立腺肥大症手術症例における組織病理学的検討-間質の線維化について：第57回日本泌尿器科学会中部総会（奈良）2007年11月7-9日

Kenichiro Ishii, Kyoko Imanaka-Yoshida, Hideki Kanda, Yuji Ogura, Masahiro Kanai, Kiminobu Arima, Toshimichi Yoshida, Yoshiki Sugimura：Binucleate Cells Appears in Tenascin-C Knockout Mouse Prostatic Epithelium：47th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology in Washington, DC, 2007年12月1-5日

◎ 荒瀬 栄樹、石井 健一朗、五十嵐 勝秀、相崎 健一、小倉 友二、今村 哲也、吉尾 裕子、有馬 公伸、菅野 純、杉村 芳樹：低用量ビスフェノール A 経胎盤投与によるマウス副生殖腺への影響：第10回環境ホルモン学会研究発表会（大宮）2007年12月10-11日

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他（データベース等）

なし

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

分担研究者 国立環境研究所 曾根秀子

研究要旨

ビスフェノールA(BPA)の正常ヒト乳腺上皮細胞(HMEC)における、細胞増殖・細胞老化への影響を調べた。BPAは、HMECの増殖を用量依存的に促進した。mRNA遺伝子発現レベルでの影響を調べると、細胞周期の停止やアポトーシスに関連した遺伝子への影響は認められず、増殖に関連した遺伝子の誘発が認められた。BPA曝露のHMECを5世代経た後に、3次元で培養した場合、溶媒対照に比べ有意に大きな細胞集塊を形成した。これらの結果は、BPAが増殖能への影響を示すこと、エピジェネティックな作用を有することを示唆した。

A. 研究目的

核内受容体に作用する化学物質のうち、エストロゲン受容体 α (ESR1)に結合し、エストロゲン作用を有することが知られているビスフェノールA(BPA)は、マウス及びラットにおいて周産期曝露で乳腺の発達に影響を及ぼすことが示されてきた。そのため、ヒトの乳がん発症や進展の環境因子の一つとして懸念される。そこで、その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、正常ヒト乳腺上皮細胞(HMEC)におけるBPAの細胞増殖・細胞老化への影響を調べた。

B. 研究方法

HMECの培養には、HMEC(6世代目)をLonza社の乳腺上皮細胞用増殖培地を用いて培養した。9世代目に0.5%ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解した 10^{-9} 、

10^{-8} 、 10^{-7} MのBPAと、陽性対象として 10^{-9} MのE2を曝露した。溶媒に用いたDMSOのみを曝露したものをコントロールとした。細胞は、11世代目と14世代目に、BrdUの取り込み量により細胞周期の分布の定量を行った。また、細胞老化のマーカーとして、ヘテロクロマチンプロテイン-1 γ (HP1 gamma)の抗体を用いた。同時に、ヒト乳がん組織において選択的に発現している遺伝子86個について、定量的リアルタイムPCRにより発現量を測定した。この13世代目細胞をマトリゲルコートした培養皿で培養して増殖能を調べた。

C. 研究結果

10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} MのBPAを8世代目に7日間曝露させ、継世代への影響を調べた。BPAは、用量依存的に細胞の増殖を

促進する影響が認められた。BrdUの取り込み細胞の分布をみるとS期の細胞が増加し、核の形態観察からアポトーシスを起こしている細胞の割合がBPA曝露群で減少していた。またHP1 gamma陽性細胞の割合も用量依存的な増加傾向にあった。同時に、11世代目のHMECについて、ヒト乳がん組織において選択的に発現している遺伝子86個について、定量的リアルタイムPCRにより発現量を測定したところ、BPAの曝露により2倍以上増加した遺伝子が、 10^{-9}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)、 10^{-8}M においては、Serpine peptidase inhibitor, clade A(SERPINA3)、Pregnancy-associated plasma protein A(PAPPA)、TNF superfamily, member 6(Fas ligand / FASLG)、Complement component 3(C3)、Cathepsin B(CTSB)、Cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1(CYP19A1/ARO/ARO1) 10^{-7}M においては、Small proline-rich protein 1B(SPRR1B CORNIFIN/GADD33)、Keratin 19(KRT19)であった。その他、細胞周期関連遺伝子、アポトーシス関連遺伝子の発現量にも変動が認められた。次に、13世代目細胞をマトリゲルコートした培養皿で培養して増殖能を調べたところ、溶媒対照に比べ、細胞集塊(コロニー)あたりの細胞数、コロニーの大きさが、BPA曝露群で有意に増大した。

D. 考察

マウスやラットを用いた実験動物においては、ほとんどSotoらのグループだけではあるが、BPAの周産期曝露によって乳腺管の肥厚、過形成や腫瘍の増加が認められている(Durando Mら, 2007)。これの分子メカニズムを明らかにし、ヒトへの影響予測を可能にするために、本研究では、HMECを用いた実験システムでBPAの影響を評価した。また、実験動物においては、周産期曝露と影響の発現時期の間が長いため、本研究システムにおいてもBPA曝露後に細胞回転が多回経るシステムを用いる必要があった。そのため、8世代を経たところで曝露し、影響評価を11世代目及び13世代目で行った。その結果、経世代を経てBPA曝露による用量依存的な増殖が認められた。11世代目の細胞における遺伝子発現プロファイルを調べた。2倍以上あがった遺伝子のシグナル伝達経路図を調べてみると、DNAダメージのストレスによるBrcal-ESR1を介したIGFR1, VEGFシグナル伝達系では、VEGF-Aに変動が認められ、G1-S期の変動の鍵分子CyclinD1も活性化していることが認められた。DNAに損傷が起こると、p53が誘導され、それが転写制御因子として働き、p21の発現を介して細胞周期の停止とアポトーシスの誘発という二面的な役割を果たすことが知られているが、今回の実験では、p53はE2では増加しているがBPAではどの濃度でも抑制していた。p21も同様な傾向となっている。したがって、BPAは、細胞周期の停止やアポトーシスの誘発はおこさず、増殖のみを促進する作用があると考えられた。さらに、この遺伝子発現レベルでの増殖関連遺伝子の誘導能が実際の増殖能に反映されているかどうかを調べるために、

ヌードマウスへの移植の代替法として3次元培養による増殖能を調べた。その結果、8世代目に1世代間だけBPAを曝露し、その後13世代目細胞を3次元培養した場合、溶媒対照に比べ、有意に大きな細胞集塊を形成した。このことは、BPAが増殖能への影響を示すこと、エピジェネティックな作用を有することを意味している。

E. 結論

ビスフェノールA(BPA)の正常ヒト乳腺上皮細胞(HMEC)における、細胞増殖・細胞老化への影響を調べた。HMECの増殖やmRNA遺伝子発現レベルでの影響を調べると、BPAの曝露により、細胞周期の停止やアポトーシスに関連した遺伝子への影響は認められず、増殖に関連した遺伝子の誘発や3次元で培養によるコロニーの増大が認められた。これらの結果からBPAは、分化やアポトーシスよりも細胞増殖系への影響を及ぼすことが示唆された。また、エピジェネティックな作用を有することが示唆された。今後、この増殖促進作用が、個体レベルでの乳腺末梢管の肥厚とどのような関連があるか、詳しいメカニズムを明らかにする必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tanaka J, Yonemoto J, Zaha H, Kiyama R, Sone H.

Estrogen-responsive genes newly found to be modified by TCDD exposure in human cell lines and mouse systems. *Mol Cell Endocrinol.* 2007 Jun 30; 272(1-2):38-49.

2. 学会発表

正常ヒト乳腺上皮細胞におけるビスフェノールAの分化、増殖及び老化に及ぼす影響(環境ホルモン学会第10回研究発表会・未定・2007)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし