

200838006B

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

新しい無菌医薬品製造技術の  
無菌性評価に関する研究

平成 18～20 年度 総合研究報告書

研究代表者

棚元 憲一

平成 21 (2009) 年 4 月



厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュレーション総合研究事業）  
総合研究報告書

新しい無菌医薬品製造技術の無菌性評価に関する研究  
代表研究者 棚元憲一 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部長

研究要旨：「最終滅菌法による無菌医薬品の製造指針」を作成し、平成 19 年 6 月 4 日付で監視指導麻薬対策課より発出した。ISO TC198/WG9 に参加し、ヘルスケア製品の無菌操作法の最終国際規格案の作成に携わった。無菌操作法による無菌医薬品製造において、製造方法に関係なく、同じ評価軸上で評価できる SA 状態分析法を開発し、リスクに応じた管理方法を提案した。アイソレータの無菌性維持に関する潜在的なリスク対策により、 $10^{-6}$  に限りなく近い無菌保証レベルが維持できることを示した。平板培養法、直接計数法の誤差測定、測定数等を考慮することにより結果の分散を抑えることができること、極少量の細菌しか存在しない試料の偽陰性を防ぐサンプリングには、検出対象細菌の特性の理解が重要であること、さらには蛍光活性染色法、マイクロコロニー法、PCR-DGGE 法や SEM-ISH 法により、RO 水製造システムの適切な維持管理が可能となることを示した。

研究分担者

佐々木次雄	医薬品医療機器総合機構 品質管理部 GMP エキスパート
那須正夫	大阪大学大学院薬学研究科 衛生化学・教授
曲田純二	日本ミリポア株式会社 プロセス事業本部次長
小久保 護	澁谷工業株式会社 微生物制御技術部長
渡辺恵市郎	日揮株式会社産業プロジェクト統括本部技術理事

GMP においても無菌性に関する要求事項が一段と多くなった。平成 15-17 年度の当厚労科学研究班活動として、「無菌操作法による無菌医薬品の製造指針」と「最終滅菌法による無菌医薬品の製造指針」の二つの指針を作成した。無菌操作法指針は、FDA ガイドライン（2004 年）、EU-GMP、WHO-GMP、ISO 13408 シリーズ内容を吟味の上、国際的に許容される要求事項を提示したもので、監視指導・麻薬対策課が発行する「医薬品 GMP 解説事例集」の中におさめられた。本研究では、1) 作成した 2 つの指針のフォローアップ研究、2) ヒトの介在しない無菌製造技術の無菌性評価に関する研究、3) 無菌操作法で製造する無菌医薬品へのパラメトリックリリース適用に関する研究、4) 超ろ過法で製造する製薬用水の膜（RO/UF 膜）の微生物学的堅牢性を保証するための微生物の迅速モニタリングシステムの開発

A. 研究目的

国内外とも無菌医薬品の製造に関しては一段と厳しいバリデーションと日常管理が求められている。

わが国においても平成 17 年度の改正薬事法の全面施行に合わせて改正された省令

や微生物の迅速計測法の日局導入に関する研究を展開する。

## B. 研究方法

無菌医薬品製造ガイドラインのフォローアップ研究では、日米欧の無菌操作法の指針について 2006/2007 年に主たる過滅菌を例にとり比較検討した。PDA/FDA Joint Conference での講演や意見交換を通じ、欧米の当局や産業界とも情報交換を行った。一方、ISO TC198/WG9 「ヘルスケア製品の無菌操作法」作業部会では、その国際規格発行に向けて国際祭儀などへ参画した。

無菌操作法で製造する無菌医薬品へのパラメトリックリリースの適用に関する研究では、分担研究者と協力研究者メンバー8名が三か年計21回開催した協力研究者会議での問題提起と議論を繰り返すことにより研究を進めた。議論は、現状無菌操作法の評価対象として絞り込んだ新しい管理概念である『最重要区域』の構成要素について検討し、最重要区域を構成する構造設備を中心とした静的な特性を評価する方法として、無菌性の達成状態を評価する状態評価と最重要区域を限る境界(バリアー)の外乱に対する堅牢性を評価する堅牢性評価によって対象物質の無菌性保持レベルを評価するSA状態分析法について検討した。

また、実際にアイソレータを使用している医薬品製造業者及びアイソレータを製造販売している業者から協力研究者を募り研究班を組織し、研究会議を開催して検討した。会議は3年間で12回開催し、初年度はアンケートによる国内のアイソレータ設備の現状把握、19年度はアイソレータ方式の

製造設備の潜在リスクをピックアップし、使用現場の実情を調査した。ピックアップされた項目の内、差圧に関しては実際の無菌製剤の製造設備を借用して試験を実施した。最終年度は医薬品の無菌性に直接影響を及ぼす可能性のあるアイソレータ内部の除染及び無菌維持についてのリスク評価を行った。

微生物の迅速検出・計測法の日局導入に関する研究では、まず細菌迅速試験法における誤差を推定し、また極少量の細菌しか存在しない試料から偽陰性を発生させることなくサンプリングを行うための方法を検討するために、乱数シミュレーションを用いた統計学的な解析を行なった。また、細菌迅速試験法の有効性を確認するために、水質の低下が見られたRO水製造システムを対象として、蛍光活性染色法、マイクロコロニー法、平板培養法を用いて、RO水製造過程における細菌数の変化を見た。同時に、16S rRNA 遺伝子を標的としたPCR-DGGE法により、RO水製造過程における細菌群集構造の変化を調べた。さらに、遺伝子情報をもとに特定細菌を検出できるISH法と高倍率で固体表面を観察できるSEMを併用したScanning Electron Microscopic-in situ hybridization (SEM-ISH)法を用いて、RO膜上の細菌を可視化した。

## C. 研究経過

無菌医薬品製造ガイドラインのフォローアップ研究では、年に一回開催されるPDA/FDA Joint Conferenceへの2回の参加により、無菌操作法の日米欧の差異が明確化した。特にバイオバーデンモニタリングに関しては欧州の規制当局の要求レベ

ルが明らかに高く、またリスクマネジメントとして欧米は2段でのろ過滅菌を推奨している点は日本と立場が異なることも明確になった。ISO TC198/WG9においては、日米欧の無菌操作法のガイダンスが出揃う中で、それらも参考にしながら産業界の技術レベルが異なる加盟29カ国に受け入れられる要件を作成した。2008年7月にはその国際規格が世界に向けて発効された。

無菌操作法で製造する無菌医薬品へのパラメトリックリリースの適用に関する研究では、現状無菌操作法において、無菌性の成立対象として管理概念である『最重要区域』に絞ることができた。この『最重要区域』の構成要素のうち、構成する構造設備を中心とした静的な特性を評価する方法として、無菌性の達成状態を評価する状態評価と最重要区域を限る境界(バリアー)の外乱に対する堅牢性を評価する堅牢性評価によって対象物質の無菌性保持レベルを評価するSA状態分析法を検討した。状態評価は4つにランク分け、堅牢性評価も5つにランク分けし、その評価結果を2つの要素が構成する平面(マトリックス)上に、最重要区域の位置付けを行うSA状態分析法のマッピング法を提案し、大きく3つの領域(SA-1、SA-2、SA-3)に分けることを提案した。この提案するマッピング法を、無菌製剤の製造工程に適用した結果、全ての操作を分類、説明できることが判明し、提案するSA状態分析法の有用性を明確にするとともに、実際の適用事例を示した。その結果、評価する工程の大きさを適切に設定することにより、製造所(製造ライン)の評価、バリデーション・工程管理試験の実施根拠、プロセス改善(優先付けおよび改善効果の比較)、変更管理時の影響

評価、工程逸脱発生時の調査等の用途に対応することが出来ることを事例を示しながら、紹介した。

一方、ヒトの介在しない無菌製造技術の無菌性評価に関する研究では、初年度は、現状でのアイソレータの運転状況を把握するための37項目の質問を選定し、国内の製薬会社に対してアンケート調査を行なった。その結果、アイソレータを採用している無菌医薬品製造ラインは17ラインであることがわかり、このラインについて使用状況の分析を行った。19年度は、アイソレータを採用した設備で考えられる製造全般にわたるリスクについて検討を行い、発生し得る項目をピックアップした。さらにこれらのリスク項目と、実際に稼働しているアイソレータで発生しているトラブル状況を比較するため、主なアイソレータユーザーに対して、発生した全てのトラブルについてのアンケート調査を行うとともに、アイソレータのグローブ操作に伴う差圧の変化について実機で検証した。リスクは①グローブ、②気密度、③マウスホール、④RTP、⑤圧力、気流、清浄度、HEPA、⑥除染、⑦洗浄、⑧トンネル滅菌機の冷却部滅菌及び⑨その他(トラブル、メンテナンス)分けて検討した。最終年度はアイソレータ内部の除染と無菌維持に関するリスクに絞り、それぞれの企業で分担された項目についてリスクを抽出・評価を行い、併せてリスクを低減させる対応を検討して、対応後のリスク評価も行なった。メーカーによって除染方式が異なる過酸化水素除染のリスク評価については、各社のパラメータを考慮したものについて行なった。また、発生頻度のランキングはどうしても個人の判断となっ

てしまうため、統一した判定基準を設定した。

微生物の迅速検出・計測法の日局導入に関する研究では、平板培養法および直接計数法を対象として、細菌数測定における誤差について、乱数シミュレーションであるモンテカルロ法を用いて統計学的解析を行なった結果、両手法ともに理想的な条件下で測定を行なった場合でも結果に 10%程度の誤差が含まれること、直接計数法においては 15 視野以上について測定をすれば、結果の分散を抑えることができるとわかった。また、1 cell/200 ml の菌量の試料を対象として、偽陰性の発生を抑えたサンプリング方法について統計学的解析を行なった結果、99.99%の精度でサンプリングを行うためには、一般的な細菌ではおよそ 1 日半の前培養時間が必要であることがわかった。次に細菌迅速試験法を用いて、RO 水製造システムにおける細菌の動態を解析した結果、全菌数ならびに生理活性をもつ細菌数が、ろ過や UV 処理によって大きく変化していることがわかった。遺伝子配列を指標として、RO 水製造システムにおける細菌群集構造の変化を解析した結果、処理工程が進むにつれて優占種が一般的な水環境に広く生息する  $\beta$ -proteobacteria や有機物の多い環境に生息する  $\gamma$ -proteobacteria から、貧栄養環境に生息する  $\alpha$ -proteobacteria へと変化していることが明らかとなった。SEM-ISH 法による観察の結果、二次電子像と反射電子像を重ねることにより、RO 膜表面の細菌を可視化し検出できた。

#### D. 考察

わが国製薬業界の過去 30 年間の変貌は

目を見張るものがある。GMP や Validation の考えは欧米から導入したシステムではあるが、今では欧米諸国と遜色のないものになっている。1990 年代からは ICH (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) メンバー国として、新薬承認審査の基準を国際的に統一し、医薬品の品質・有効性・安全性にかかわるデータ収集などについてガイドライン作成に貢献してきた。また、PDG (Pharmaceutical Discussion Group) メンバーとして薬局方の国際調和にも貢献してきた。外資系製薬企業の日本進出や日本の製薬企業との合併等により、無菌操作法に関わる技術においても欧米の製薬企業と遜色のないレベル、又はそれらを上回るレベルにある。

本研究では、1) 当研究班が作成した無菌製造にかかわる 2 つの指針のフォローアップ研究、2) 無菌操作法で製造する無菌医薬品へのパラメトリックリリース適用に関する研究、3) ヒトの介在しない無菌製造技術の無菌性評価に関する研究、4) 超ろ過法で製造する製薬用水の膜 (RO/UF 膜) の微生物学的堅牢性を保証するための微生物の迅速モニタリングシステムの開発や微生物の迅速計測法の日局導入に関する研究を展開した。

安全な医薬品製造を目的とした、無菌操作法による無菌医薬品製造指針は、日米欧で作成、発効された。また、国際規格の最新版も発効された。それらには文化的などの背景の違いからバイオバーデンモニタリング、ろ過滅菌、環境モニタリングなどでその要求要件にも差異が認められた。一方、

プロセスシミュレーション（培地充填試験法）は日米欧と国際規格ともに調和された。当研究班が作成した日本の2つの指針改正際してはこれらの情報をもとに国際調和を意識した観点からの改正を行う必要がある。

無菌操作法で製造する無菌医薬品へのPAの適用に関しては、提案する「SA状態分析法」は、対象とする無菌の物品の置かれている重要区域の無菌性のリスクを構造設備面から評価する手法であり、HACCPやFMEAなどの従来のリスク分析手法で評価しにくい構造設備面についてその考察を可能にするものである。換言すれば従来のリスク分析とこのSA状態分析を組み合わせることで、無菌製品の無菌性リスクをより正確に評価できる。当該SA状態分析法の優れた特性は2つある。一つは高い客観性であり、いま一つは最終滅菌法か無菌操作法かと言った無菌医薬品製造方法の違いを乗り越えて、同じ評価軸上に対象となる製造方法の位置付けが可能なことである。これらの特性により、行政当局および品質保証部門に寄与する製造設備の無菌性リスクの事前評価を可能とし、高い客観性から派生する第三者への説得力（「見える化」）による簡単な評価を可能とし、そして新技術や新規設備の評価も可能であると考えている。

わが国ではアイソレータを採用した製造設備が17ライン稼働している。アイソレータのウイークポイントであると指摘されるグローブの管理について、交換頻度を定めていないものが17ライン中12ラインと大半を占め、完全性に関しても客観的な方法を採用しているラインは5ラインのみであり、ほとんどが外観の目視検査であった。また、外観検査頻度についても週1回とい

った回答が多く、グローブのピンホールを重要視していない傾向が観察された。リスク調査について、圧力、気流、清浄度、HEPAについてリスク分析表を作成した。その後、実際にアイソレータを採用している製薬会社5社を対象にしたアンケート調査でもこれらのリスクが再確認されたため、実際の生産設備を使用してリスクを検証した。その結果、国内のガイドラインで示されている17.5Pa程度の差圧を維持していれば、空気の逆流や微粒子の異常な変化は観察されなかった。

アイソレータの除染に関するリスク分析では、グローブやハーフスーツの皺を客観的に判定できる検出方法がないため、Mのままであった。しかし、除染時に治具の使用、予めグローブやハーフスーツの皺になりやすい部分をアルコールで消毒することなどにより、除染が不十分となることを防止できるものとする。製造時のリスク分析については、グローブ操作等のマニュアル操作に伴う気流方向の乱れが指摘された。こうした介入による気流の乱れは、気流を検出する適切な方法がないため、RPRはMとなったが、対象としている設備がアイソレータを採用した設備であり、アイソレータの内部は一定のレベルまで除染されていることから、実質的に製造環境の汚染、製品汚染の原因とはならないものとする。さらに、製造プロセスにグローブ操作を伴っている場合にはグローブの破損というリスクが常に存在するが、通常はダブルグローブで作業を行なうことでほぼアイソレータ内部の汚染を回避できると考えられている。

医薬品などの微生物試験においては、よ

り精度の高い結果を短時間で得ることが重要となる。そこで、統計学的手法を用いて、まず細菌迅速試験法がもつ誤差を明らかにした。今後、実験誤差等を含めたシミュレーションを行なうことで、より実際に即した測定時の誤差を算出することが可能になるものと考えられる。また、偽陰性を発生させること無くサンプリングを行うための方法を検討した結果、検出対象とする細菌の lag time や doubling time 等が既知である場合に、偽陰性の発生確率を低下させるための条件を推測できることがわかった。今後、医薬品や製造環境における様々な細菌の動態が明らかになるにつれて、偽陰性を発生させること無くサンプリングを行うプロトコルが完成していくものと考えられる。また、RO 水製造過程に見られた細菌数や細菌群集構造の変化は、様々な処理により水に含まれる有機物等が除去され、それにより細菌数や活性、優占種が変化したことによるものと考えられる。RO 膜を利用した水処理システム内は貧栄養な水環境であるが、多くの細菌が RO 膜上に濃縮され、付着していると考えられる。今後、様々な施設においてこれらの手法を用いた解析を行うことにより、RO 水製造工程における安全管理が可能となり、より安心・安全な医薬品製造用水を確保することができるものと考えられる。

## E. 結論

1. 「最終滅菌法による無菌医薬品の製造指針」を作成し、平成 19 年 6 月 4 日付で監視指導麻薬対策課より発出した。
2. 無菌操作法により製造される医薬品の安全性の追求は継続して必要な問題であり、

微生物汚染などに対するリスクマネジメントは今後とも追及が続く懸案である。一方、世界の規制当局が要求する要件の背景を理解し、それを導入する、あるいは正しい代替法を検討することも重要である。

3. 高い客観性を持ち、無菌医薬品製造方法の違いを乗り越えて同じ評価軸上で評価できる SA 状態分析法を開発することが出来、リスクに応じた柔軟性のある管理概念、実用性のある運営方法を提案出来た。

4. アイソレータ内部の除染は問題ないが、除染後の無菌維持に関しては様々なリスクが存在する。これらのリスクファクターに対する対応策を検討し、客観的に評価できないいくつかの項目について示した「推奨される対応」等を採用することにより、 $10^{-6}$ に限りなく近い無菌保証レベルが維持できるものと考えた。

5) 平板培養法、直接計数法ともに 10%程度の誤差が含まれること、直接計数法においては 15 視野以上について測定をすれば、結果の分散を抑えることができること、極少量の細菌しか存在しない試料の偽陰性を防ぐサンプリングには、検出対象細菌の特性の理解が重要であること、さらには蛍光活性染色法、マイクロコロニー法、PCR-DGGE 法や SEM-ISH 法により、RO 水製造システムの適切な維持管理が可能となることを示した。

## F. 健康危険情報

なし



## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ohnishi T., Muroi M., & Tanamoto K. Novel lipopolysaccharide-recognition mechanism in cells expressing TLR4 and CD14 but lacking MD-2. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 51, 84-91, 2007
- 2) Yokota S., Ohnishi T., Muroi M., Tanamoto K., Fujii N., Amano K. Highly-purified *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide preparations induce weak inflammatory reactions and utilize Toll-like receptor 2 (TLR2) complex but not TLR4 complex. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 51, 140-148, 2007
- 3) Yamamoto M, Zhu C, Yi L, Rong Z, Miura Y, Izumi M, Nakajima S, Tanamoto K., Shimizu S, Baba N. Synthesis of Lipid Derivatives of Pyrrole Polyamide and Their Biological Activity. Biosci. Biotechnol. Biochem. 71, 1078-82, 2007
- 4) Sugimoto N., Koike R., Furusyo N., Tanno M., Yomota C., Sato K., Yamazaki T., Tanamoto K. Quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy determination of the oxyethylene group contents of polysorbates. Food Addit Contam. 24, 799-806. 2007
- 5) Ohnishi T., Yoshida T., Igarashi A., Muroi M. & Tanamoto K. Effects of Possible Endocrine Disrupting Chemicals on MyD88-independent TLR4 signaling. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 52, 293-5, 2007
- 6) Muroi M. & Tanamoto K. Differential involvement of TRAF6 in MyD88- and IRAK-1-induced activation of NF-kB. J.Leukocyte. Biol. 83, 702-7, 2007
- 7) Kumada H, Haishima Y, Watanabe K,

Hasegawa C, Tsuchiya T, Tanamoto K., Umemoto T. Biological properties of the native and synthetic lipid A of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. Oral Microbiol Immunol. 23, 60-69, 2008

### 2. 学会発表

- 1) Kikuchi Y., Takeya T., Nakajima O., Sakai A., Yamazaki T., Tanamoto K., Matsuda H., Sawada J., and Takatori K., Effect of hypoxia on the expression of a splice variant of prion protein mRNA lacking the GPI anchor signal sequence in human glioblastoma cell line T98G Keystone Symposia, Molecular Mechanisms of Neurodegeneration (2007.1)
- 2) Nakamura K., Sato K., Tanamoto K., Ushijima H, Haishima Y., Tsuchiya T, Ogawa H. Interaction of synthesized pseudoproteoglycan (pseudoPG) with specific proteins and its biological meanings. The 4th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences Tokyo (2007. 12)
- 3) Sugiyama K., Muroi M., Tanamoto K., Nishijima M, Sugita-Konishi Y., Effect of deoxynivalenol on LPS signaling in macrophage. The Society of Toxicology Annual Meeting (2008.3)

## H. 知的財産の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
棚元憲一	食品添加物公定書解説書	谷村顕雄、棚元憲一	食品添加物公定書解説書	廣川書店	東京都	2007	
Sasaki T. and Yamamoto F	Pharmaceutical administration and regulations in Japan.	James Agalloco, Frederick J. Carleton	Validation of Pharmaceutical Processes (3 <sup>rd</sup> ed.)	informa healthcare	New York	2007	683-694
佐々木次雄	第7節 細菌, 真菌の検出法	早川 堯夫 他	バイオ医薬品の品質, 安全性	エル・アイ・シー	日本	2007	228-235
佐々木次雄	医療関係マネジメントシステムの動向、ISO/TC198 (ヘルスケア製品の滅菌)		JIS ハンドブック 2007、医療機器 I	日本規格協会	東京都	2007	771-778
棚元憲一	エンドトキシン試験法	佐々木次雄 棚元憲一 川村邦夫	新 GMP 微生物試験法	じほう	東京都	2008	244-270
佐々木次雄	微生物利用に関わる安全性や知財権への取組み、3.1 バイオテロリズム	渡邊信 他	微生物の辞典	朝倉書店	日本	2008	693-695
佐々木次雄	I S O 関連分野の状況	小林寛伊	医療現場の滅菌	へるす出版	日本	2008	175-195
佐々木次雄	病原体の輸送	佐々木次雄 棚元憲一 川村邦夫	新 GMP 微生物試験法	じほう	日本	2008	71-77
佐々木次雄	遺伝子解析による微生物の同定法、細菌	佐々木次雄 棚元憲一 川村邦夫	新 GMP 微生物試験法	じほう	日本	2008	128-137
佐々木次雄	無菌試験法、細菌・真菌	佐々木次雄 棚元憲一 川村邦夫	新 GMP 微生物試験法	じほう	日本	2008	159-171
佐々木次雄	無菌試験法、マイコプラズマ試験法	佐々木次雄 棚元憲一 川村邦夫	新 GMP 微生物試験法	じほう	日本	2008	171-186
佐々木次雄	培地充てん試験法	佐々木次雄 棚元憲一 川村邦夫	新 GMP 微生物試験法	じほう	日本	2008	385-396
棚元憲一	食品添加物の法規制と食品安全基本法	義平邦利、棚元憲一 他	食品添加物活用ハンドブック	産業調査会 辞典出版センター	東京都	2009	17-22

棚元憲一	食品添加物公定書	義平邦利、 棚元憲一 他	食品添加物活 用ハンドブッ ク	産業調査 会 辞典 出版セン ター	東京都	2009	37-42
------	----------	--------------------	-----------------------	----------------------------	-----	------	-------

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Muroi M & Tanamoto K	Lipid A and its precursor lipid IVa require different region of mouse MD-2 molecule to induce Toll-like receptor 4-mediated NF-kB activation.	J. Biol. Chem	281	5484-5491	2006
Mutsuga M, et al.	Migration of formaldehyde and acetaldehyde into mineral water in polyethylene terephthalate (PET) bottles.	Food Addit Contam.	23	212-218	2006
Ogawa Y, et al.	Estrogenic activities of chemicals related to food contact plastics and rubbers tested by the yeast two-hybrid assay.	Food Addit Contam	23	422-430	2006
Sugimoto N., et al.	Identification of the main constituents in Sandarac Resin	J. Food Hyg. Soc. Japan	47	76-79	2006
Kitamura Y, et al.	Standard infrared absorption spectrum of betaine and optimal conditions for its measurement.	J. Food. Hyg. Soc. Japan	47	232-236	2006
Sugimoto N., et al.	Application of liquid chromatography-nuclear magnetic resonance to the identification of ethyldimethylpyridine	A food flavoring agent Food Additives & Contaminants	23	1253-1259	2006
Igarashi A. et al.	Effects of possible endocrine disrupting chemicals on bacterial component-induced activation of NF-kB.	Biol. Pharm. Bull	29	2120-2122	2006
Mutsuga M, et al	Analysis of constituents in Urushi Wax, a natural food gum base. J.	Food. Hyg. Soc. Japan	4	167-172	2006

Phan L.et al.	Genetic and phenotypic characterization of Haemophilus influenzae type b isolated from children with meningitis and their family members in Vietnam. Japan.	Jpn. J. Infect. Dis.	60	351-356	2006
Yamazaki T.,et al.	Comparison of PCR for sputum samples obtained by induced cough and serological tests for diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infection in children.	Clinical Vaccine Immunology	13	708-710	2006
佐々木次雄	無菌医薬品の品質保証と国際調和	Pharm Tech Japan	12	9-17	2006.
佐々木次雄	超ろ過法で製した注射用水への微生物検出法の適用と今後の課題	Pharm Tech Japan	23	23-32	2006
佐々木次雄	ISO/TC198 活動を通じて無菌医薬品について考えること	製剤機械技術研究会誌	16	21-25	2006
佐々木次雄	北本賞受賞講演「過去30年間のマイコプラズマ研究を振り返って」	日本マイコプラズマ学会雑誌		20-25	2006
佐々木次雄	M. pneumoniae の検出・薬剤耐性遺伝子検出における PCR の有用性について	日本マイコプラズマ学会雑誌		64-66	2006
Yamaguchi N.et al.	Simple detection of small amounts of Pseudomonas cells in milk by using a microfluidic device.	Lett. Appl. Microbiol	43	631-636	2006
Takehiko K. et al.	Rapid identification and enumeration of antibiotic resistant bacteria in urban canals by microcolony-fluorescence in situ hybridization.	J. Health Sci.	52	703-710	2006
Nobuyasu Y,et al.	Rapid enumeration of bacterial cells in drinking water using a microfluidic device.	Proceedings of 2nd ASM-IEEE EMBS Conference on Bio-, Micro- and Nanosystems		74-76	2006

Nobuyasu Y,et al.	Rapid monitoring of bacteria in dialysis fluids by fluorescent vital staining and microcolony methods.	Nephrology Dialysis Transplantation	22	612-616	
Yamamoto M, et al..	Synthesis of Lipid Derivatives of Pyrrole Polyamide and Their Biological Activity.	Biosci. Biotechnol,Biochem.	71	1078-82	2007
Ohnishi T.,et al.	Novel lipopolysaccharide-recognition mechanism in cells expressing TLR4 and CD14 but lacking MD-2.	FEMS Immunol. Med. Microbiol.	51	84-91	2007
Yokota S.,et al.	Highly-purified Helicobacter pylori lipopolysaccharide preparations induce weak inflammatory reactions and utilize Toll-like receptor 2 (TLR2) complex but not TLR4 complex.	FEMS Immunol. Med. Microbiol.	51	140-148	2007
Sugimoto N., et al.	Quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy determination of the oxyethylene group contents of polysorbates.	Food Addit Contam	24	799-806	2007
Uekusa Y, et al.	Neocrocetin A :a novel crocetin glycoside with a unique system for binding sugars isolated from gardenia yellow.	Chem. Pharm. Bull.	55	1643-1646	2007
Ohnishi T.et al.	Effects of Possible Endocrine Disrupting Chemicals on MyD88-independent TLR4 signaling.	FEMS Immunol. Med. Microbiol.	52	293-5	2007
Muroi M. Et al.	Differential involvement of TRAF6 in MyD88- and IRAK-1-induced activation of NF-kB.	J.Leukocyte. Biol.	83	702-7	2007
Tada A,et al.	Analysis of constituents of ester-type gum bases used as natural food additives	Shokuhin Eiseigaku Zasshi.	48	179-85	2007

Yamazaki T,et al.	Activity of Garenoxacin against macrolide-susceptible and -resistant Mycoplasma pneumoniae.	Antimicrob. Agents Chemother.	51	2278-2279	2007
Huong PLT,et al.	First report on clinical features of Mycoplasma pneumoniae infections in Vietnamese children.	Jpn. J. Infect.	60	370-373	2007
Okazaki N.,et al.	Mycoplasma pneumoniae Isolated from Patients with Respiratory Infection in Kanagawa Prefecture in 1976-2006.: Emergence of Macrolide-Resistant Strains	Jpn. J. Infect.	60	325-326	2007
Seki N.et al.	Quantitative analysis of proliferation and excretion of Bartonella quintana in body lice, Pediculus humanus	L. Am. J. Trop. Med. Hyg.	77	562-566	2007
Sasaki T. et al.	Pharmaceutical administration and regulations in Japan. Validation of Pharmaceutical Processes (3rd ed.)	Marcel Dekker, Inc.		683-694	2007
Yamaguchi N,et al.	Rapid quantification of bacterial cells in potable water using a simplified microfluidic device.	J. Microbiol.	68	643-647	2007
Kenzaka T, et al.	High frequency phage-mediated gene transfer among Escherichia coli determined at the single cell level. Appl. Environ.	Microbiol.	73	3291-3299	2007
Yamaguchi N,et al.	Rapid and automated enumeration of viable bacteria in compost using a micro-colony auto counting system.	J. Microbiol. Methods.,	71	1-6	2007

Jorquera M, et al.	Stimulatory effect of glutamine and pyruvate on plasmid transfer between Pseudomonas strains.	Microb. Environ	22	320-326	2007
馬場貴志 他	マイクロコロニー自動計数装置による水環境中の生菌数の迅速計測	防菌防黴	35	719-724	2007
Muroi M. et al.	Differential involvement of TRAF6 in MyD88- and IRAK-1-induced activation of NF- $\kappa$ B.	J.Leukocyte. Biol.	83	702-707	2008
Kumada H, et al.	Biological properties of the native and synthetic lipid A of Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide	Oral Microbiol Immunol	23	60-69	2008
Sugimoto N, et al.	Survey of synthetic disinfectants in grapefruit seed extract and its compounded products	J. Food. Hyg. Soc	49	56-62	2008
Hatao F et al.	MyD88-induced downregulation of IRAK-4 and its structural requirements	FEMS Immunol. Med. Microbiol	53	260-264	2008
Kikuchi Y et al.	Hypoxia induces expression of a GPI-anchorless splice variant of the prion protein.	FEBS J.	275	2965-2976	2008
Kawamura Y, et al.	Analysis of antimony and lead in pewtereares.	JJFC	15	1-5	2008
Mutsuga M, et al.	Semicarbazide in the sealing gasket of bottled food.	JJFC	15	23-27	2008
棚元憲一 等	日本薬局法指定菌株の特性と保存管理法に関する研究	医薬品研究	39	309-312	2008
Mutsuga M, et al.	Migration of lactic acid, lactide and oligomers from polylactide.	Food Addit Contam	27	1-8	2008
Mutsuga M, et al.	Study on semicarbazide in the glass bottled foods	JJFC	15	67-72	2008

Tatebe C et al.	Quantitative analysis of polysorbates using liquid chromatography-mass spectrometry. Lpn.	J.Food Chem	15	129-134	2008
Kawasaki H. et al.	Analysis of polysorbates in foods.	J.Food Chem	15	122-128	2008
Kawasaki H, et al.	Analysis of polysorbates in foods.	J.Food Chem	15	122-128	2008
Kenri T. et al.	Genotyping analysis of <i>Mycoplasma pneumoniae</i> clinical strains in Japan between 1995 and 2005: type shift phenomenon of <i>M. pneumoniae</i> clinical strains.	J. Med. Microbiology	57	469-475	2008
佐々木次雄 他	医薬品製造用細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験法の問題点	医薬品研究	39	299-309	2008
佐々木次雄 他	無菌製造法の留意点	Pharm Tech Japan	24	2419-2425	2008
渡辺恵市郎 他	無菌操作法で製造する無菌医薬品のリスクマネジメント	Pharm Tech Japan	24	7-16	2008
Tomoaki Ichijo et al.	16S rRNA sequence-based rapid and sensitive detection of aquatic bacteria by on-chip hybridization following multiplex PCR	J. Health Sci	54	123-128	2008
Nobuyasu Yamaguchi et al.	Microbial monitoring for safety management of water in closed experimental systems.	Proceeding of International Symposium on Application of a Closed Experimental System to Modeling of <sup>14</sup> C Transfer in the Environment		163-167	2008
Fumito Maruyama et al.	Application of real-time long and short polymerase chain reaction for sensitive monitoring of the fate of extracellular plasmid DNA introduced into river waters.	Microb. Environ	23	229-236	2008



Nobuyasu Yamaguchi et al.	Rapid and sensitive detection of viable bacteria in contaminated platelet concentrates using a newly developed bio-imaging system	Transfusion	48	2364-2369	2008
馬場貴志 他	閉鎖型生態系実験施設 (CEEF) の水環境中における細菌の動態	生態工学会誌	20	11-17	2008
山口進康 他	迅速・高精度な細菌モニタリング	第 24 回宇宙利用シンポジウム 発表論文集		347-350	2008
見坂武彦 他	マイクロコロニー法による食材中の生菌数の迅速測定	日本食品微生物学会雑誌	25	148-152	2008
上野誠二 他	ヒトの介在しない無菌製造技術の無菌性評価に関する研究	Pharm Tech Japan	24	15-23	2008
Kimura N.et al	Japanese Perspective on Biological Indicators. Biological Indicators for Sterilization Processes	DHI Publishing, LLC		195-210	2009
岡本晃典 他	細菌数測定法における誤差分布の推定	医薬品研究	40	4-8	2009

## Effects of Possible Endocrine Disrupting Chemicals on Bacterial Component-Induced Activation of NF- $\kappa$ B

Arisa IGARASHI, Satoko OHTSU, Masashi MUROI, and Ken-ichi TANAMOTO\*

Division of Microbiology, National Institute of Health Sciences; 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan.

Received June 6, 2006; accepted July 19, 2006; published online July 21, 2006

Endocrine disrupting chemicals (EDCs) have a possibility to exacerbate infectious diseases because EDCs disturb the human immune system by interfering with endocrine balance. To assess the influence of EDCs on the innate immune function of macrophages, we investigated the effects of thirty-seven possible endocrine disruptors on lipopolysaccharide (LPS)- or bacterial lipopeptide (Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>)-induced activation of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B). Alachlor, benomyl, bisphenol A, carbaryl, kelthane, kepone, octachlorostyrene, pentachlorophenol, nonyl phenol, *p*-octylphenol and ziram inhibited both LPS- and Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>-induced activation of NF- $\kappa$ B. Simazine inhibited only LPS-induced activation. A strong inhibitory effect was observed with ziram and benomyl. On the other hand, diethylhexyl adipate and 4-nitrotoluene tended to enhance the activation induced by Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> and LPS, respectively. Aldicarb, amitrole, atrazine, benzophenone, butyl benzyl phthalate, 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, dibutyl phthalate, 2,4-dichlorophenol, dicyclohexyl phthalate, diethylhexyl phthalate, diethyl phthalate, dihexyl phthalate, di-*n*-pentyl phthalate, dipropyl phthalate, malathion, methomyl, methoxychlor, metribuzin, nitrofen, permethrin, trifluralin, 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and vinclozolin had no significant effects at 100  $\mu$ M. These results indicate that some agrochemicals have the potential to inhibit macrophage function and suggest that endocrine disruptors may influence the development of bacterial infections.

**Key words** endocrine disruptor; nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B); lipopolysaccharide; bacterial lipoprotein; macrophage

Endocrine disrupting chemicals (EDCs) are exogenous substances that mimic, antagonize, impair, enhance, or inhibit the actions of endogenous hormones and in turn cause abnormalities of growth, reproduction, development, behavior, and immune function, or cause malignant tumors.<sup>1–3</sup> EDCs act at multiple sites via multiple mechanisms of action. Receptor-mediated mechanisms have attracted the most attention, but other mechanisms including hormone synthesis, transport, and metabolism are also involved.<sup>4,5</sup> However, the secondary effects of EDCs, such as the influence on infectious diseases, have been poorly investigated.

Infectious diseases are caused by microbial invasion. To overcome this invasion, the human body utilizes a sophisticated and complicated immune system. Disturbance of this well-organized immune system may result in the development of serious infectious diseases. It is, therefore, plausible to consider that EDCs may exacerbate infectious diseases because disruption of endocrine function seriously disturbs the immune system. It is well known that macrophages play an important role in the defense mechanisms of the host immune system. Macrophages are activated by microbial components such as lipopolysaccharide (LPS) or bacterial lipopeptides.<sup>6</sup> Previously, we studied the effects of various possible EDCs on macrophage activation and found that some EDCs strongly inhibit LPS-induced TNF- $\alpha$  and nitric oxide production by macrophages.<sup>7</sup> Since the activation of the transcriptional factor NF- $\kappa$ B is essential for the production of TNF- $\alpha$  and nitric oxide, in the present study we investigated the effects of possible EDCs on bacterial component-induced activation of NF- $\kappa$ B.

### MATERIALS AND METHODS

**Reagents** Benomyl and permethrin were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.). 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid was obtained from Kanto Chemical (Tokyo,

Japan). The other thirty four chemicals used as EDCs were purchased from Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan). Their abbreviations are shown in Table 1. These chemicals were selected from the SPEED'98 list (<http://www.env.go.jp/en/chemi/ed.html>; SPEED'98 has been revised and "Perspectives on Endocrine Disrupting Effects of Substances—ExTEND 2005—" has been issued during the preparation of this manuscript) depending on their availability and water solubility. Chemicals that show higher cellular toxicity were excluded. LPS prepared from *E. coli* O111 was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.) and re-purified as described previously.<sup>8</sup> Bacterial lipopeptide Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> was obtained from Bachem (Bubendorf, Switzerland). An NF- $\kappa$ B-dependent luciferase reporter plasmid pcELAM-L was constructed by inserting the *NotI* (blunt ended)-*SalI* fragment of pELAM-L<sup>9</sup> into the *NruI*-*XhoI* site of pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.).

**Cell Culture** The NF- $\kappa$ B reporter cell line stably carrying an NF- $\kappa$ B-dependent luciferase reporter plasmid pcELAM-L was established as follows. After linearizing with *Bgl*III, pcELAM-L was transfected into a mouse macrophage cell line RAW 264 (obtained from the Riken Cell Bank, Tsukuba, Japan) cells by using FuGene6 transfection reagent (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Stable transfectants were selected for G418 resistance at a concentration of 0.5 mg/ml. The cell line was maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.) supplemented with 0.5 mg/ml G418, 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.), penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100  $\mu$ g/ml).

**NF- $\kappa$ B Reporter Assay** The NF- $\kappa$ B-dependent luciferase reporter assay was performed as described elsewhere.<sup>10</sup> Briefly, the NF- $\kappa$ B reporter cells ( $1-3 \times 10^5$ /well) were plated in 12-well plates and on the following day stimulated for 6 h with 10 ng/ml of either LPS or Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> in the absence or presence of EDCs, which had previously been

\* To whom correspondence should be addressed. e-mail: tanamoto@nihs.go.jp

Table 1. Effects of Possible EDCs on LPS- or Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>-Induced Activation of NF- $\kappa$ B

Chemicals	Abbreviation	LPS stimulation	Pam <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub> stimulation
Alachlor	ACL	56.2±8.18*	51.4±2.65**
Aldicarb	ACB	113.1±9.52	105.8±4.23
Amitrole	ATA	107.0±9.50	105.5±9.68
Atrazine	ATZ	79.4±10.71	86.5±4.67
Benomyl	BML	3.2±0.31**	3.2±1.01**
Benzophenone	BZP	85.6±8.94	94.9±9.39
Butyl benzyl phthalate	BBP	108.6±7.72	82.9±9.77
Bisphenol A	BPA	70.5±4.37**	55.7±6.32**
Carbaryl	NAC	43.4±6.68*	55.7±2.37**
2,4-Dichlorophenoxy acetic acid	2,4-D	96.7±10.41	111.6±7.20
Dibutyl phthalate	DBP	92.3±9.60	91.9±6.20
2,4-Dichlorophenol	DCP	91.4±8.13	96.7±6.17
Dicyclohexyl phthalate	DCHP	90.2±7.02	83.4±6.44
Diethylhexyl adipate	DOA	106.4±8.10	108.3±2.84*
Diethylhexyl phthalate	DOP	103.6±9.13	98.9±8.67
Diethyl phthalate	DEP	86.4±4.93	94.5±3.23
Dihexyl phthalate	DHP	97.7±7.15	101.1±7.23
Di-n-pentyl phthalate	DPP	96.4±10.90	101.7±4.47
Dipropyl phthalate	DPpP	92.1±8.75	88.2±13.68
Kelthane	KLT	17.2±8.65*	25.8±9.85*
Kepon	KPN	8.0±5.01**	10.8±7.28**
Malathion	MAT	89.5±12.50	84.3±3.74
Methomyl	MTM	92.2±7.81	108.3±9.26
Methoxychlor	DMDT	94.9±5.63	77.2±9.98
Metribuzin	MTB	92.0±9.36	110.8±9.70
Nitrofen	NIP	100.5±5.61	102.8±8.49
4-Nitrotoluene	NTT	115.1±4.30**	108.5±10.75
Octachlorostyrene	OCS	74.1±4.85**	97.4±11.29
Pentachlorophenol	PCP	70.6±6.52*	50.5±7.20*
Nonyl phenol	NNP	58.6±4.12**	49.3±8.24*
p-Octylphenol	OTP	59.6±5.82**	44.5±6.34*
Permethrin	PMT	116.1±9.33	88.2±12.00
Simazine	CAT	79.9±7.24*	97.8±9.86
Trifluralin	TFR	110.5±4.77	115.1±9.84
2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid	2,4,5-T	92.7±7.91	114.1±10.87
Vinclozolin	VCZ	92.9±8.51	102.6±4.23
Ziram	ZRM	0.0±0.02**	0.0±0.01**

Values are expressed as percent (mean±S.E.M.) of respective control where no EDC treatment was performed. Data are from at least three independent experiments. All chemicals were used at 100  $\mu$ M. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , compared with the respective control by paired Student's  $t$ -test.

dissolved in DMSO. The final concentration of DMSO was adjusted to 0.1% and this concentration of DMSO was added to wells without EDCs as a control. Reporter gene activity was then measured according to the manufacturer's (Promega, Madison, WI, U.S.A.) instructions. The protein concentrations of the cellular extracts were determined by the Bradford method (Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.), and reporter activity was normalized to the protein concentration for the compensation of difference in cell numbers and viabilities between wells.

**Statistical Analyses** The paired Student's  $t$ -test was used to evaluate statistical significance. A  $p$ -value of less than 0.05 was considered to be significant.

## RESULTS

We selected thirty seven chemicals (described as EDCs in this study) that are suspected of having endocrine disrupting effects from among agrochemicals and resin-related chemicals (see Materials and Methods). To systematically compare the effect of each chemical on bacterial component-induced activation of NF- $\kappa$ B, the mouse macrophage cell line RAW 264 stably carrying an NF- $\kappa$ B-dependent luciferase reporter gene was incubated with 100  $\mu$ M of each chemical followed

by either LPS or Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> and the reporter activity was measured. Table 1 summarizes the results. Ten chemicals, ACL, BML, BPA, NAC, KLT, KPN, PCP, NNP, OTP and ZRM, inhibited both LPS- and Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>-induced activation of NF- $\kappa$ B. OCS and CAT inhibited only LPS-induced activation. On the other hand, DOA and NTT slightly enhanced the activation induced by Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> and LPS, respectively. Cellular toxicity assessed from protein concentrations of cellular extracts was observed with KLT, KPN and ZRM at the concentration (100  $\mu$ M) used (data not shown).

We next examined the concentration-dependency of the fourteen chemicals that affected LPS- or Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>-induced activation of NF- $\kappa$ B (Fig. 1). All of the EDCs tested, except for DOA and NTT, inhibited the activation in a concentration-dependent manner. The Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>-induced activation of NF- $\kappa$ B was not affected by 100  $\mu$ M OCS (Table 1) but was inhibited by 200  $\mu$ M OCS (Fig. 1B). An increase in reporter activity was observed at 100  $\mu$ M DOA and NTT (Table 1) but no significant increase was observed at 200  $\mu$ M of each of these chemicals. We were not able to examine the effect of 200  $\mu$ M CAT because of its poor solubility. Cellular toxicity was not observed with any of the chemicals at the concentrations tested in Fig. 1 except for 100  $\mu$ M of KPN and KLT (data not shown).

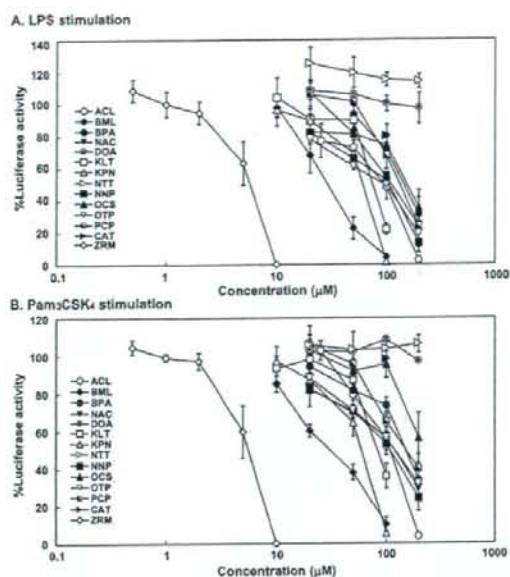


Fig. 1. Concentration-Dependent Effects of Possible EDCs on LPS- or Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>-Induced Activation of NF- $\kappa$ B

RAW 264 cells stably carrying an NF- $\kappa$ B-dependent luciferase reporter gene were either left unstimulated or stimulated with 10 ng/ml of LPS (A) or Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (B) for 6 h with or without the indicated concentrations of EDCs, and luciferase activity was then measured. Values are means  $\pm$  S.E.M. from three independent experiments. The reporter activity in response to LPS or Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> alone is expressed as 100%.

## DISCUSSION

In order to explore the influence of EDCs on macrophage activation, in the present study we examined the effects of thirty-seven chemicals that are suspected of having endocrine disrupting effects on LPS- and Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>-induced activation of NF- $\kappa$ B, and found that fourteen of the chemicals affected NF- $\kappa$ B activation in response to either stimulation (Table 1). Twelve chemicals showed inhibitory effects and two chemicals showed, if any, enhancing effects. The chemicals examined in this study are classified basically as agrochemicals and resin-related chemicals, and the stronger inhibitory activity was observed with agrochemicals. Most of chemicals exerted their effects at a concentration range of 50–200  $\mu$ M, which may be higher than the levels that possibly occur in the environment. In actual circumstances, human bodies are exposed to multiple chemicals chronically, and bioaccumulability and synergistic effects of these chemicals have not been well studied. Therefore, it can not be ruled out that chronic exposure to even low levels of these chemicals may have some impacts.

LPS and bacterial Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> utilize Toll-like receptor (TLR)4 and TLR2, respectively, to stimulate macrophages. Since the chemicals that had inhibitory activity affected both LPS- and Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>-induced activation of NF- $\kappa$ B, these chemicals probably affect the signaling component common to both TLR4 and TLR2.

In this study, we found that ACL, NAC, CAT, NNP and OTP, which inhibited either LPS-induced TNF- $\alpha$  or nitric oxide production by macrophages in our previous study,<sup>7)</sup> in-

hibited LPS-induced NF- $\kappa$ B activation as well. Since the activation of NF- $\kappa$ B is essential for the production of TNF- $\alpha$  and nitric oxide, the inhibition of NF- $\kappa$ B by these chemicals may be involved in the inhibitory effects on TNF- $\alpha$  and nitric oxide.

We have reported that the inhibitory activity of NAC, a carbamate agrochemical, on LPS-induced activation of NF- $\kappa$ B involves its alkylating reactivity.<sup>11)</sup> In the present study, BML and ZRM, which are carbamate and dithiocarbamate agrochemicals, respectively, also showed strong inhibitory activity. In addition, ZRM and another dithiocarbamate agrochemical, mancozeb, have also been shown to inhibit LPS-induced activation of NF- $\kappa$ B.<sup>12)</sup> On the other hand, we found in the present study that three other carbamate agrochemicals, ACB, MTM and VCZ showed no significant effects. Therefore, the inhibitory effect is not explained solely by carbamate and dithiocarbamate structures.

Previously, we have found that ACL inhibits the upstream process of LPS-induced degradation of I $\kappa$ B- $\alpha$ .<sup>11)</sup> In the present study, all of the agrochemicals, excluding carbamates and dithiocarbamates, that showed inhibitory activity possess a chloromethyl ketone (or alcohol) residue, as does ACL. This may suggest that this structure is involved in the inhibitory activity of these chemicals, as well as those of resin-related chemicals, are necessary to understand the influence of EDCs on infectious diseases.

Our results demonstrated that many of the agrochemicals and resin-related chemicals which are suspected of having endocrine disrupting effects possess the ability to inhibit bacterial component-induced activation of NF- $\kappa$ B. Since the activation of NF- $\kappa$ B plays an important role in bacterial clearance, these chemicals may have the potential to exacerbate infectious diseases.

**Acknowledgments** This work was supported in part by a grant from the Ministry of the Environment Japan.

## REFERENCES

- Safe S, Wang F, Porter W, Duan R, McDougal A, *Toxicol. Lett.*, **102–103**, 343–347 (1998).
- Schrenk D, *Biochem. Pharmacol.*, **55**, 1155–1162 (1998).
- Eskenza B, Mocarelli P, Warner M, Samuels S, Vercellini P, Olive D, Needham L, Patterson D, Brambilla P, *Chemosphere*, **40**, 1247–1253 (2000).
- Masuyama H, Hiramoto Y, Kunitomi M, Kudo T, MacDonald P N, *Mol. Endocrinol.*, **14**, 421–428 (2000).
- Inoshita H, Masuyama H, Hiramoto Y, *J. Mol. Endocrinol.*, **31**, 551–561 (2003).
- Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K, Suzuki T, Azuma H, Ikeda H, *Pharmacol. Ther.*, **100**, 171–194 (2003).
- Hong C C, Shimomura-Shimizu M, Muroi M, Tanamoto K, *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 1136–1139 (2004).
- Muroi M, Ohnishi T, Tanamoto K, *J. Biol. Chem.*, **277**, 42372–42379 (2002).
- Ohnishi T, Muroi M, Tanamoto K, *J. Immunol.*, **167**, 3354–3359 (2001).
- Muroi M, Tanamoto K, *J. Biol. Chem.*, **281**, 5484–5491 (2006).
- Shimomura-Shimizu M, Sugiyama K, Muroi M, Tanamoto K, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **332**, 793–799 (2005).
- Corsini E, Viviani B, Birindelli S, Gilardi F, Torri A, Codecà I, Lucchi L, Bartsaghi S, Galli C L, Marinovich M, Colosio C, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **212**, 89–98 (2006).