

### 13. AhRの生理機能と炎症応答・小児期個体における役割

研究分担者 藤井 義明 筑波大学 先端学際領域研究センター 客員教授

#### 研究要旨

ダイオキシンに代表される多環性芳香族化合物は催奇型性、発癌のプロモーション作用、クローラクネ、内分泌攪乱作用など、多岐に亘る生体毒作用を示すが、この作用の殆どが生体内因子 AhR によって仲介されることが知られている。この生体毒性の発現は正常な生理機能の裏面の作用と考えられる。従って、AhR による毒性作用を理解するには AhR による生理機能の発現のメカニズムを理解することが重要である。そのような観点から新たに発見された AhR の癌抑制因子としての働きと免疫現象における役割及び他の受容体型転写因子との相互作用について研究している。今回はβ-カテニンのユビキチン化による癌抑制作用について APC との関係及びPai2の発現を介した抗炎症性因子としての AhR の働きについて報告する。

#### A. 研究目的

APC 複合体によるβ-カテニンのユビキチン化と AhR 複合体によるユビキチン化との関係を明らかにする。AhR による Pai2 の発現調節機構を解明し、AhR の抗炎症作用における Pai2 の役割を明らかにする。

#### B. 研究方法

APC<sup>mut</sup>/、APC<sup>mut</sup>/、AhR(+/-)、APC<sup>mut</sup>/、AhR(-/-) マウスを用いて腸における癌の発生とβ-カテニン、cMyc、cyclinD1 の発現を定量 RT-PCR と免疫組織学的方法で調べて、癌の発生とこれら癌遺伝子の発現の関係を明らかにする。Pai2 の発現と機能については、Pai2 遺伝子のプロモーター配列を Luc 遺伝子に結合したリポーター遺伝子を作製し、エンハンサー領域を決める。エンハンサー領域への転写因子の結合などは Chip 法などで検討する。

#### C. 研究結果

APC と AhR の 2 つのユビキチン化・分解系の機能欠損によって安定化されたβ-カテニンの性質を検討する目的で APC<sup>mut</sup>/、APC<sup>mut</sup>/、AhR(+/-)、APC<sup>mut</sup>/、AhR(-/-) マウスを作製し、癌の発症を比較検討した。APC 遺伝子はヒトの家族性大腸ポリープ症の原因遺伝子として同定されたもので、ヒトでは大腸にポリープを発生することが知られ

ている。しかし、マウスの APC 遺伝子に変異を導入すると、小腸のみに腫瘍が発生することが報告されているが、我々の観察では回盲部にも生後 12 週目に発生し、25 週齢で 100%腫瘍が発生する。因に小腸では 7 週齢で腫瘍の発生が認められ 10 週齢でマウス当りの腫瘍数は最高値に達する。APC<sup>mut</sup>/、AhR(+/-) マウスでは腫瘍の発症は回盲部でも、小腸でも著しく早くなり、腫瘍の進行は回盲部で 5 週齢、小腸でも 2 週間位早い発症の促進が見られ、悪性度も高まっていることが分かった。APC<sup>mut</sup>/、AhR(-/-) マウスでは、この傾向がさらに強まることが観察された。β-カテニンの発現を免疫組織学的方法と免疫電気泳動法で調べると APC や AhR の各々の単独遺伝子の欠損マウスに較べて、2 重遺伝子欠損マウスではβ-カテニンのタンパク質の蓄積はさらに高まっていることが、明らかになった。β-カテニンの標的である cMyc や cyclinD1 mRNA の発現も高くなっており、回盲部や小腸における発癌の早期発生や悪性度の増加と一致していた。興味あることは、この 2 重遺伝子欠損マウスの大腸でもβ-カテニンの異常蓄積は見られるが、腫瘍の発生は見られなかった。ヒトとマウスの癌の発生場所に関する違いの原因が何であるのかは、今のところ分からない。腸内細菌などの違いによる腸内環境、腸上皮の細胞の構造、生理などの違いが考えられるが今後の研究を待たねばな

らない。この実験によって AhR と APC の欠損によって安定化、蓄積した $\beta$ -カテニンが腸の腫瘍の発生に加算的に働くことが明らかにされた。今後インドール 3-カルビノールやインドール酢酸などの天然の AhR のリガンドが $\beta$ -カテニンの分解や腫瘍の発生にどのような効果を示すのかを検討する予定である。

AhR 欠失マウスは一般に感染に弱いことが知られている。Lipopolysaccharide(LPS)をマウスの腹腔に投与すると AhR 欠失マウスは、敗血症ショックに著しく敏感になっていることが分かった。LPS を投与したマウスの血清に分泌された炎症性サイトカインの量を測定すると、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-18、IFN $\gamma$ の分泌が AhR 欠失マウスでは野性型マウスに比較して、数倍～十数倍に顕著に高まっていることが分かった。マクロファージ特異的に AhR 遺伝子を欠失したマウスでも LPS に対する感受性が顕著に亢進していることが確認されたことから、LPS による敗血症ショックに対する AhR 欠失マウスの感受性の亢進はマクロファージにおける AhR の欠失による機能欠損が少なくとも主な原因の一つと考えられた。分離した腹腔マクロファージを用いて LPS 処理によって分泌が促進されるサイトカインを TNF $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ について調べると IL-1 $\beta$ の分泌が AhR 欠失マクロファージで顕著に亢進していることが見出された。どのような遺伝子の発現が AhR の欠失によって影響を受けているかについて DNA マイクロアレイ法によって検討すると、AhR 欠失マクロファージでは GST- $\alpha$ 3、CYP1b1 などの薬物代謝酵素の発現低下が見られたが、それらと同程度に顕著に Pai2 や、Bcl2 の遺伝子発現が減少していた。これらのタンパク質は Inflammasome に働いて caspase1 の活性を阻害することによって IL-1 $\beta$ のプロセッシングを抑制し、分泌を阻害することが知られている。qRT-PCR によって Pai2 と Bcl2 mRNA の量を定量すると各々の mRNA 量が野性型に比較して AhR 欠失マクロファージでは減少していることが確認された。Pai2 遺伝子のプロモーター領域 2.73kb を Luc 遺伝子に結合したりポーター遺伝子を作製して、RAW264.7 細胞を用いてその発現機構を検討した結果、1.3kb

～0.9kb 領域に NF- $\kappa$ B と AhR が制御する領域を見出した。この領域には NF- $\kappa$ B の結合する配列は存在するが、XRE 配列は存在しないことから、AhR は Arnt とヘテロ 2 量体で結合して働くのではないことが示唆された。興味あることに、Arnt の siRNA を用いると NQO1 などの AhR/Arnt ヘテロ 2 量体を転写因子として必要とする遺伝子発現は低下するが、Pai2 の遺伝子の発現は低下しないことが分かった。この結果は AhR が Arnt なしに遺伝子の活性化に関与することを示している。Chip 法によって DNA 上への転写因子のリクルートを調べてみると 0.9kb～1.3kb の領域が NF- $\kappa$ B と AhR の結合するサイトで、NF- $\kappa$ B は LPS によって核に移行するが、AhR がいないと DNA に結合しないことが分かった。このことは Pai2 の遺伝子発現には Arnt が必要ではないことを示しているが、Arnt のマクロファージ特異的欠失マウスを用いた LPS による敗血症ショックの実験でも Arnt が関与していないことが確かめられた。

#### D. 考察 & E. 結論

AhR がリガンド依存的に $\beta$ -カテニンのユビキチン化・分解に関与しており、腸においては、APC による $\beta$ -カテニンの分解系と少なくとも 2 つの系で $\beta$ -カテニンの分解による量的調節に働いていることが明らかになった。AhR はリガンドによって核に移行し、Arnt とヘテロ 2 量体を形成し、Cul4B、DDB1、TBL3、Roc1 などと複合体を形成し E3 ユビキチンリガーゼとして働くことが予想され、一方 APC は細胞質にあって Axin、CK1、GSK3 $\beta$ と複合体を形成し、 $\beta$ -カテニンのリン酸化によって、続く Fbw1、Skip1、Cul1、Roc1 複合体による E3 ユビキチンリガーゼ反応を促進すると考えられている。 $\beta$ -カテニンの量的調節は少なくとも 2 つのユビキチン化反応系が、各々核と細胞質で独立して働くことによって行なわれると考えられる。もしこの 2 系が独立に働くならば、APC などの変異によって $\beta$ -カテニンが蓄積しても AhR のリガンドによって AhR のユビキチン化の系が活性化されて、 $\beta$ -カテニンの量が減少されれば腫瘍の発生が抑えられることが予想される。実際に APC<sup>mut</sup>/マウスで見られる $\beta$ -カテ

ニンの蓄積は AhR のリガンドの投与によって減少することが見られ、腫瘍発生の抑制が見られることが予備実験より分かって来た。今後の研究によって、この結果を確かめて行きたい。また、AhR 欠失による易炎症性は、炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$ の分泌を抑制している Pai2 と Bcl2 の発現低下によることが明らかになった。Pai2 遺伝子の発現に関わる AhR の作用メカニズムは、Pai2 遺伝子の 0.9–1.3kb の領域に NF- $\kappa$ B と AhR が結合する場があって、NF- $\kappa$ B と AhR が転写活性化に働くことが分かった。この時に Arnt は必要ではないことから、AhR は新しいメカニズムで Pai2 遺伝子の転写活性化因子として働くことが示唆された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 1) 書籍

なし

#### 2) 雑誌

Ikuta T, Namiki T, Fujii-Kuriyama Y, Kawajiri K. AhR protein trafficking and function in the skin. *Biochem Pharmacol.* (2008)

Ohtake F, Fujii-Kuriyama Y, Kato S. AhR acts as an E3 ubiquitin ligase to modulate steroid receptor functions. *Biochem Pharmacol.* (2008)

Kimura A, Naka T, Nohara K, Fujii-Kuriyama Y, Kishimoto T. Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**, 9721–9726 (2008)

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.* **73**, S290–294 (2008)

Baba T, Shima Y, Owaki A, Mimura J, Oshima M, Fujii-Kuriyama Y, Morohashi KI. Disruption of aryl hydrocarbon receptor (AhR) induces regression of the seminal vesicle in aged male mice. *Sex Dev.* **2**, 1–11 (2008)

Ohtake F, Baba A, Fujii-Kuriyama Y, Kato S. Intrinsic AhR function underlies cross-talk of dioxins with sex hormone signalings. *Biochem Biophys Res Commun.* **370**, 541–546 (2008)

Hosoya T, Harada N, Mimura J, Motohashi H, Takahashi S, Nakajima O, Morita M, Kawachi S, Yamamoto M, Fujii-Kuriyama Y. Inducibility of cytochrome P450 1A1 and chemical carcinogenesis by benzo[a]pyrene in AhR repressor-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun.* **365**, 562–567 (2008)

Oshima M, Mimura J, Yamamoto M, Fujii-Kuriyama Y. Molecular mechanism of trans-criptional repression of AhR repressor involving ANKRA2, HDAC4, and HDAC5. *Biochem Biophys Res Commun.* **364**, 276–282 (2007)

Matsumoto Y, Ide F, Kishi R, Akutagawa T, Sakai S, Nakamura M, Ishikawa T, Fujii-Kuriyama Y, Nakatsuru Y. Aryl hydrocarbon receptor plays a significant role in mediating airborne particulate-induced carcinogenesis in mice. *Environ Sci Technol.* **41**, 3775–3780 (2007)

Kawajiri K and Fujii-Kuriyama Y, Cytochrome P450 Gene Regulation and Physiological Functions mediated by the Aryl Hydrocarbon Receptor, *Arch. Biochem. Biophys.* **464**, 207–212 (2007)

Ohtake F, Baba A, Takada I, Okada M, Iwasaki K, Miki H, Takahashi S, Kouzmenko A, Nohara K, Chiba T, Fujii-Kuriyama Y and Kato S, Dioxin receptor is a

ligand-dependent E3 ubiquitin ligase, *Nature* **446**, 562-566 (2007)

Goryo K, Suzuki A, Carpio CA, Siizaki K, Kuriyama E, Mikami Y, Kinoshita K, Yasumoto K, Rannug A, Miyamoto A, Fujii-Kuriyama Y, Sogawa K. Identification of amino acid residues in the Ah receptor involved in ligand binding. *Biochem Biophys Res Commun.* **354**, 396-402 (2007)

Sagredo C, Ovrebo S, Haugen A, Fujii-Kuriyama Y, Baera R, Botnen IV, Mollerup S. Quantitative analysis of benzo[a]pyrene biotransformation and adduct formation in Ahr knockout mice. *Toxicol Lett.*, **167**, 173-182 (2006)

Sekine H, Mimura J, Yamamoto M, Fujii-Kuriyama Y. Unique and overlapping transcriptional roles of Arnt (Arylhydrocarbon receptor nuclear translocator) and Arnt2 in xenobiotic and hypoxic responses. *J Biol Chem.*, **281**, 37507-37516 (2006)

## 2. 学会発表 (発表誌名、巻号、ページ、発行年も記入)

Yoshiaki Fujii-Kuriyama, "Molecular mechanisms of

AhR function in physiological and toxicological processes" 11th SAC Seminar New Trends in Chemical Toxicology, Danilovskaya Hotel, Moscow 22-25 September 2008

大竹史明、岡田麻衣子、西川亜美、藤井義明、加藤茂明、リガンド依存性転写因子はユビキチンリガーゼ複合体として機能する。第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月9日-12日、神戸ポートアイランド

大島基彦、三村純正、関根弘樹、山本雅之、藤井義明、SUMO化によるAhRを介した転写抑制機構の制御、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月9日-12日、神戸ポートアイランド

## H. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

14. CYP 遺伝子発現を制御する SXR、CAR、AhR 等の薬物受容体と  
免疫系制御因子 NF $\kappa$ B の相互作用の分子解明

研究分担者 西川 淳一 武庫川女子大学 薬学部 衛生化学研究室 教授

**研究要旨**

微生物感染やアレルギーにより免疫系が活性化された状態と平常時との化学物質の体内動態の違いを明らかにすることを目的に研究を行っている。昨年度までに、細菌感染のモデルとしてリポ多糖を投与したマウスで、SXR の標的遺伝子である CYP3A11 の mRNA 誘導が抑制されることを明らかにした。今年度は引き続き、AhR と CAR の標的遺伝子を調べたところ、Benzo[a]pyrene による CYP1A1 と CYP1A2 の発現誘導、及び TCPOBOP による CYP2B10、CYP2C29、CYP2C55 の発現誘導がリポ多糖投与により顕著に抑制されることが分った。さらに、培養細胞系で免疫系制御因子 NF $\kappa$ B を過剰発現させたところ、薬物受容体の転写活性化能が抑制されることが分った。

**A. 研究目的**

化学物質に対する感受性が、発生段階や病態など受け手側の状態によって変化することは以前からよく知られている。本研究課題では、このうち、微生物感染などで免疫系が活性化された状態での薬物代謝酵素 cytochrome P450 (CYP) 遺伝子の発現変動を調べている。薬物代謝酵素は体内での化学物質の構造変化を担っており、物質の極性化による排泄促進や代謝活性化を行うので、化学物質の毒性を含めた作用発現を考える上で重要な因子である。CYP は基質特異性の異なる数多くの分子種から成り、化学物質によって誘導される CYP 分子種も異なっている。例えば、ヒトの主要な CYP 分子である CYP3A4 は薬物受容体の SXR によって誘導されるし、同様に CYP2B6 は CAR によって、CYP1A2 は AhR によって発現誘導される。そこで、本研究では、細菌感染のモデルとしてリポ多糖 (LPS) を投与したマウスを用いて、SXR、CAR、AhR 標的遺伝子の発現誘導を調べた。さらに、そのメカニズムを解明する目的で培養細胞を用いて NF $\kappa$ B との相互作用の解析も行った。

**B. 研究方法**

細菌感染モデルマウスでの CYP の発現

化学物質としては、AhR のリガンドとして

Benzo[a]pyrene (100 mg/kg) を、CAR のリガンドとして TCPOBOP (3 mg/kg) を、PXR (SXR のマウスオルソログ) のリガンドとして Pregnenolone-16 $\alpha$ -carbonitrile (50 mg/kg) を用いた。BALB/c 系雄マウスに LPS (1 mg/kg) を腹腔内投与して免疫系を活性化した後、3 時間後に化学物質を腹腔内投与した。さらに、21 時間後に LPS (1 mg/kg) を再び投与して、その 3 時間後に肝臓から RNA を抽出し、各種 CYP 遺伝子の発現量をリアルタイム PCR で調べた。

RNA の抽出と cDNA の合成

肝臓をセパゾール RNA I super (ナカライテスク) 中でホモジナイズして、total RNA を抽出した。得られた total RNA を鋳型として、PrimeScript RT reagent Kit (タカラバイオ) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を作製した。

Real-time PCR

SYBER Primer Ex Taq II (タカラバイオ) を用い、初期変性後(95 $^{\circ}$ C,10sec)、各々のプライマーに応じたアニーリング温度で PCR を行った。定量は ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems)を用いて行った。

SXR、CAR、AhR の転写活性化能の測定

10% FBS を添加した EMEM 培地中、37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件で培養した肝腫瘍細胞株 HepG2 を、遺伝子導入 24 時間前に、96 穴細胞培養プレートに移した。この細胞に、AhR、CAR 又は SXR 発現プラスミドをルシフェラーゼレポータープラスミドと共に、FuGENE6 (Roche) を用いて遺伝子導入した。24 時間後に、Benzo[a]pyrene、TCPOBOP 又は Rifampicin を添加し、24 時間後に細胞を溶解させ、ルシフェラーゼ活性を測定した。また、遺伝子導入効率を補正するために、β-galactosidase 発現プラスミドも同時に遺伝子導入し、その活性を測定した。

### C. 研究結果

#### LPS 投与による CYP 遺伝子の発現抑制

生体に外来異物が吸収されると、それを代謝・排泄するために多種類の CYP 酵素が誘導される。この CYP 誘導は、薬物受容体の SXR (マウスでは PXR)、CAR、AhR が遺伝子からの転写量を外来異物依存的に上昇させることによって起こることが知られている。前年度までの実験で、PXR によって発現誘導される CYP3A11 が LPS 投与によって阻害されることを明らかにした。そこで、今年度は他の薬物受容体のリガンドを用い、対応する CYP 分子種誘導への影響を検討した。

その結果、AhR が制御していると考えられる CYP1 ファミリー (CYP1A1 及び CYP1A2) についても、同様の傾向が認められた (Table1, Fig.1)。即ち、通常のマウスでは Benzo[a] pyrene を投与することにより CYP1A1 や CYP1A2 の発現誘導が認められるが、LPS で免疫系を活性化させておいたマウスでは CYP 誘導が顕著に抑制された。

また、CAR が制御していると考えられる CYP2 ファミリーでは、今回測定した CYP2B10、CYP2C29、CYP2C55 については同様の傾向が認められた (Table2, Fig.2)。しかし、CYP2D22 に関しては、LPS で発現抑制が認められるものの、TCPOBOP では誘導されておらず、その発現誘導に CAR が関与していない可能性も示唆された。

#### NFκB による薬物受容体転写活性化能の抑制

マウスを用いた動物実験で、グラム陰性細菌

の細胞壁構成成分である LPS を投与することにより、CYP の発現誘導が阻害されることが明らかとなった。細菌が感染すると、細胞膜上に存在する TLR4 が LPS を認識し、そのシグナルが細胞内に伝えられる。細胞内では、免疫系のマスターレギュレーターである NFκB と複合体を形成していた IκB がリン酸化を受け分解される。こうして自由になった NFκB は核内に移行して、IL-1 や IL-6 などのサイトカインの発現を誘導して免疫系を活性化させると考えられている。このようなスキームの中で、LPS 刺激がどこで薬物受容体の活性を抑制しているのかを明らかにするため、培養細胞系を用いて検討を行った。

これまでの実験で、NFκB のサブユニットの一つである p65 を強制発現させると NFκB の活性が上昇することが分っている。そこで、肝腫瘍細胞株である HepG2 細胞に p65 を遺伝子導入し、薬物受容体の転写活性化能に与える影響を調べた。その結果、p65 の量依存的に AhR や CAR による転写活性化が顕著に抑制された (Fig. 3, 4)。このことは、免疫系制御因子である NFκB が何らかのメカニズムで薬物受容体に働きかけ、その転写活性化能を制御していると考えられる。

### D. 考察

生体に吸収された化学物質は一連の代謝反応によって極性化され、排泄される。化学物質の生体への毒性は、その化学物質に対する作用部位の感受性と濃度によって決定されるが、作用部位濃度がその毒性を決める最重要因子となる場合も多く、代謝は化学物質の毒性を考える上で欠かせない因子の一つである。この代謝過程には CYP をはじめとして、第 II 相反応を担う抱合酵素など多くの酵素が関わっている。中でも CYP により触媒される代謝過程は、化学物質の極性化の第一段階の反応であり、また、生体からの消失における律速段階となっている。これまでに、ヒトにおける CYP は 40 種以上の分子種が同定されているが、異物代謝に関与する CYP は適応酵素に属し、基質により生合成の誘導が起こる。

本研究では、この CYP 誘導に及ぼす免疫系の

影響を調べているが、前年度に CYP3 ファミリーについて検討を行い、本年度は CYP1 ファミリーと CYP2 ファミリーについて実験を行った。その結果、全ての CYP ファミリーについて、免疫系の活性化が抑制的に働くことが分った。このことは、感染症やアレルギーにより免疫系が活性化された人では、化学物質の代謝が抑制され、より強く毒性が現れる可能性を示唆している。

## E. 結論

動物実験により、免疫系が活性化された状態での薬物代謝酵素の誘導を調べた。その結果、Benzo[a]pyrene による CYP1 ファミリーの誘導も、TCPOBOP による CYP2 ファミリーの誘導も LPS 投与によって有意に阻害された。さらに、この現象には NFκB、AhR、CAR、SXR などの転写調節因子が重要な働きを果たしているとの証拠を得た。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Takahashi M, Kanayama T, Yashiro T, Kondo H, Murase T, Hase T, Tokimatsu I, Nishikawa J, Effects of coumesterol on lipid and glucose metabolism as a farnesoid X receptor ligand. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*372: 395-399 (2008)

Kamata R, Shiraishi F, Nishikawa J, Yonemoto J, Shiraishi H. Screening and detection of the in vitro agonistic activity of xenobiotics on the retinoic acid receptor. *Toxicol. In Vitro.* 22: 1050-1061 (2008)

### 2. 学会発表

西川淳一: 有機スズ化合物による内分泌攪乱作用の分子メカニズム 第 17 回環境化学討論会、抄録集、p84、2008

片岡裕美、木村仁美、後藤真理、林本玲枝、山下邦彦、桑原佐知、西川淳一、扇間昌規、市川

厚: VA 誘発アレルギーマウスにおけるストレス関連遺伝子の発現変動 日本薬学会第 128 年会、要旨集 3、p132、2008

H. 知的財産所有権の出願・登録状況  
なし

Table1. LPS及びB(a)P 投与が 遺伝子発現に及ぼす影響

Gene	control	LPS	B(a)P	LPS+B(a)P
cyp1a1	1	0.1	276.7*	125.5
cyp1a2	1	0.04	6.6**	1.1**
AhR	1	1.9	3.6	2.5
TNF $\alpha$	1	4.4*	0.7	2.4

n=3, \*, p<0.05, \*\*, p<0.01 vs controls, ++, p<0.01 vs B(a)P, Tukey-Kramer's Analysis

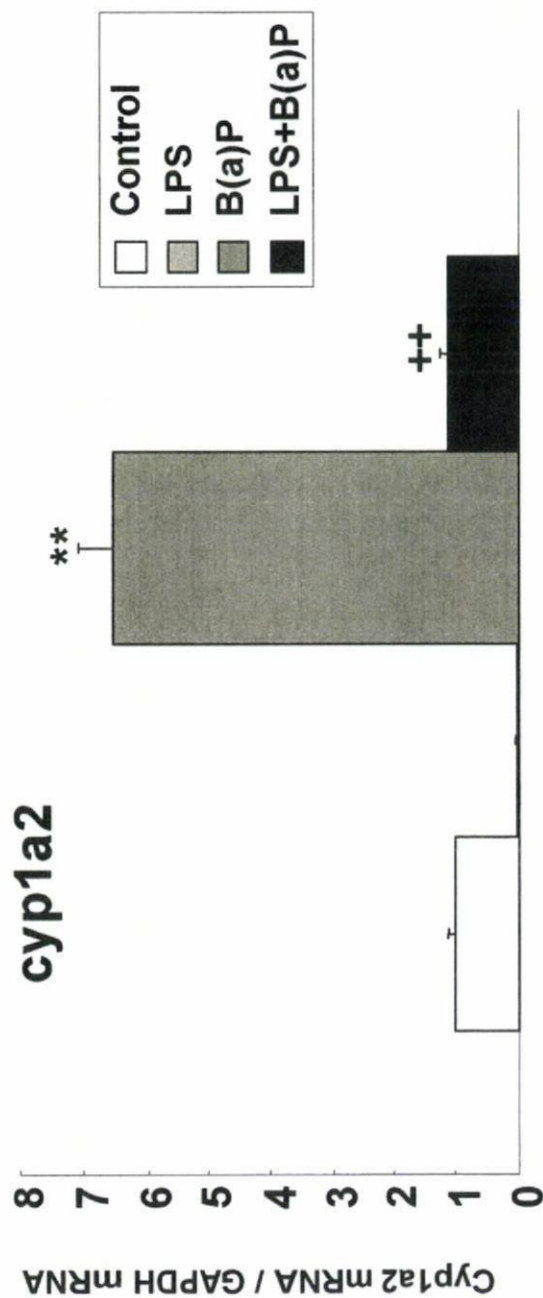


Fig.1. LPS が cyp1a2 発現誘導に及ぼす影響

Mean+S.E., n=3, \*\*, p<0.01 vs controls, ++, p<0.01 vs B(a)P



Table2. LPS 及び TCPOBOP 投与が遺伝子発現に及ぼす影響

Gene	control	LPS	TCPOBOP	LPS+TCPOBOP
cyp2b10	1	1.9	247.2*	140.6***
cyp2c29	1	0.02	3.9**	0.99**
cyp2c55	1	0.02	1387.7**	66.9**
cyp2d22	1	0.2**	0.5*	0.4*

n=2-3, \*, p<0.05, \*\*, p<0.01 vs controls, ++, p<0.01 vs TCPOBOP, Tukey-Kramer's Analysis

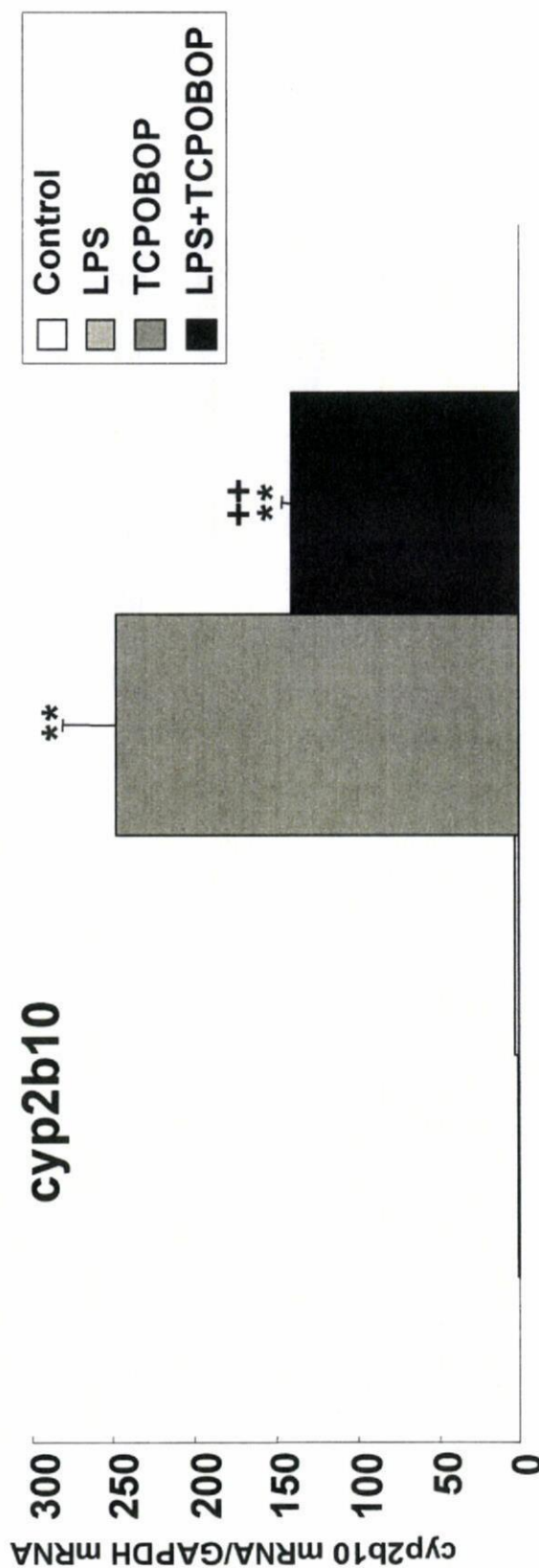


Fig.2. LPS が cyp2b10 発現誘導に及ぼす影響

Mean±S.E., n=3, \*\*, p<0.01 vs controls, ++, p<0.01 vs TCPOBOP

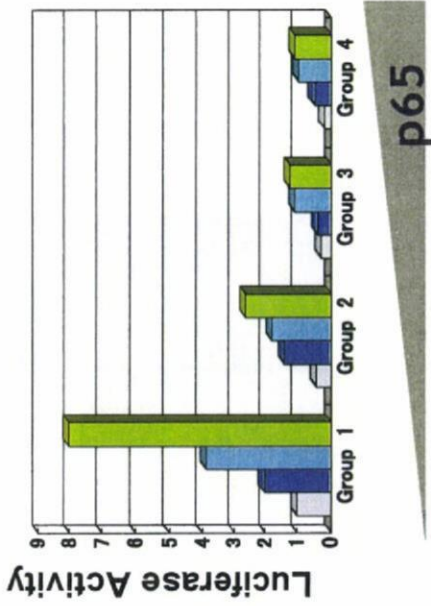


Fig.3. p65(NFκB subunit) がAhR/Arntの転写活性化能に及ぼす影響

■ : control, ■ : 0.1 μM, ■ : 1 μM, ■ : 10 μM ( Benzo[a]pyrene 濃度 )

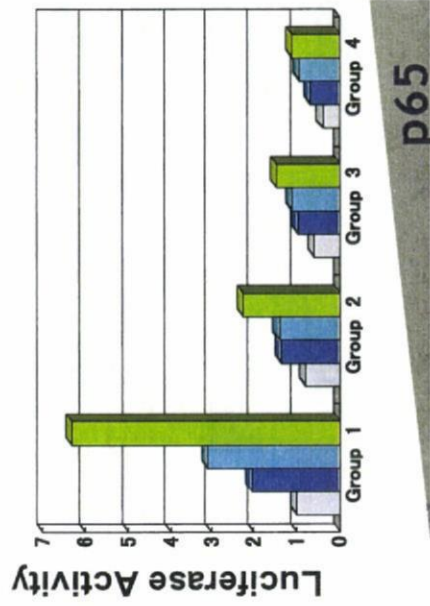


Fig.4. p65(NFκB subunit) がCARの転写活性化能に及ぼす影響

■ : control, ■ : 0.01 μM, ■ : 0.1 μM, ■ : 1 μM, ■ : 10 μM ( TCPOBOP 濃度 )

## 【小児などの高感受性集団の評価に関する国際動向調査研究】

### 15. 形態形成期への影響を中心とした研究動向に関する OECD/WHO 関連等 ハーモナイゼーション総括

研究分担者 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

本研究は、「内分泌かく乱化学物質」関連の物質の形態形成期を中心とした生体影響研究を目的としており、昨年度より新たに発足し本年度は2年目に相当する。当担当者は引き続き「OECD/WHO 関連等ハーモナイゼーション総括」との課題で、経済協力開発機構 OECD と世界保健機関 WHO で進められている試験法の開発や基礎研究の推進の課題と、本邦における内分泌かく乱化学物質(EDC)問題に関する調査・研究とが、スムーズな国際相互協調の下で推進せられるよう、当研究班を通じて必要な情報収集を行い、また、本邦としての独自の情報の発信や提案を行うことを担当している。これにあたり本年度は、昨年度も検討した、あらたに明らかになった低用量問題での今後の研究の必要性を中心に、諸情報をさらに整理し、本邦として取るべき立場を考察した。

#### A. 研究目的

本分担研究の目的は、諸国際組織における現段階での研究・調査活動の到達点を整理し、今後の課題を明らかにすることにある。すなわち、経済協力開発機構 OECD と世界保健機関 WHO で進められている試験法の開発や基礎研究の推進の課題と、本邦における内分泌かく乱化学物質(EDC)問題に関する調査・研究とが、スムーズな国際相互協調の下で推進せられるよう、当研究班を通じて必要な情報収集を行い、また、本邦としての独自の情報の発信や提案を行うことが当研究の課題である。諸国際組織の研究・調査の到達点の整理、そこでの試験法の開発等と、本邦のそれとの整合性のために必要な情報の収集と発信。(1月8日発)

#### B. 研究方法

諸国際組織における現段階での研究動向を主として文献的に整理すると同時に、内分泌かく乱化学物質問題の諸課題の到達点と今後の課題を抽出することを意図して整理した。

#### C, D. 結果と考察

欧州委員会(EC)、世界保健機関 / 化学品安全計画(WHO/IPCS)、経済協力開発機構(OECD (環境・健康・安全性部門))などを中心に、報告されている EDC 研究活動の現状をまとめた。

はじめに各機関の現状の概略を述べ、つづいて今回、特別課題とした、低用量問題に関する、あらたに明らかになった今後の研究課題について整理した。

経済協力開発機構 OECD は、従来の枠組みに沿って、哺乳綱(VMG-mammalian)、環境生物(VMG-eco)、非動物試験(VMG- Non-Animal)の3分野から各種の試験法の開発を進めている。ここでは、本邦をリード国とした試験法、子宮腫大反応法のバリデーションが進んでいる他、ハーシュバーガー法、試験管内試験法、さらには環境生物試験法の開発が進展している。

世界保健機関 WHO では、2002年のグローバル・アセスメントの出版をもって一区切りをなし、その後の内分泌かく乱化学物質問題の対象をこどもの問題に集約して、その一環として検討を進めている。

米国の内分泌かく乱研究諸組織の中では、昨年末から今年に掛けて、NIEHS (National Institute of Environmental Health Sciences)によって、ビスフェノールAに関する2つの評価、すなわち CERHR (Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction)による専門家パネル会議と、NIEHSのスポンサーによる研究者グループによるワークショップとがそれぞれ提示された。両者の論旨内容には乖離が見られるが、その比較は単純ではない。ただし、注目される点は、胎児期や小児発達期の低用量ビスフェノールA曝露の、後年の神経行動へ影響で両者の見解が一致していることである。

**特別課題：** あらたに明らかになった低用量問題での今後の研究課題

すでに見たように、低用量問題は、従来の試験法が対象としていた毒性と異なった生体障害機構に基づくことが次第に明らかになってきた。それは、従来の化学物質が、直截的には生体分子の酸化や還元、DNAや脂質など高分子への付加体形成や架橋形成といった主として化学反応を基礎とした直接的構造変化で説明される影響に主眼を置いて試験・評価されてきたのに対して、内分泌かく乱化学物質では、むしろ生体内分子の変質、壊変を直接的な要因としない、低用量であるがゆえに生体の通常調節レベル下で進行する生理的シグナルの、これまで想定されてこなかった持続的かつ可逆的な調節不全であったということが出来る。これを毒性や傷害と一線を画し、“かく乱”という概念を導入して、その違いの理解を促したグローバルアセスメントにおける定義は、いかにも炯眼であったと云わねばならない。以上のような視点に立って、最後に、この10年間の低用量問題に関連する研究で新たに明らかになり、今後、特段の取り組みの求められている留意点について、特筆すべき主なものをとりあげて整理しておきたい。

## 1. あらたに見いだされる低用量での生体影響

毒性学における諸試験では、高用量の反応から直線回帰によって、低い用量での反応性を予測するのが一般的である。低用量作用が次第に明らかに成りつつある内分泌かく乱化学物質の作用曲線について、無作用量以下の低用量域で、外挿表徴型と異なった反応がないかについては、早くから議論があった。そして実際に既存のデータを整理すると、従来、無作用量とか、無毒性量と定めた用量よりさらに低い用量で、さまざまな所見が観察されることが分かってきた。

なぜ内分泌かく乱化学物質が、従来型の用量反応関係をとらず、U字型や逆U字型の反応曲線をとったり、非常に低用量レベルでの特異的反応を示したりするのかについては、当初、そのこと自体に疑念を投げかける声も少なくなかった。しかし様々の交差反応性ネットワークを形成する受容体群やコ・ファクター群での、至適の用量相関変域がしばしば相互にずれていたりすることや、用量の増加とともに受容体反応が飽和に達し不応状態になるといった現象が明らかにされるに伴って、問題点が整理され、そうした反応曲線への理解が急速に進んでいる<sup>1)</sup>。

かくして理解のギャップの埋められた事柄は少なくないが、他方この領域には、まだ人類の未知にとどまる事柄も多そうである。米国のEPAに所属する国立環境影響研究所(NIEERL)ではこの点を重視して、これまでのタイムラインよりも、より長期的な展望をもった基礎的研究課題を設定して、この問題の検討を続けている<sup>2)</sup>。

**2. 低用量域で観察される確率論的な生体反応**  
低用量影響には、種々の試験法を適用すると、しばしば実質的な反応データとして認識されず、いわばノイズのような結果が見られることが稀ではない。低用量変化は頻度も低く、平均値をとるとしばしば背景データに隠れてしまうことが稀でないからである。これに対して、似たような現象が、例えばフェノバルビタールによるメチル化の結果から見いだされている。ミシガン州立大学のグッドマン(Jay Goodman)のフェノバルビタールによるメチル化という化学変化の形成確率は、これを平均すると実験群は対照群

と差異が認められなかったが、ネズミ一匹毎に検出してみると、対照群と違って、個体毎に大きく異なった値が観察された<sup>iii</sup>。こうしたフェノバルビタールによるメチル化はエピジェネティックな変化と呼ばれ、ここで認められた低用量におけるメチル化は確率論的に形成され、純系動物でも個体毎に同じ結果には成らない。エピジェネティック変化としてはクロマチン濃縮、ヒストン修飾、DNAメチル化など様々な修飾が取り上げられるが、内分泌かく乱化学物質における低用量反応を、こうしたエピジェネティックな現象として理解する考え方が急速に進展している<sup>iv</sup>。この領域での今後の研究の進展を注視する必要がある。なお、こうしたエピジェネティックな変化がゲノムにインプリントされて、継世代変化として固定されてゆく可能性も現実の問題として論じられている<sup>vii</sup>。

**3. 高感受性期—胎生期・新生児期・思春期の問題** 形態形成期、すなわち機能的安定性の成立する前の、胎生期での影響に関して、無視できない不可逆的な事象が指摘されていることは前述した<sup>vii</sup>。胎生期・新生児期・思春期問題には、低用量問題とのリンクを示すデータが少なからず見いだされており、グローバルアセスメントでも指摘された通り、新生児では、系によってはそれが不可逆反応として観察される<sup>viii</sup>。

これに対して、遺伝子改変動物などによる過剰反応系動物でのみ検出され、野生型の成体で検知されない用量レベルにおける“新しい概念の影響”として、① 閾値問題、② 非線形の用量相関、あるいは③ 相加反応などの問題を見直す必要性に注目する考え方もある。内分泌かく乱化学物質の危惧の指摘された物質の生体影響研究では、影響メカニズムの解明が困難にもかかわらず、確認や追試の必要の生じることが少なくない。これに伴って、経過を追った系統的な情報収集の継続が必要である。

また、グローバルアセスメントでは触れられなかったが、性に関するホメオステシスの不安定な“思春期”についての、研究も、もっと注目されるべきと考えられる<sup>4</sup>。臨界期への暴露

が与える影響の評価基準は、いまだ定まっていない。思春期の早発傾向を示唆する報告も認められ、今後の研究が求められている。

**4. 低用量レベルでの発がんの蓋然性** 2006年11月、米国ノースカロライナ州で、ビスフェノールAのヒトの健康影響に関するリスクの評価のための、環境影響、試験管内試験、および動物実験結果相互の関連を検討する専門家会議が開催された。そこでは内分泌かく乱化学物質によってがん(癌)が起こりやすそうな体内環境の形成される可能性について、今後の検討が必要とのまとめになっている<sup>ix</sup>。最近、女性ホルモンとダイオキシン類のひとつが、正常のmycという遺伝子と協同して、細胞を無限増殖へ導くテロメラーゼという酵素の活性を引き上げる<sup>x</sup>、という報文も発表されている。試験管内実験であつてさらなる検討が必要であるが、こうした変化は、がん化の促進(プロモーション)につながる蓋然性を意味しているとも考えられるので、いずれにしてもこの方面での早急な検証が求められている。

内分泌かく乱化学物質の性質の1つとして、早期に思春期を発来させる可能性、とか、早期の老化を引き起こす可能性などの危惧も指摘されてきた。ビスフェノールAによる結果では、投与した動物の寿命曲線が、対照に較べて死亡が早期化し、傾きも急峻になる傾向があることが知られている。その真偽についてはまだ検証を要するが、これが正しいとすると、先に紹介した生殖リスク評価センターCERHRの判断とも乖離する結果となるので、これについても更なる検討が求められる。

**5. 内分泌器官の拡張** この10年間に、従来、内分泌器官と呼んできた臓器以外にも、内分泌器官としての役割を果たしている組織が新たに見いだされてきた。膜受容体も広くそのカテゴリーに含まれる発見であつた<sup>xii</sup>。この発見は、オルファニデスらによって指摘されていた核内受容体で説明の困難だった、遺伝子機能を介さない即時性のノンゲノミック(non-genomic)な反応

機構にもとづくホルモン様作用<sup>xiii</sup>の理解を助ける役割を果たした。さらに細胞内小器官である小胞体の膜にもエストロジェン受容体(ER)が局在し<sup>xiv</sup>、急峻な反応に対応することが明らかになってきた。これらの発見は、内分泌かく乱問題における、現状で未知の要因の存在を念頭に置いた検討を進めることの意義を喚起した。加えて肝臓とか、脂肪細胞とか、同じく内分泌器官と考えてこなかった臓器が、内分泌器官としての役割を果たしていることも明らかになってきた。例えばノニルフェノールという物質は、通常の方法で見ると極く弱い女性ホルモン様の作用をもっているが、肝臓に注目すると、女性ホルモンよりも、ずっと強い活性を持っていることが、井口らによって明らかになっている。この件は、肝臓を、内分泌器官と考えるべきか、という問題につながるが、こうした認識の変化についても今後の検討が求められる。脂肪織についても同様のことが指摘されている<sup>xv</sup>。イボニシのような環境生物での内分泌かく乱の知られる有機スズが脂肪織産生を引き起こすことや、それらの機構に核内受容体の作用が影響していることなどは、これに相当すると考えられる。かくして、同じ受容体結合能を有するリガンド物質が、広範な標的受容体シグナル機構、さらにはまったく異なったフェノタイプに関わるコ・ファクターなどと相互作用を惹き起こすなど、先頃までの認識を書き換える驚くべき関係が浮かび上がってきている。

**6. 内分泌機能の概念の拡張** 内分泌器官の拡張のみならず、内分泌器官そのものの概念を変える事象も見いだされている。異物受容体と呼んでいるダイオキシン受容体は、エストラジオールが存在しない状態では、P300 と名付けているタンパク分子の助けで転写活性化を担って、女性ホルモン様の作用をもつことが分生研の加藤等のグループによって発見された<sup>xvi</sup>。しかもここでは、エストラジオールがあるときは、この分子は、反対にユビキチン・リガーゼ(Ubiquitin ligase)とよぶ複合体を形成し、エストロジェン受容体を壊して、抗女性ホルモン様の役割を發揮

することも分かった<sup>xvii</sup>。これは、ホルモン受容体でもない、異物受容体と呼ばれる生体内分子が、ホルモン様の作用を交差性に發揮するというものであり、内分泌かく乱問題の分子的基盤が、概念的に大きく拡大していることを意味している。この問題の生体影響面での大きさを認識する上で、この発見が内分泌かく乱化学物質の今後の生体影響研究に果たす役割には注目を要する。

## E. 結論

内分泌かく乱化学物質問題が取り上げられるきっかけになったことそのものは、化学物質のヒトや野生生物の生殖や内分泌機能への危惧にあった。やがてその可能性の原点がホルモン作動性の化学物質の低用量での影響にあるものとの認識に近づいた。しかしこれは従来の試験法では有害性が観察(=検出)されないなど、その基礎となるメカニズムがなかなか明らかにならなかった。

すでに見たように、これが従来の試験法で観察されなかった背景は、この低用量問題が、従来の試験法が対象としていた毒性と異なった生体障害機構に基づくものであったことによる。すなわち、従来の化学物質の毒性では、いわば、生体分子の酸化や還元、あるいはDNAや脂質などの高分子への付加体形成や架橋形成、などといった、主として生体物質の変質、壊変といった化学反応を基礎とした器質的構造変化に主眼をおいて、試験と評価がなされてきた。しかしこれに対して内分泌かく乱化学物質では、一般的性質としては生体内分子の変質や壊変といった構造異常は乏しく、むしろ曝露影響は、低用量であるがゆえに通常の生体の生理的調節水準下での微視的機能変化として進行し、次第に持続的調節不全に至る生体異物相互作用の調節異常に基づいている。すなわち機能不全の検出されない潜在性障害機構を背景としていた。

この問題の初期、胎生期のような初期形態形成期や、小児の生殖器系での二次性徴の形成期に限局して、内分泌かく乱現象が稀少な確率論的データとして報告された。これらはいずれも

以上のような背景と結びついていたものと考えられる。今回見るような、フィードバック機構や可逆性の効く範囲の、むしろ低用量短期曝露にあってはじめて惹き起こされ、高用量では検出されないような毒性は、これまでの毒性試験では想定されて来なかったものである。低用量のビスフェノールAの胎児期曝露が、生後の神経行動系の情動異常を惹き起こす可能性が指摘されているだけに、早期の試験系の開発が期待されるが、低用量ビスフェノールAの項でも見たとおり、出版されたばかりの Rochelle W. Tyl らによるビスフェノールAの2世代試験でも、(比較的用量域を含む試験であったにも拘わらず)何らの影響も認められなかった<sup>46</sup>。今回このまとめでは、Tyl らの実験結果と一連の研究で導入されている条件の違いを、持続投与によるウィンドウ効果の棄却の可能性や、被検動物の“不応性”の惹起の可能性などを推定したが、仔動物での情動障害などがエンドポイントとして観察されていないことなども乖離の原因となっている余地があり、Tyl の結果の検証のためには多くの検討が必要である。あたらしい試験系の開発は、そうした認識に立って、展望が見いだされるものと考えられる。

低用量における生体異物相互作用の調節不全は、内分泌かく乱化学物質問題を契機として見いだされた、これまでの毒性学の標的になかった、あたらしい概念の“毒性現象”であり、従来の毒性学の方法論で解決し難い独自の研究課題を内包している。例えばこれらの調節不全を原理とした有害性では、通常生体機能調節が、生理的範囲から異常状態に移行する境界が、振幅の中の変化のような、線引きの困難な毒性学が未経験の境界を含んでいる。そうした境界には直接的な構造異常も即時的な機能異常も伴っていないと考えられるだけに、これを裏付ける生体分子シグナル機構の、より詳細な研究が必須となる。こうした事柄は、あたらしい毒性学が求められる課題の一例にすぎない。内分泌かく乱化学物質問題によってはじめて見いだされたこのあたらしい生体障害の概念は、当初の想定を超えて、生体調節障害の全域に及ぶ課題の

拡がりを内包している。“化学物質の生体調節障害”という課題を対象としたあたらしい毒性学の確立のためには、さらなる概念の構築・整理と、対応する試験法の樹立が一層確かなものとなる必要がある。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

井上 達. 内分泌かく乱化学物質研究の世界的動向. *Biophilia* 4:8-12, 2008.

Nakazawa T, Kurokawa M, Kimura K, Wakata A, Hisada S, Inoue T, Sagami F, Heidel SM, Kawakami K, Shinoda K, Onodera H, Kumagai Y, Ohno Y, Kawamura N, Yamazaki T, Inoue T. Safety assessment of biopharmaceuticals: Japanese perspective on ICH S6 guideline maintenance. *J Toxicol Sci* 33:277-282, 2008.

Nakae D, Onodera H, Fueki O, Urano T, Komiyama N, Sagami F, Kai S, Nishimura C, Inoue T. Points to consider on the non-clinical safety evaluation of anticancer drugs. *J Toxicol Sci* 33:123-126, 2008.

Inoue T, Kodama Y. Future alternatives in “3Rs”: Learning from history. *Alternatives to Animal Testing and Experimentation* 14:257-260, 2008.

### 2. 学会発表

井上 達、壺井 功、北田邦夫、五十嵐勝秀、児玉幸夫、菅野 純、吉田和子、平林容子. マウス放射線誘発骨髄性白血病の遺伝子発現プロファイルの確率論的特異性: 自然発症白血病との比較. *BMB2008* (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会) (2008.12.11) [神戸, (Meeting abstract p677; 2008)]

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 続報. 第 70 回日本血液学会総会(2008.10.12) [京都, 臨床血液 49 (9) p1141; 2008]

Inoue T, Hirabayashi Y. Gompertzian expression of the life span: Toxicological ultimate risk for xenobiotic responses. The 45th Congress of the European Societies of Toxicology (2008.10.6) [Athens, Greece, Toxicology Letters 180S, S68, 2008]

井上 達、松下智哉、五十嵐勝秀、菅野 純、平林容子: 一般口演「血液2」マウス自然発症及び放射線誘発骨髄性白血病の遺伝子発現プロフィールの主要因解析による分別遺伝子の抽出. 第 97 回日本病理学会総会(2008.5.16) [金沢、日本病理学会会誌 97: 246; 2008]

井上 達: セッション4 まとめと将来展望. 栄養補助食品国際ワークショップ 国際的視点で

考える栄養補助食品(ダイエタリーサプリメント)の精度とその科学: 国際ハーモニゼーションをめざして(2007.4.17) [横浜、(報告書 p113-119, 2007) ] Inoue T. Session 4: Conclusion and future vision. International Perspectives on Dietary Supplement Regulation (2007.4.17) [Yokohama, (Meeting abstract p113-119, 2007)]

## H. 知的財産所有権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

<sup>i</sup> Gore AC, Heindel JJ, Zoeller RT. Endocrine disruption for endocrinologists (and others). *Endocrinology* 147: S1-3, 2006. / Welshons WV, Nagel SC, vom Saal FS. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology* 147: S56-69, 2006.

<sup>ii</sup> EPA ホームページ参照。

[http://www.epa.gov/NHEERL/research/endocrine\\_disruptors/research\\_areas.html](http://www.epa.gov/NHEERL/research/endocrine_disruptors/research_areas.html) / [http://www.epa.gov/NHEERL/research/endocrine\\_disruptors/dose\\_effects.html](http://www.epa.gov/NHEERL/research/endocrine_disruptors/dose_effects.html)

<sup>iii</sup> Bachman AN, Phillips JM, Goodman JI: Phenobarbital induces progressive patterns of GC-rich and gene-specific altered DNA methylation in the liver of tumor-prone B6C3F1 mice. *Toxicol Sci* 91(2): 393-415, 2006.

<sup>iv</sup> 前出 44 の Gore et al. と同じ。(Gore AC, Heindel JJ, Zoeller RT. Endocrine disruption for endocrinologists (and others). *Endocrinology* 147: S1-3, 2006.)

<sup>v</sup> Guerrero-Bosagna C, Sabat P, Valladares L. Environmental signaling and evolutionary change: can exposure of pregnant mammals to environmental estrogens lead to epigenetically induced evolutionary changes in embryos? *Evol Dev* 7(4):341-350, 2005.

<sup>vi</sup> Li S, Hursting SD, Davis BJ, McLachlan JA, Barrett JC. Environmental exposure, DNA methylation, and gene regulation: lessons from diethylstilbestrol-induced cancers. *Ann N Y Acad Sci* 983: 161-169, 2003.

<sup>vii</sup> Miyagawa S, Suzuki A, Katsu Y, Kobayashi M, Goto M, Handa H, Watanabe H, Iguchi T. Persistent gene expression in mouse vagina exposed neonatally to diethylstilbestrol. *J Mol Endocr* 32: 663-677, 2004.

<sup>viii</sup> Rajapakse N et al. Combining xenoestrogens at levels below individual no-observed-effect concentrations dramatically enhances steroid hormone action. *Environ Health*



---

Perspect, 110: 917-921, 2002.

- <sup>ix</sup> Keri RA, Ho S-M, Hunt PA, Knudsen KE, Soto AM, Prins GS: An Evaluation of Evidence for the Carcinogenic Activity of Bisphenol A. *Reproductive Toxicology* (2007), doi:10.1016/j.reprotox.2007.06.008
- <sup>x</sup> Sarkar P, Shizaki K, Yonemoto J, and Sone H.: Activation of telomerase in BeWo cells by estrogen and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in co-operation with c-myc. *Internl J Oncol* 28: 43-51, 2006.
- <sup>xi</sup> Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 146: 624-32, 2005.
- <sup>xii</sup> Zhu H, Rice C, Pang Y, Pace M, Tomas P. Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(5):2231-6, 2003. Epub 2003 Feb 6.
- <sup>xiii</sup> Moggs JG, Orphanides G. Estrogen receptors: orchestrators of pleiotropic cellular responses. *EMBO Rep.* 2(9): 775-781, 2001/ Moggs JG, Orphanides G. Genomic analysis of stress response genes. *Toxicol Lett.* 140-141: 149-53, 2003.
- <sup>xiv</sup> Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, & Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 307: 1625-1630, 2005.
- <sup>xv</sup> Iguchi T, Watanabe H, Ohta Y, Blumberg B.: Developmental effects: oestrogen-induced vaginal changes and organotin-induced adipogenesis. *Int J Androl.* 31(2):263-8. Epub 2008 Jan 29, 2008.
- <sup>xvi</sup> Ohtake F, Takeyama K, Matsumoto T, et al. Modulation of estrogen receptor signaling by an association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423: 545-550, 2003.
- <sup>xvii</sup> Ohtake F, Baba A, Takada I, Okada M, Iwasaki K, Miki H, Takahashi S, Kouzmenko A, Nohara K, Chiba T, Fujii-Kuriyama Y, Kato S. Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature* 446: 562-566, 2007.

研究分担者 小野 敦

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総合評価研究室・主任研究官

### 研究要旨

化学物質による高次恒常性維持機構への影響に対して、発達時期にある子供や適応性の低い老人などは特に感受性が高い。特に化学物質の受容体原生による内分泌かく乱性については、ごく低用量で恒常性維持機構への作用を発現する危険があり、潜在的な影響を受ける危険性が特に高い。OECD では、化学物質による内分泌かく乱性の問題に対応するため、内分泌かく乱物質の試験・評価プログラムタスクフォース(EDTA)のもとに3つの検証グループ(VMG)を設置し、国際的な枠組みでの試験法のガイドライン化が進めている。本研究では、高感受性集団に対する有害性検出手法について、関連する国際動向の調査を行い、今後の開発方針を検討する目的で、OECD-EDTAにおける第6回VMG-NA(非動物試験検証管理グループ)会議およびED-QSARグループ会議に参加し、我が国で開発・検証が進められている手法について報告を行うとともに、諸外国における試験・評価法開発に関する国際動向の調査を行った。

本研究班で研究開発を進めている高感受性集団に対する各種の有害性評価手法について、今後も引き続き、国際化に向けた取り組みが重要である。

### A. 研究目的

近年、様々な機能を有する新規化学物質の数が増大している。それらの化学物質は微量でこれまでにない作用を有するよう設計されたものも多く、生体においては予測不可能な毒性を示す危険性が指摘されている。近代社会においては、そうした新規化学物質のみではなく様々な既存化学物質の暴露を受けることによる複合的な危険も増大している。特に化学物質による高次恒常性維持機構への影響に対しては、発達時期にある子供や適応性の低い老人などは特に感受性が高く、そうした中でも化学物質の受容体原生による内分泌かく乱性については、ごく低用量で恒常性維持機構への作用を発現する危険があり、潜在的な影響を受ける危険性が特に高い。多くの化学物質が内分泌系に関与し、ヒトおよび野生生物に有害影響を及ぼす可能性があることを示唆する科学的根拠は益々増加しており、高感受性集団への影響について検出可能な迅速で信頼できる評価系の構築が急務である。一

方で、こうした問題は我が国に限ったことではなく、その評価法開発に関しては、国際協調のもとで議論を行い将来に渡って広く有効な手法として提案、確立していくべきである。OECDでは、緊急性を要する化学物質による内分泌かく乱の問題に対応する目的で、内分泌かく乱物質の試験・評価プログラムタスクフォース(EDTA)のもとに3つの検証グループ(VMG)を設置し、各国の研究者の参加のもとで、評価・試験法の検証やガイドライン化を進めている。一方、厚生労働省においては、問題に対応するため内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会において提案された「試験スキーム」に対応する評価試験法の開発を、本研究班を始めとする研究班において進めている。本研究では、高感受性集団に対する化学物質の有害作用である内分泌かく乱性の検出・評価手法開発について、関連する国際動向の調査を行い、今後の開発方針を検討することを目的とした調査研究を実施した。

## B. 研究方法

化学物質の有害作用である内分泌かく乱性の検出・評価手法について、検証・ガイドライン化を進めるために OECD-EDTA のもとに設置された検証管理グループのうち非動物試験を担当する VMG-NA (非動物試験検証管理グループ) の第 6 回会議および併せて開催された ED-QSAR グループ会議に参加し、我が国で開発・検証が進められている評価手法について報告を行うとともに、諸外国における試験・評価法開発に関する国際動向の調査および関連する各国専門家と今後の方向性について議論した。

## C. 研究結果

化学物質による内分泌系への影響を介した有害作用について、近年では生殖系への影響のみならず、より高次の神経系や免疫系の発達や恒常性維持機能に対する影響が懸念されている。生体の恒常性維持は、健常な大人であれば順応の可能性があるが、外的変動への適応性が低い子供や老人を含む高感受性集団においては、明らかな有害影響として示される可能性が指摘されており、メカニズムの解析はもとより、高感受性集団への影響について検出可能な迅速で信頼できる評価系の構築が求められている。

厚生労働省では、この問題に対応するため内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会においてスクリーニングおよびテストの 2 段階からなる「試験スキーム」を提案し、これに適用可能な評価法について、本研究班を始めとした研究班においてこれまで様々な研究開発が進めており、すでにその成果の一部は、OECD ガイドライン化などにより国際的な提案を行ってきている。

一方、OECD では、内分泌かく乱物質について科学的知見の収集、人の健康や生態系への影響を評価するための試験法の評価・テストガイドラインの作成等ため、OECD テストガイドラインに関する検討を行う専門家会合である WNT: Working Group of National Co-

ordinators of the Test Guidelines Programme) の下に内分泌かく乱物質のための作業部会 (EDTA: Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment) を設置し、各加盟国から提案された評価手法に関する国際的な検討を進めている。さらに個別の試験法について各国専門家から構成される試験法検証グループ (VMG-NA, VMG-mammalian, VMG-eco の 3 つがある) を設置して、個別の試験法について検証やガイドライン化の作業を進めている。すなわち、内分泌かく乱物質の評価に用いられるガイドラインについては、これら VMG において検証され提案される。

本研究では、第 6 回 VMG-NA 会議およびこれに併せて開かれた ED-QSAR ワーキンググループ会議に参加して、各種スクリーニング手法の開発における国際動向の調査を行った結果について示す。EDTA では、確定のための詳細試験法だけではなく、非常に多くの化学物質について再評価する必要があることから動物を使用しない比較的安価な高速スクリーニング法の開発が重要であるとされており、VMG-NA では主に動物を使わない試験法について検証およびガイドライン化を行っている。エストロゲン受容体 (ER $\alpha$ ) レポーター測定系に関しては、我が国が中心となって進めている HeLa 細胞系のアンタゴニスト検出法バリデーション経過報告および ICCVAM (米国代替法検証センター) が中心となって LumiCell 法の国際バリデーション経過が報告された。HeLa 法のアンタゴニスト検出法については、我が国からの提案によりすでにほぼガイドライン化されており、今回の会議では、今後開発される可能性のある類似試験法についてすべて個別にガイドライン化するのではなく、試験法として要求されるパフォーマンスについてガイドライン化について議論された。そうしたパフォーマンスベースのガイドライン化は、すでにいくつかの *in vitro* 評価系において検討されており、今後のガイドライン化の提案においては考慮すべき問題である。また、HeLa 法で用いる細胞については、市販はされておら

ず、我が国の細胞バンクに寄託されており研究目的であれば自由に入手可能であるとの報告に対して、OECD ガイドラインとなれば委託試験施設における商業利用が可能でなければ問題があるのではないかと指摘があった。今後、市販されていない細胞等を用いた試験法を提案する際にはこうした問題への対応も検討しておく必要があるであろう。ER $\alpha$  結合試験については、米国 EPA が中心となって国際バリ デーション研究経過が報告された。現在、2 種類の ER $\alpha$  を用いた方法について検討が進んでいる。また、米国 EPA が中心となって進めている、H295R 細胞を使ったステロイドジェネシス試験系バリ デーションについても報告があった。

また、ED スクリーニングのための QSAR 手法に関しては、当初 VMG-NA で議論を行ってきたが、OECD では個別の QSAR のバリ デーションを行わないという決定がされて以降、VMG-NA のサブグループで主に情報交換を目的として会議を実施してきた。一方、OECD では、化学物質の毒性を既存情報をもとに効率的に評価するため、各国から提案された様々な毒性エンドポイントについての各種 QSAR ツールを収集した OECD QSAR Toolbox の整備を進めており、その第 2 期開発において、EPA で開発を進めている ER 結合予測のためのエキスパート モデルの組み込みが計画されており、そのためのレビュー会議を行うとのことであった。我が国でも「試験スキーム」におけるスクリーニング手法のひとつとして *in silico* 予測法の開発を進めており、これまでの知見をもとに EPA モデルのレビューに協力していくこととなった。

上記のみではなく、我が国は動物を用いた試験法の検証を行っている VMG-mammalian において、子宮増殖アッセイ、ハーシュバーガーアッセイ、改良 28 日間反復投与試験等の開発で多大な貢献をしており、今後、本研究班の成果についても随時、報告や提案を行っていくことが重要である。

## D. 考察

これまで内分泌系への影響を介した有害作用については、生殖器官の発生・発達過程を制御する重要な因子である性ホルモンとその類似の作用に主に焦点が当てられ議論されてきたが、近年ではより高次の神経系や免疫系の発達や恒常性維持機能に対する影響が懸念されている。高次恒常性機能への影響に対して、外的変動への適応性が低い子供や老人を含む集団では高感受性に有害影響が発現する可能性から、化学物質のリスク評価においては、そうした高感受性集団への影響についても検討する必要がある。

厚生労働省では、この問題に対応するため内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会において 2 段階からなる「試験スキーム」を提案し、本研究班を始めとして様々な観点からの研究が進められてきており、さらに、同様の取り組みはヨーロッパ諸国や米国でも進められている。一方で多くの化学物質暴露の影響を受ける現代においては、高感受性集団に対する影響の評価は急務かつ我が国に限ったことではないため、その評価法の開発は国際協調の下で行われるべきである。OECD では化学物質による内分泌かく乱の問題に対応するため EDTA および VMG を設置し検討を進めており、我が国もこれまで多くの貢献をしてきた。そうした取り組みの中で特にエストロゲン受容体をターゲットとしたスクリーニング的な手法については、ガイドライン化に向けた検証作業が進められている。一方で、内分泌系への影響を介した有害作用そのものについては、一部の現象を除き、ヒトにおける影響と内分泌かく乱のメカニズムの関連について明確な結論は得られていないため、科学的な評価を行う上で不確実な部分も多く残されており、さらには、ターゲットとなる生体の発生・発達や高次恒常性維持機構に関する生物学的な基礎の理解が不十分であることも指摘されている。化学物質の内分泌かく乱のみでなく高次機能への有害影響の評価手法を確立していくためには、その発現メカニズ