

200941003B

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

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

平成19年度～21年度 総合研究報告書

研究代表者

井 上 達

平成22 (2010) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

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

平成19年度～21年度 総合研究報告書

研究代表者

井 上 達

平成22（2010）年3月

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

目 次

I. 総合研究報告

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

資 料

分担研究報告書

1) プロジェクト課題研究

【低用量作用に関する文献調査】

高次生命系における核内受容体作動性化学物質の低用量影響に関する検討(2) …… 15  
関澤 純

【前立腺影響研究】

低用量核内受容体作動性化学物質による前立腺重量や発育などに対する  
影響に関する研究…………… 35  
杉村芳樹

【発がんの蓋然性研究】

核内受容体作動性化学物質の発がん・加齢などに及ぼす影響の  
分子メカニズムに関する研究…………… 41  
曾根秀子

2) 基盤研究

【生殖・核内受容体系】

核内受容体作動性化学物質の雌性生殖器官への作用メカニズムの解明 …… 47  
井口泰泉

核内性ステロイドホルモンレセプターによる転写制御への影響に関する研究 …… 56  
加藤茂明

ヒト骨芽細胞に対する核内受容体作動性化学物質の影響に関する研究…………… 64  
笹野公伸

【免疫・感染防御系】

核内受容体作動性化学物質の免疫担当細胞やマクロファージ、  
脂肪細胞への影響に関する研究…………… 72  
山崎聖美

低用量核内受容体作動性化学物質の免疫応答制御に及ぼす影響に関する研究…………… 76  
五十嵐美德

【中枢神経・行動系】

核内受容体作動性化学物質の海馬記憶過程に及ぼす影響…………… 79  
川戸 佳

神経系初期発生における核内受容体の機能及び核内受容体作動性  
化学物質の低用量影響に関する解析…………… 84  
菅野 純

核内受容体作動性化学物質の中枢影響に関する研究…………… 91  
粟生修司

【マイクロアレイ基盤整備】

遺伝子発現の網羅的検索とインフォマティクスの確立…………… 96  
五十嵐勝秀

II. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 103

# I. 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

総合研究報告書

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

研究代表者 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、1996年12月ロンドン郊外のWeybridgeで内分泌かく乱化学物質問題に関する最初の国際ワークショップが開催されて以来10年が経過した時点で、この問題のそれまでの蓄積と、当研究課題に先行してそれまで続けられてきた研究を総括し、一昨年、平成19年度より新たに発足し、今般3年目を終了する。

当初の研究課題として当研究班は、性ステロイドホルモンの投与が、生殖機能のかく乱、更には生殖器系腫瘍の誘発につながる旨の既知の知見に立脚し、この問題の生物学的蓋然性を基礎として、関連化学物質の生物影響の本質は、ホルモン受容体や関連する各種核内受容体と各種シグナルネットワークを介して、高次生命系機能に及ぶものとの仮説的認識に立って高次生命系各分野に分担して、3年間の研究を開始した。

研究体制の骨格としては、生体影響メカニズムの低用量効果・複合効果等に関わる重要なトピックスに焦点を当てた「プロジェクト課題研究」と、生殖・核内受容体系、免疫・感染防御系、および中枢神経・行動系の三つに係る生体統御システムとしての高次生命系、ならびにその他の核内受容体作動系を取り上げた「基盤研究」との二部構成とした。研究課題の最終年度として見込まれる成果の概略は、本文中に記載の通りであるが、特筆すべき点としては、この内分泌かく乱性核内受容体作動性の化学物質の生体影響が、人々の生活環境中の大豆イソフラボン等の食品や女性のホルモン補充療法に用いられる医療用エストラジオール等との相互作用の中で論じられるべき点、低用量領域における確率論的な生体反応を考慮すべき点、更には、女性ホルモン受容体を含む種々の核内受容体を発現する通常の内分泌器官以外の肝、脂肪織、骨組織、マクロファージなど新たに内分泌器官として概念の拡張を求められている諸組織での生体応答を考慮すべき点などが明らかになっていることをあげることができる。

研究分担者	生物学研究所生命環境研究領域 教授
栗生修司 九州工業大学大学院・生命体工学研究科 教授	加藤茂明 東京大学分子細胞生物学研究所分子生物部門 教授
五十嵐勝秀 国立医薬品食品衛生研究所 所毒性部 主任研究官	川戸 佳 東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻 教授
五十嵐美德 国立がんセンター研究所 がん宿主免疫研究室 主任研究官 (H20年度迄)	菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 一毒性部 部長
井口泰泉 岡崎国立共同研究機構基礎	

笹野公伸	東北大学大学院医学系研究科医 科学専攻病理学講座 教授	研究の基盤を支えることとした。
杉村芳樹	三重大学医学部泌尿器科学 教授 (H20 年度迄)	
関澤 純	徳島大学総合科学部 教授 (H20 年度迄)	
曾根秀子	国立環境研究所環境リスク 研究センター 主任研究員	
山崎聖美	国立健康・栄養研究所生活習 慣病研究部 主任研究員	

### A. 研究目的

本総合研究で設定した統括的目的は、1) 核内受容体作動性の生殖・核内受容体系、2) 免疫・感染防御系、および3) 中枢神経・行動系などの高次生命系における発現遺伝子シグナルのかく乱を指標として形態形成期や思春期にある高感受性集団に想定される影響について、各々の系における影響メカニズムを統一的に理解し、もって評価法の確立にむけて研究を推進することにあつた。

対象器官としては核内受容体の分布に応じて新たに肝、心、血管組織、脂肪織をはじめマクロファージ系へも対象を拡張し、実験動物におけるこれまで観察された表現型を内分泌かく乱症候群として位置づけ化学物質の惹起しうる有害性評価を念頭におきつつ安全管理へ向けての方策の確立を目指すよう留意した。またこれらの生体影響が低用量域にあつては、高用量作用のような決定論的作用を示さないことが明らかになり、エピジェネティックの応答として捉えるべき新たな認識に到達しつつあることにより、そうした面からの核酸やクロマチンの種々の修飾についても留意した研究法をすすめた。

なお、[プロジェクト課題研究]の個別課題としては、[低用量作用に関する文献調査]、[前立腺影響研究]、および[発がんの蓋然性研究]の課題をとりあげた。さらに [マイクロアレイ基盤整備]では、当研究班での相互的関連研究分野に DNA マイクロアレイ解析技術を適用することで、核内受容体作動性化学物質に関連する遺伝子の網羅的発現解析を行い、各班員の

### B. 方法

各々の課題の研究方法の概略は、以下の通りである。

[プロジェクト課題研究]の[低用量作用に関する文献調査]については、2006 年 11 月 10 日以降 2008 年 11 月 23 日までに公表されたビスフェノール A の影響報告を収集し内容を検討した (第 1~2 年度で終了)。[前立腺影響研究]については、BPA 経胎盤投与群に特徴的な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 (第 1~2 年度で終了)。[発がん蓋然性研究]については、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た。また、ヒト乳がん組織において選択的に発現している遺伝子について、定量的リアルタイム PCR により発現量を測定した。ヒト乳腺上皮の正常細胞 (HMEC) 及び (MCF7 及び MCF10A) の培養では、BPA の 1-3 日間曝露による影響を、BrdU の取り込みを指標に S 期細胞数を検討した。

[基盤研究]では、[生殖・核内受容体系]では、出生直後から 5 日間、C57BL/6 系雌マウスに DES 2.5  $\mu\text{g/g}$  bw を投与し、生後 56 日目に卵巣を摘出、生後 70 日目に Affymetrix 社の GeneChip を利用して、遺伝子発現の比較を行った後、曝露群と対照群において発現に差が見られた遺伝子について、ヒストン修飾の特異抗体を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法を行った。次に「男性ホルモン、女性ホルモンレセプターおよびダイオキシンレセプターに結合する転写共役因子複合体の同定及びダイオキシンレセプターとのクロストークの研究」では、これらレセプター群に結合する転写共役因子複合体を、生化学的に精製及びその構成因子群を同定した。また、複合体としての機能を *in vitro* 系で評価した。ダイオキシンレセプターとの機能的相互作用は、転写レベルで検討した。さらに新たな材料として脂肪細胞について細胞周期制御との関連を追及した。「ヒト骨芽細胞株及び骨芽細胞

様細胞に対する BPA 及び 3-MC の影響」については、ヒト正常骨芽細胞 hFOB 1.19 及び骨芽細胞様細胞 MG-63 におけるそれぞれの実験条件下でのマイクロアレイ解析を行った。

[免疫・感染防御系]では、「マクロファージ、脂肪組織の研究」では C57BL/6 マウスに総エネルギー比 30% (30en%) の脂肪を含むエサを与え、ビスフェノール A (BPA) 添加飲料水により、10 週間および 20 週間飼育し、肝臓、脂肪組織を中心に調べた。T 細胞分化の研究では、5 週令オスの BALB/c マウスの脾細胞を NKT 細胞特異的脂質抗原  $\alpha$ -galactosyl ceramid ( $\alpha$ -GalCer) で刺激し、同時に種々の濃度の BSA を添加して培養した際のサイトカイン産生 (IFN- $\gamma$ ) を ELISA 法で解析した。

[中枢神経・行動系]では、「ラット海馬のスライスによる神経スパインの密度の解析」では、単一神経に蛍光色素をマイクロインジェクションして可視化し、化学物質作用による神経スパインの密度の増減の画像解析を行い、「マウス胎児神経幹細胞の研究」では、C57BL/6 マウス妊娠 14.5 日の胎児より終脳を分離し、単細胞化した後、培養系における種々の検討を行った。また、「内分泌かく乱性核内受容体作動性化学物質の惹起する行動の評価研究」では、活動性や探索行動の評価にオープンフィールド試験、不安情動の評価に高架十字迷路試験、攻撃行動や警戒反応の評価に侵入者試験などを用いた。なお[マイクロアレイ基盤整備]では、各班員との共同により、DNA マイクロアレイのデータ解析を行った。

(倫理面への配慮)

各々の実験はすべて、個々の研究機関の動物実験に関する指針に準拠して行われた。

### C. D. 結果・考察

約 3 ヶ年間での本研究班からの英文国際誌への成果の発信は、4 報に及ぶ Nature や、PNAS, JBC あるいは Environmental Health Perspective などのいわゆる高い引用指数を有する学術誌への掲載論文を含む計 264

報を数えた。欧米における内分泌かく乱研究の活発な進展と対応したこのような当班からの質の高い研究成果の発信には、多くの関心が寄せられている。個々の分担研究結果の概略は、以下の通りである。

個々の結果内容としては[プロジェクト研究]では、「低用量作用に関する文献調査」と、「前立腺影響研究」は、第 2 年目までで終了としたので、年次報告を参照されたい。「発がん蓋然性研究」1 課題のみについて述べる。本課題では、昨年度までに、BPA の曝露が、用量依存的に細胞を増殖させ、特に S 期の細胞を増加させることを観察しており、さらに、HP1 gamma 陽性細胞の割合や陽性凝集体の数を調べたところ、これらには、有意な増加が認められた。併せて、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 86 個の遺伝子について、定量的リアルタイム PCR により発現量を測定したところ、投与した BPA のいずれの濃度においても曝露により増加した遺伝子は、Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2, COX-2/COX2 : 2 倍)、および Epidermal growth factor receptor (EGFR : 1.2 倍) の 2 遺伝子のみであった。この研究では、引き続き DNA のメチル化を中心としたエピジェネティックな変化の観察が行われた。これにより、BPA は、ベンゾピレンの発がん感受性を上昇させる可能性が示唆された。ヒトの乳がんの進展にかかわることが知られている BRCA1, CCNA1 及び THBS1 の高メチル化や GSTP1 の中レベルメチル化が今回の実験で観察された事により、BPA は DNA のメチル化態様をも変化させていることが示唆された。BPA の短期曝露と長期曝露での増殖能や遺伝子発現プロファイリングの違いは、曝露後の細胞回転や DNA の代謝回転の結果引き起こされる様々な、エピジェネティックな変化に起因するものと考えられる。

[基盤研究]では「生殖・核内受容体系」に関しては、臨界期である出生直後に DES を曝露した時のみ、エストロゲン非依存的に膺上皮細胞の増殖が認められた。更



に DES 非曝露と曝露マウスの膣において、遺伝子発現プロファイルを DNA マイクロアレイにより取得した。G protein-coupled receptor 87 (Gpr87) は RT-PCR 法によって遺伝子発現がこの NeoDES マウスにおいて増加していた。ChIP 法によりクロマチン構造を調べたところ、Gpr87 遺伝子は 9 番目のリジンがアセチル化、4 番目のリジンがトリメチル化されており、9 番目のリジンのトリメチル化は認められなかった。以上により、ChIP-on-chip 法により網羅的な DNA のメチル化状態を調べた。DNA メチル化と遺伝子発現が関連している遺伝子として、serine/arginine-rich protein specific kinase 1 (NM\_016795)、muscleblind-like 1 (NM\_020007)、plexin domain containing 1 (NM\_001163608)、TBC1 domain family, member 8 (NM\_018775) などが得られた。TLE (Grg1 : transduction-like enhancer of split 1) のメチル化は高く、遺伝子発現は低下していた。レポーター系を用いて Grg1 を発現させると ER $\alpha$  の活性が抑制されたことから、膣上皮の恒久的な増殖には、ER $\alpha$  の活性化を抑制する機構が低下していることが示唆された。ただし、このように DNA のメチル化状態と遺伝子発現量が相関する遺伝子は少ないことが分かった。例えば、曝露群の膣上皮の細胞増殖に寄与する EGF 様増殖因子 (曝露群で遺伝子発現が有意に高い) のメチル化は対照群とほぼ同じであった。一方で、Gpr87 遺伝子のように、明らかにヒストン修飾を受けている遺伝子もある。したがって、ヒストン修飾と DNA メチル化の双方からクロマチン状態を明らかにする必要があることが明らかとなった。

「性ホルモンレセプターに結合する新しい転写共役因子の研究」では、このものを同定するとともに、ダイオキシンレセプターが女性ホルモンレセプターの蛋白分解を促進することを見出している。さらに脂肪細分化制御におけるダイオキシンレセプター複合体も同定された。この研究では、数多くの転写共役因子及び複合体の結合が明らかとなった。また、ダ

イオキシンレセプターと性ホルモンレセプターが会合することから、性ホルモンかく乱作用の一つは、この分子機構を介するものと考えられた。ダイオキシンレセプターの脂肪細胞における転写制御機構の解析から、この作用には組織特異的転写制御の存在が示唆される。また性ホルモン受容体の転写共役因子の細胞周期依存性は、ホルモン依存性癌との関連を考慮すると興味深い。

「骨細胞影響研究」では、SXR を安定発現した hFOB 及び MG-63 では BPA の細胞増殖作用が強く認められた。これを用いて BPA 及び 3-MC の骨芽細胞への影響をみたところ CYP1A1 は 3-MC の添加により MG-63 では選択的に発現が増強していた。3-MC は、骨芽細胞に対して、aromatase および CYP1B1 の発現を増加させた。また、hFOB の IL-1 $\beta$  の発現を増加させた。詳細については、Microarray 解析、Cytokine antibody array 解析、更に aromatase および CYP1B1 発現解析を行った。検討の結果、AhR と aromatase の発現、さらには IL-1 $\beta$  の発現との関係について、(genomic もしくは non-genomic pathway のいずれが関与するかを明らかにすることはできないが) AhR に依存してこれらの因子がタンパクレベルで増加することが明らかとなった。種々ステロイドホルモン産生酵素 [steroid sulfatase、17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD)、3 $\beta$ -HSD など] は aromatase 同様にサイトカインによって発現が誘導されることが報告されており [Herrmann M., *et al.*, *Ann N Y Acad Sci.* 2002]、これらのことから AhR はサイトカイン産生誘導を介し、種々の組織におけるステロイド産生機構に関与していると考えられた。[免疫・感染防御系]の研究では「BPA の脂肪組織に対する影響研究」については、脂肪組織重量、肝臓トリグリセリド (TG) 量が増加しており、肝臓においては、TG 合成にかかわる核内受容体 PPAR $\gamma$  やその標的遺伝子 CD36、マクロファージの浸潤や炎症マーカーである TNF $\alpha$ 、CD68 などの mRNA の発現が増加していた。精巣周囲

脂肪における mRNA 発現は、マクロファージ表面抗原である CD68 の発現が、BPA 投与により増加していた。血清では、遊離脂肪酸濃度が BPA 投与により増加していた。

以上に基いて、内分泌かく乱影響のひとつの可能性としてのエンドポイントを“メタボリックシンドローム”に置いて検討した。本研究では日本人の食事摂取基準にあわせ、総エネルギーに対し脂質エネルギー比率が 30%であるエサをマウスに食べさせ 10、20、30 週間 BPA 投与を行った。その結果、BPA 0.05  $\mu\text{g/ml}$  投与群で脂肪肝が発症した。(1 個体あたり、BPA を約 7  $\mu\text{g/kg/day}$  摂取し続けた計算になる。) 脂肪肝発症の過程を明らかにする目的で、脂肪組織における mRNA 発現および血清パラメータの解析を行った。その結果、脂肪組織ではマクロファージの浸潤を示す CD68 の発現が増加していた。さらに、血中の遊離脂肪酸濃度の増加もみられた。したがって、マクロファージの浸潤により血中に脂肪組織より遊離脂肪酸が放出されて増加し、肝臓で脂肪酸流入を司る CD36 の発現が増加し、これによって血中遊離脂肪酸が肝臓に取り込まれ、肝臓に脂肪が蓄積したものと考えられた。

[中枢神経・行動系]では、C57BL/6マウス妊娠14.5日の胎児終脳より分離した神経上皮細胞は、ニューロスフェア形成後、17-beta-estradiol ( $E_2$ )、Bisphenol A (BPA)、Genistein (GEN)、或いはDaidzein (DAI)の曝露下で増殖促進作用を認め、他方グルココルチコイド受容体アンタゴニストのMifepristoneの存在下では増殖阻害が確認された。また、同じ培養系で、Dexamethasoneに、単独で星状膠細胞分化マーカーGFAPのmRNAおよびタンパク質を誘導する作用があることが見出された。このものに $E_2$ 、BPAには分化影響作用は認められず、Tamoxifenに未分化マーカーのNestin発現を弱く上昇させる作用が認められた。この結果は、核内受容体作動性物質のリスク評価の際には、発達期の神経系に対する影響を十分に考慮する必要

があることを示唆している。

DEXは、神経幹細胞の増殖阻害作用に加え、単独で星状膠細胞分化を促進し、星状膠細胞分化促進因子LIFの作用を増強する。また、グルココルチコイド受容体阻害剤のMifepristoneによりデキサメタゾン作用は抑制される。従ってDEXの作用はグルココルチコイド受容体を介していることが示唆される。現時点で詳細な作用メカニズムは明らかに出来ていないが、星状膠細胞分化促進因子LIFの作用を増強することから、複合的な状況下では、DEXの作用がより低濃度で生じる可能性が注目される。なお、BPAについては $E_2$ 同様、ごく弱く増殖を促進する傾向が認められるに留まった。分化に対する影響は今回の実験条件では認められなかった。

次に「成獣ラットの海馬スライスを用いた研究」では、10 nM ビスフェノール A (BPA)、1 nM DES、10 nM エストラジオールが2時間以内に、CA1領域の神経の樹状突起上のスパイン(シナプス後部)数を増加させることを画像解析で確認した。これに基いて、あらかじめ脳の発達期にBPAを曝露し、成獣になったラットの海馬における神経スパインを調べた。その結果、スパイン密度は非処理群の2.42個/ $1\mu\text{m dendrite}$ からBPA処理群の2.02個/ $1\mu\text{m dendrite}$ へと(大きく)減少していた。頭部の直径の太いlarge-head ( $>0.5\mu\text{m}$ )というスパインが特に減少した。また、成獣ラット海馬を取り出してBPAを2時間作用させて神経スパインを調べたところ、10 nM BPAや1 nM エストラジオールは2時間で、CA1領域の神経の樹状突起上のスパイン数を140%程度増加させることを見出した。なおMAP kinaseを阻害、あるいはNMDA受容体をブロックすると、このBPAの作用は無くなった。

脳の発達期(妊娠期→胎児期→新生仔期→授乳期)でのBPAの曝露に対し、成獣期にこれを解析すると、神経スパイン密度は大きく減少した。これは、成獣ラット海馬においてBPAを急性的に加えた場合、スパインが増加していたのと全く異なっている。その理由としては、胎児期の神

経細胞がネットワークを形成する際に核の受容体を介した作用で変異が生じたものとする。これは主にkinaseを介してスパインを増やす急性作用とは異なるものと考えられる。海馬スライスに含まれるBPAの定量を質量分析にて進め、これを確認しようと試みている。

「核内受容体作動性化学物質の神経行動学的研究」では、BPAなどをとりあげて、オープンフィールド行動や情動行動、体重変化に対する影響を見たところ、ヒトと類似の非生殖行動の性分化障害、うつ・不安の増大、雄の多動、雄の体重増加と雌の体重減少がラットで引き起こされた。尚、マウスでは、性に非依存的な影響であり、雄の思春期の一過性の攻撃性の増大と成熟後の攻撃性の低下がヒトと類似の影響と考えられた。これまでの研究で、ラットが1) 行動の中性化、2) 不安・うつの増強、3) 学習・記憶障害、4) 薬物依存やその他の嗜癖行動、5) 自閉症・コミュニケーション障害などの社会機能異常、6) 母性行動異常、7) 性同一性障害・性志向性異常を含む生殖障害、8) 肥満および摂食障害、などのヒトでも観察される影響とよく似た影響を受けることが明らかになった。核内受容体作動性化学物質の標的はエストロゲン受容体、アンドロゲン受容体、甲状腺ホルモン受容体、PPA受容体、レチノイド受容体などが示唆されているが、核内受容体から細胞、組織、器官、個体、集団(社会)の各レベルで複数の標的がネットワーク化されて、影響を及ぼしあっている。各レベルで複雑な応答ネットワークをもっているにもかかわらず、共通の発現系を有しているのも事実で、さまざまな物質が異なる標的を介して類似の影響を示しているものと考えられる。

[マイクロアレイ基盤整備]では、網羅的遺伝子発現解析を用いることで、各班員の研究方向決定に影響を与える情報を短期間のうちに得ることを狙いとしてこの期間中に都合3課題について共同研究を実施した。

## E. 結論

[プロジェクト研究]の、「低用量作用に関する文献調査」では、2006年11月以降2008年11月までの文献調査により得られた215件の影響報告を生殖・発生毒性を中心に評価が行われた。また「前立腺影響研究」では、マウスへのBPA曝露に特徴的な遺伝子変化として性分化関連遺伝子群の発現上昇を見出した。ただし、BPA曝露に特徴的な遺伝子変化は、ERR $\gamma$ の転写活性を介したものか否かは明らかでない。「発がんの蓋然性研究」では、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の短期曝露は、エストロゲン受容体 $\alpha$ 及び $\beta$ を介して、コロニー形成速度を促進した。エストロゲン受容体発現レベルの低い細胞では、低濃度のBPAは、DNA損傷を起こさず、ストレス応答遺伝子経路を活性化させて細胞増殖や細胞老化さらにはエピジェネティクスに影響をおこすことが示唆された。

[基盤研究]では、「生殖・核内受容体系」については、エストロゲン作用物質であるDESの臨界期のマウスへの影響を、非曝露マウスと比較し、発現が増加する遺伝子をDNAマイクロアレイにより探索した。エストロゲン作用物質であるDESの臨界期のマウスへの影響を、非曝露マウスと比較し、発現が増加する遺伝子をDNAマイクロアレイにより探索し、その中のG protein-coupled receptor 87遺伝子がヒストンH3のアセチル化とメチル化修飾を受けていることを見出し、DNAメチル化やヒストン修飾の状態を解析することの重要性を明らかにした。そこでメチル化DNA抗体や各種ヒストン抗体を用いたChIP法により、クロマチン構造を解析したところ、DES曝露による影響がクロマチン構造を変化させ遺伝子発現の増加を引き起こした可能性が高いことが明らかとなった。しかしクロマチン構造と発現量との相関は、確率論的でありそれぞれ個別の遺伝子ごとに検討する必要があることも分かった。

「性ホルモンレセプター」の転写制御能をレセプター相互作用因子の観点から検討した研究では、男性及び女性ホルモンレセプターに結合する新たな転写共役因子を同定し、また、ダイオキシンレセプターの会合と蛋白質分解による新たな性ホルモンかく乱作用の分子機構を明らかにした。これには、内分泌かく乱物質の標的分子候補が関与している可能性が考えられた。

「骨影響研究」では、骨芽細胞においても機能的な AhR が発現することが明らかになっている。骨芽細胞において AhR はサイトカインシグナルを介したステロイド産生機構に関与しており、骨組織に対して内分泌攪乱化学物質は、AhR を介したステロイド産生機構に影響をおよぼすと考えられる。さらに、エストロゲンをはじめとするステロイドホルモンの骨組織への生理作用や骨粗鬆症に代表される病態において、AhR-サイトカインシグナルは重要な役割を担っているものと示唆された。

[免疫・感染防御系]では、BPA 投与群では、脂肪組織重量、肝臓 TG 量が増加しており、マクロファージによる炎症性マーカーも増加しており、摂取した BPA が肥満や脂肪肝に関与しているものと考えられた。すなわち、10、20、30 週間 BPA をマウスに投与した結果では、脂肪組織における CD68 mRNA 発現量、血中遊離脂肪酸濃度が増加し、摂取した BPA が脂肪肝発症に関与していることが確認された。肝臓においては、CD36 mRNA の発現増加、脂肪組織においては、CD68 mRNA 発現増加、血中では遊離脂肪酸濃度の増加がみられ、こうした所見から、BPA のような化学物質を意図せず摂取することにより、脂肪肝ひいては生活習慣病につながるような状態が起りやすくなっている可能性が考えられた。なお、「T ヘルパー前駆細胞 NKT 細胞への BPA 曝露」では、IL4 産生にリンクした Th2 優位なサイトカイン産生バランスが誘導されていたので、BPA は、Th1/Th2 のバランスの制御に関与している可能性が示唆されたが、この課題は、担当者の

事情により 2 年目で中断のやむなきに至った。

[中枢神経・行動系]では、神経幹細胞の分化増殖において核内受容体が重要な役割をしていることを始めとした基礎的な解析が行われた。すなわち、「神経幹細胞研究」により、核内受容体作動性物質の中にはその増殖及び分化に作用を示すものがあることが示された。特にデキサメサゾン (DEX) は増殖阻害作用、星状膠細胞分化促進作用を有することが明らかとなった。なお、DEX は星状膠細胞分化促進因子としての LIF の作用を増強することも明らかになった。

「成獣ラット海馬スライスにおける *ex vivo* 研究」では、生体異物である BPA, DES がスパイン形成に女性ホルモンの作用と類似の影響を与えるものと考えられた。また脳の発達期に BPA を曝露して成獣になったラットの海馬では神経スパイン密度が減少していた。一方、取り出した海馬スライスでは、急性的には BPA は 10 nM という低濃度で 2 時間程度で顕著にスパインを増加させることがわかった。このように BPA 曝露の方法によって神経への影響は大きく異なって解離することがわかった。この結果は、BPA などの内分泌かく乱物質がいつ作用するか（胎児期と成熟後）によって脳への影響に大きな差が出る可能性を示唆している。

「核内受容体作動性化学物質の神経行動学的研究」では、核内受容体作動化学物質のラットの発達期への曝露が、耐用 1 日摂取量以下の濃度でも中枢神経系に作用し、性依存的あるいは性非依存的に非生殖行動に影響を及ぼすことを明らかにしてきた。それらの影響は、ヒトで示唆されている中枢影響と類似の影響と考えられる。近年の研究では、「群れ行動」についても影響を受けることが明らかになった。サルを用いた評価は困難な点が多いが、鼻腔投与方法とレバー押し行動を利用することが学習機能や、性志向性、性行動および社会行動を評価できることが明らかになってきた。

[マイクロアレイ基盤整備]では、網羅的

遺伝子発現解析を用いることで、各班員の研究方向決定に影響を与える情報を短期間のうちに得ることを狙いとしてこの期間中に 3 課題について共同研究を実施した。網羅的ゲノム解析手法を用いることで、各班員の研究方向決定に影響を与える情報を短期間のうちに得ることを狙いとして実施してきた。あわせてこの研究では、技術的な改善をも計画し、網羅的ゲノム解析手法では、発現解析として数万の遺伝子の発現を迅速に検討することに加え、クロマチン免疫沈降と組み合わせることで転写因子やヒストン修飾、DNA メチル化などのクロマチン制御メカニズムを網羅的に解析することを可能とした。本研究で示されてきたようにこの技術は、既知の情報から推測することが困難な新たな情報を提供してくれる可能性を秘めた解析手法であり、明確な表現型を伴って影響が現れることが少ない化学物質の作用を、その作用メカニズムに立ち入って解析する際に今後も有力な手法となるものと考えている。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- Tsuruoka T, Fujimoto T, Shiota N, Monda M, Fueta Y, Ishidao T, Hori H, Aou S. Positive and negative effects of environmental chemicals on brain functions in rodents. *Brain-Inspired IT*. IV,266,79-84, 2010
- Masuda A, Narikiyo, K, Shiota, N, Aou S. Acquisition and extinction of avoidance response by social interaction in rat. *Brain-Inspired IT*. Springer, 266,73-8, 2010
- Hirabayashi, Y., and Inoue, T. (2009). Aryl hydrocarbon receptor biology and xenobiotic responses in hematopoietic progenitor cells. *Biochem Pharmacol* **77**, 521-535.
- Kawasaki, Y., Hirabayashi, Y., Kaneko, T., Kanno, J., Kodama, Y., Matsushima, Y., Ogawa, Y., Saitoh, M., Sekita, K., Uchida, O., Umemura, T., Yoon, B. I., and Inoue, T. (2009). Benzene-induced hematopoietic neoplasms including myeloid leukemia in Trp53-deficient C57BL/6 and C3H/He mice. *Toxicol Sci* **110**, 293-306.
- Yi, J. Y., Hirabayashi, Y., Choi, Y. K., Kodama, Y., Kanno, J., Han, J. H., Inoue, T., and Yoon, B. I. (2009). Benzene activates caspase-4 and -12 at the transcription level, without an association with apoptosis, in mouse bone marrow cells lacking the p53 gene. *Arch Toxicol* **83**, 795-803.
- Inoue, T., Hirabayashi, Y. Hematopoietic neoplastic diseases develop in C3H/He and C57BL/6 mice after benzene exposure: Strain differences in bone marrow tissue responses observed using microarrays. *Chem Biol Interact* Doi:10.1016/j.cbi.2009.12.005, 2009
- 井上 達 (2009). 内分泌攪乱化学物質の低用量作用と毒性学のあたらしい課題. *科学 (Science Journal KAGAKU)* **79**, 1022-1028.
- Miyagawa, S., Satoh, Y., Haraguchi, R., Suzuki, K., Iguchi, T., Taketo, M.M., Nakagata, N., Matsumoto, T., Takeyama, K., Kato, S. and Yamada, G. (2009). Genetic integrations of the androgen and Wnt/  $\beta$  -catenin pathways for the masculinization of external genitalia. *Mol. Endocrinol.*, **23**, 871-880.
- Kim, H., Nakajima, T., Hayashi, S., Chambon, P., Watanabe, H., Iguchi, T. and Sato, T. (2009). Effects of diethylstilbestrol on programmed oocyte death and induction of polyovular follicles in neonatal mouse ovaries. *Biol. Reprod.*, **81**, 1002-1009.
- Miyagawa, S., Katsu, Y., Ohta, Y, Sudo, T., Lubahn, D.B. and Iguchi, T. (2009). Estrogen receptor  $\alpha$  is indispensable for the induction of persistent vaginal change by neonatal 5  $\alpha$  -dihydrotestosterone exposure. *Biol. Reprod.* (in press).
- 井口泰泉 : ビスフェノール A のリスク

- 評価と研究に関する最近の話題.  
*Endocrine Disrupter News Letter* (環境ホルモン学会ニュースレター) 12 (2): 3, 2009.
- Kim, M., Kondo, T., Takada, I., Youn, M., Yamamoto, Y., Takahashi, S., Matsumoto, T., Fujiyama, S., Shirode, Y., Yamaoka, I., Kitagawa H., Takeyama, K., Shibuya, H., Ohtake, F. and Kato, S. DNA demethylation in hormone-induced transcriptional derepression. *Nature* 461, 1007-1012, 2009.
- Fujiki, R., Chikanishi, T., Hashiba, W., Ito, H., Takada, I., Roeder, R. G., Kitagawa, H. and Kato, S. GlcNAcylation of a histone methyltransferase in retinoic-acid-induced granulopoiesis. *Nature* 459, 455-459, 2009.
- Yamagata, K., Fujiyama, S., Ito, S., Ueda, T., Murata, T., Naitou, M., Takeyama, K., Minami, Y., O'Malley, B. W. and Kato, S. Maturation of microRNA is hormonally regulated by a nuclear receptor. *Mol. Cell* 36, 340-347, 2009.
- Kouzu-Fujita, M., Mezaki, Y., Mtsumoto, T., Yamaoka, I., Sawatsubashi, S., Yano, T., Taketani, Y., Kitagawa, H. and Kato, S. Co-activation of ER $\alpha$  by a gonadotropin-induced cofactor. *Mol. Cell. Biol.* 29, 83-92, 2009.
- Imai, Y., Kondoh, S., Kouzmenko, A. and Kato, S. Regulation of bone metabolism by nuclear receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 310, 3-10, 2009.
- Miki Y, Suzuki T, Nagasaki S, Hata S, Akahira J, Sasano H. Comparative effects of raloxifene, tamoxifen and estradiol on human osteoblasts in vitro: estrogen receptor dependent or independent pathways of raloxifene. *J Steroid Biochem Mol Biol*;113:281-289. 2009
- Nagasaki S, Suzuki T, Miki Y, Akahira J, Kitada K, Ishida T, Handa H, Ohuchi N, Sasano H. 17Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 12 in human breast carcinoma: a prognostic factor via potential regulation of fatty acid synthesis. *Cancer Res*: 69:1392-1399, 2009
- Nagasaki S, Suzuki T, Miki Y, Akahira J, Shibata H, Ishida T, Ohuchi N, Sasano H. Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II in human breast carcinoma: Possible regulator of lymphangiogenesis via vascular endothelial growth factor-C expression. *Cancer Sci.* 100:639-645. 2009
- Sasano H, Nagasaki S, Miki Y, Suzuki T. New developments in intracrinology of human breast cancer: estrogen sulfatase and sulfotransferase. *Ann N Y Acad Sci*; 1155:76-79.2009
- Nakamura Y, Xing Y, Sasano H, Rainey WE. The mediator complex subunit 1 enhances transcription of genes needed for adrenal androgen production. *Endocrinology*, 150: 4145-4153, 2009
- Nagasaki S, Miki Y, Akahira J, Suzuki T, Sasano H. Transcriptional regulation of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 12 by SREBP-1. *Mol Cell Endocrinol*, 307: 163-168, 2009
- Hojo Y., Higo S., Ishii H., Ooishi Y., Mukai H., Murakami G., Kominami T., Kimoto T., Honma S., Poirier D., and Kawato S. Comparison between hippocampus-synthesized and circulation-derived sex steroids in the hippocampus *Endocrinology*150, 5106-5112 (2009)
- Munetsuna E., Hattori M., Komatsu S., Sakimoto Y., Ishida A., Sakata S., Hojo Y., Kawato S., and Yamazaki T. Social isolation stimulates hippocampal estradiol synthesis *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379, 480-484 (2009)
- Munetsuna E., Hojo Y., Hattori M., Ishii H., Kawato S., Ishida A., Kominami S., and Yamazaki T. Retinoic Acid Stimulates 17 $\beta$ -Estradiol and Testosterone Synthesis in Rat Hippocampal Slice Cultures *Endocrinology.* 150, 4260-4269 (2009)
- Higo S., Hojo Y., Ishii H., Kominami T., Nakajima K., Poirier D., Kimoto T., and Kawato S. Comparison of sex-steroid synthesis between neonatal and adult rat hippocampus *Biochem. Biophys. Res.*

- Commun.* 385, 62-66 (2009)
- Hatanaka Y., Mukai H., Mitsuhashi K., Hojo Y., Murakami G., Komatsuzaki Y., Sato R., and Kawato S. Androgen rapidly increases dendritic thorns of CA3 neurons in male rat hippocampus *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 381, 728-732 (2009)
- Matsunaga N, Kanno J, Hamada C, Yoshimura I. An experimental design for judging synergism on consideration to endocrine disruptor animal experiments. *Environmetrics* 2009; 20:1-13.
- Kanno J., Overview: "Children's toxicology", a renovating study field of irreversible "early exposure-delayed effects". *J Toxicol Sci.* 2009;34 Suppl 2:SP199-200.
- Tanemura K, Igarashi K, Matsugami TR, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J. Intrauterine environment-genome interaction and children's development (2): Brain structure impairment and behavioral disturbance induced in male mice offspring by a single intraperitoneal administration of domoic acid (DA) to their dams. *J Toxicol Sci.* 2009;34 Suppl 2:SP279-86.
- Masuda A, Aou S. (2009) Social transmission of avoidance behavior under situational change in learned and unlearned rats. *PLoS One.* 2009 Aug 27;4(8):e6794
- Oomura Y, Aou S, Fukunaga K. (2009) Prandial increase of leptin in the brain activates spatial learning and memory. *Pathophysiology.* 2009 Jul 14. [Epub ahead of print]
- 栗生修司 (2009) 環境ホルモンと脳の性差. *Clinical Neuroscience* 27, 1128-1129
- Hirabayashi Y, Inoue T. Principles of data-mining in toxicogenomics. In: Sahu SC, ed. Toxicogenomics: A Powerful Tool for Toxicity Assessment. Hoboken, NJ. John Wiley & Sons, Ltd. 2008; 57-84.
- Sekizawa J. 2008. Low Dose Effects of Bisphenol A: A Serious Threat to Human Health?. *J Toxicol Sci.* 33:389-403.
- 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. 2008. *Int. J. Cancer.* 122: 444-451.
- Iguchi T, Watanabe H, Ohta Y, Blumberg B. Developmental effects: estrogen induced vaginal changes and organotin induced adipogenesis. 2008. *Int J Androl.* 31: 263-8.
- Okada M, Takezawa S, Mezaki Y, Yamaoka I, Takada I, Kitagawa H, Kato S. 2008. Switching of chromatin-remodelling complexes for oestrogen receptor-alpha. *EMBO Rep.* 9:563-8.
- Shibuya R, Suzuki T, Miki Y, Yoshida K, Moriya T, Ono K, Akahira J, Ishida T, Hirakawa H, Evans DB, Sasano H. 2008. Intratumoral concentration of sex steroids and expression of sex steroid-producing enzymes in ductal carcinoma in situ of human breast. *Endocr Relat Cancer.* 15: 113-24.
- Hojo Y., Murakami G., Mukai H., Higo S., Hatanaka Y., Ogiue-Ikeda M., Ishii H., Kimoto T., and Kawato S. Estrogen synthesis in the brain-Role in synaptic plasticity and memory *Mol Cell Endocrinol.* 290, 31-43 (2008)
- Ogiue M., Tanabe N., Mukai H., Hojo Y., Murakami G, Takata N, Tsurugizawa T, Shimohigashi Y., Honma S, Komatsuzaki Y, Kimoto T and Kawato S. Rapid Modulation of Long-term Depression and Spinogenesis by Endocrine Disrupters in Adult Hippocampal Neurons. *Brain Res Rev.*, 57, 363-375 (2008)
- Hojo Y., Murakami G., Mukai H., Higo S., Hatanaka S., Ogiue-Ikeda M., Ishii H., Kimoto T. and Kawato S. Estrogen synthesis in the brain – Role in synaptic plasticity and memory. *Mol. Cell.*

- Endocrinol.*, 290, 31-43 (2008)
- Hirabayashi Y, Yoon BI, Tsuboi I, Huo Y, Kodama Y, Kanno J, Ott T, Trosko JE, Inoue T. 2007. Protective role of connexin 32 in steady-state hematopoiesis, regeneration state, and leukemogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)*. **232**: 700-712.
- Sekizawa J, Ohtawa H, Yamamoto H, Okada Y, Nakano T, Hirai H, Yamamoto S, Yasuno K. 2007. 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 Risks Res.***10**: 841-851.
- Suzuki A, Urushitani H, Sato T, Watanabe H, Ohta Y, and Iguchi T. Gene expression change in the Müllerian duct of the mouse fetus exposed to diethylstilbestrol *in utero*. *Exp. Biol. Med.*, 232: 503-514, 2007.
- Vom Saal FS, Akingbemi BT, Belcher SM, Birnbaum LS, Crain DA, Eriskin M, Farabolini F, Guillette LJ Jr, Hauser R, Heindel JJ, Ho SM, Hunt PA, Iguchi T, Jobling S, Kanno J, Keri RA, Knudsen KE, Laufer H, Leblanc GA, Marcus M, McLachlan JA, Myers JP, Nadal A, Newbold PR, Olea N, Prings GS, Richter CA, Rubin BS, Sonnennnschein C, Soto AM, Talsness CE, Vandenberg JG, Vandenberg LN, Welser-Kunts DR, Watson CS, Welshons WV, Wetherill Y, Zoeller RT. 2007. Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: Intergration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reprod Toxicol.* **24**: 131-138.
- 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. 2007. Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature.* **446**:562-566.
- Takeda I, Mihara M, Suzawa M, Ohtake F, Kobayashi S, Igarashi M, Youn Min-Young, Takeyama K, Nakamura T, Mezaki Y, Takezawa S, Yogiashi Y, Kitagawa H, Yamada G, Takada S, Minami Y, Shibuya H, Matsumoto K, Kato S. 2007. A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical wnt signalling supresses PPAR- $\gamma$ transactivation. *Nat Cell Biol.* **9**:1273-1285.
2. 学会発表
- Inoue T: Biological Safety Testing in the 21<sup>st</sup> Century: Overview of the past and prospects for the future. The 10th Annual Commemorative Drug Nonclinical Safety Academic Conference, National Center for Safety Evaluation of Drugs Foundation (NCSEDF) (2009.12.2)
- Inoue T: Benzene Induced Myeloid Leukemia Revisited, Based on Induction of Thioredoxin. 2009 Autumn Symposium, Korean Society of Toxicology/ Korean Society of Environmental Mutagens and Carcinogens/ Korean Society of Environmental Toxicology (2009.11.13)
- Inoue T: Gene expression profile of the bone marrow after benzene exposure in C57BL/6 and C3H/He mice: the common gene expression and the stochastic gene expression. FDA-China International Forum and Workshop Microarray-Bioinformatics-Nest-Generation Sequencing in Safety Assessment and Biomarker discovery (2009.9.26)
- Inoue T: Hematopoietic neoplastic diseases in C3H/He and C57BL/6 mice after benzene exposure. Differences observed using microarrays. Benzene 2009: Health Effects and Mechanisms of Bone Marrow Toxicity, Implication for t-AML and the Mode of Action Framework. (2009.9.10)
- 曾根秀子 楊淋清 福田智一 「BPAは、P53を介して発がん物質の感受性を上昇する。」日本癌学会 第68回学術総会 (2009)
- Iguchi, T.: Current status of the endocrine



- disruptor research in Japan and OECD including my own laboratory. International Symposium of Environmental Emerging Compound Measurement Technology and Management, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung, Taiwan, May 26, 2009.
- Iguchi, T. and Tatarazako, N.: Current research progress in Japan. OECD Validation and Management Group Ecotoxicity, Invertebrate, OECD, Paris, France, June 8-9, 2009.
- Iguchi, T. and Yamazaki, K.: Activities on testing and assessment of ED in Ministry of the Environment, Japan. OECD Workshop on Endocrine Disruption Testing and Assessment, Copenhagen, Sept. 22-24, 2009.
- Iguchi, T.: Endocrine disruption across multiple animal species - common mechanisms? e. hormone, Tulane University, USA, October 20-24, 2009.
- 井口泰泉 : 「雌性ホルモン系における毒性発現の分子メカニズム」日本トキシコロジー学会生涯教育講習会, 岩手大学, 盛岡, 7月5日, 2009.
- 大竹史明、藤井義明、加藤茂明 「ダイオキシン受容体はリガンド依存性ユビキチンリガーゼである」第82回日本内分泌学会学術総会 (2009/4/23-25、前橋)
- Kato, S. Non-canonical Wnt signaling and the osteoblast-adipocyte lineage decision. 36th European Symposium on Calcified Tissues (2009/5/23-27, Vienna, Austria)
- Kato, S. Epigenetic regulators for nuclear receptors. 21st IUBMB and 12th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology (2009/8/2-7, Shanghai, China)
- Kato, S. Biology and physiology of steroid hormone receptor. Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society (LWPES) / European Society for Pediatric Endocrinology (ESPE) 8th Joint Meeting Global Care in Pediatric Endocrinology (2009/9/9-11, New York, USA)
- 三木康宏, 端 秀子, 笹野公伸, 「ヒト骨芽細胞における内分泌攪乱物質の影響 : Steroid and xenobiotic receptor を介した bisphenol A の作用」第30回東北骨代謝研究会, 仙台市, 2009年
- Kawato, S., Mukai, H., Hojo, Y., Hatanaka, Y., Higo, S., Murakami, G., Y. Ooishi, Y., Kimoto, T., and Kominami, T. Rapid modulation of spines and LTD/LTP by estrogen and androgen in rat hippocampus: neuro-intracrinology, The 39th annual meeting of the Society for Neuroscience, Chicago, October, 2009
- Kawato S., Mukai H, Murakami G, Hojo Y, Hatanaka Y, Higo S, Kimoto T Rapid modulation of spines and LTD/LTP by estradiol in rat hippocampus: neuro-synaptocrinology The 38th annual meeting of the Society for Neuroscience., Washington DC, U.S.A., November, 2008
- Aou S., Kanemara A, Monda M, Narikiyo K, Fujimoto T (2009) Species-, Sex- and time- dependent neurobehavioral effects of bisphenol A. The 32<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Nagoya, Sept 16-18
- 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、萱野純、杉村芳樹. 「ビスフェノールA経胎盤曝露によりマウス泌尿生殖洞で発現変動する性分化関連遺伝子群の同定」第97回日本泌尿器科学会総会, 巻:100 号:2 頁:160, 2009年, 岡山
- Tohru Inoue. Attenuation of oxidative stress in the Trx-overexpression mice: Study on benzene induced hemopoietic malignancies. The 4<sup>th</sup> Meeting of International REDOX Network (2007.11.2) [Jeju Island, Korea, Meeting Abstract 53; 2007]
- Inoue T., Hirabayashi Y. Gompertzian

expression of the lifespan elucidates a theoretical and toxicological ultimate risk. International Congress of Toxicology XI (2007. 7.18) [Montréal, Canada, Meeting abstract PW12.259]

Iguchi T. Recent studies using *Xenopus laevis* and American alligators – Adipogenesis in *Xenopus laevis* induced by organotin compounds and temperature-dependent sex determination of alligators. International Symposium on Amphibian and Reptile Endocrinology and Neurobiology. March 26-28, 2007, Berkeley, CA, USA.

Iguchi T., Watanabe H, Ohta Y and Blumberg B: Developmental effects of chemicals: TBT-induced adipogenesis and DES-induced persistent vaginal changes in mice. 4<sup>th</sup> Copenhagen Workshop on Endocrine Disruptors. May 28-31, 2007, University Department of Growth and Reproduction, Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark.

Kato Y, Baba T, Kobayashi K, Katsu Y., Watanabe H and Iguchi T.: Molecular cloning of a putative membrane ecdysteroid receptor from the crustacean, *Daphnia magna*. 第37回生理研国際カンファレンス 2007. 岡崎コンファレンスセンター, 2007年3月.

Masuda A, Aou S. (2007) Social transmission in avoidance learning is dependent on learning experience in rats. The 30th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Sep 10-12, Yokohama.

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]

Iguchi T. Current situation of endocrine disruptor issue in Japan. Gordon Research Conference on Environmental Endocrine Disruptors, Waterville, Valley Resort, NH, USA, June 2008.

Takada I, Mihara M, Suzawa M, Kato S. A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signaling suppresses PPAR-gamma function. 2008 Keystone Symposia Conference (Nuclear Receptors: Orphan Brothers) (Whistler, Canada)

Okada M, Takezawa S, Mezaki Y, Yamaoka I, Takada I, Kitagawa H, Kato S. Switching of chromatin-remodeling complexes for estrogen receptor  $\alpha$ . 2008 Keystone Symposia Conference (Molecular Basis for Chromatin Modifications and Epigenetic Phenomena) (Snowmass, USA)

Kawato S., Mukai H, Ogiue-Ikeda M, Murakami G, Hojo Y, Tsurugizawa T. “Rapid modulation of spines and LTD by estradiol in adult rat hippocampus: neuro-synaptocrinology” The 37th annual meeting of the Society for Neuroscience, in San Diego, November, 2007

## G. 知的財産所有権の取得状況

1. 特許取得 該当しない
2. 実用新案登録 該当しない
3. その他 該当しない

資 料

分担研究報告書

高次生命系における核内受容体作動性化学物質の低用量影響に関する検討(2)

研究分担者 関澤 純 徳島大学総合科学部 教授

研究要旨

ビスフェノールAでは、きわめて低用量の曝露により核内受容体経由の作用で通常の毒性試験では検出されない生殖・発生毒性影響が起きうる可能性が指摘された。関澤はビスフェノールAに関し2003年以降公表された報文から、これらを含む影響の報告を抽出し、影響が観察された濃度の低い順に17報を影響の種類ごとに分類・整理した。関澤抽出の17報の低用量影響報告のうちCERHRが生殖・発生毒性影響評価に適切と判断した試験報告は7報だったが、CERHRが検討しなかった神経行動への影響の報告が含まれ、これらは影響の性質と毒性試験の標準化という観点からさらに検討を進める必要があると考えた。そこで次に極めて低用量のビスフェノールAが従来の毒性試験で検出することが困難な生殖・発生影響を核内受容体経由で誘起する可能性を検討した。2007年12月～2008年11月に公表されたビスフェノールAの影響報告をPubMedでCAS番号(80-05-7)を用い公表文献（英語または日本語）を検索、原報を収集し内容を検討した。少なくとも20報（うち10報では最小影響量は $10\mu\text{g/kg/日}$ 以下、最も低い最小影響量は $0.2\mu\text{g/kg/日}$ ）で、従来（ $5\text{mg/kg/日}$ ）よりはるかに低用量での影響の報告があり、そのうち18報は周産期または胎児期曝露により主な影響は神経行動毒性影響及び性分化の異常ないしは生殖器における形態学的な影響だった。厚生労働省が各国の再評価状況も受け食品の容器・包装や乳幼児の玩具から溶出する可能性のある微量のビスフェノールAのリスク評価を内閣府食品安全委員会に諮問していることもあり、研究成果をレビュー論文にまとめ公表した。

A. 研究目的

核内受容体作動性物質ビスフェノールA (Fig. 1) の低用量影響の可能性が注目され、米国 National Toxicology Program (NTP) の CERHR (Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction) は2007年に生殖・発生毒性に関するレビューの検討結果を中間報

告した。関澤がこれまで独自に行った低用量影響報告の検討結果と CERHR のそれを相互参照し、現時点におけるビスフェノールAの低用量影響の蓋然性について検討する。すなわち、極めて低用量のビスフェノールAが核内受容体経由で通常の毒性試験では検出されない生殖・発生影響を誘起する可能性につき、公表文献