

平成21年 6月15日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590610
 研究課題名 (和文) 室内空气中化学物質による核内受容体を介した内分泌・ストレス・薬物代謝に及ぼす影響
 研究課題名 (英文) Effects of Indoor Air Chemicals on Transcriptional Activities via Nuclear Receptors and Dioxin Receptor
 研究代表者
 小島 弘幸 (KOJIMA HIROYUKI)
 北海道立衛生研究所・健康科学部・研究主査
 研究者番号：10414286

研究成果の概要：室内空气中の化学物質を同定し、約200種類の有機化合物をリストアップした。そのうちの約100物質について、内分泌に関わるエストロゲン受容体 α/β 、アンドロゲン受容体、甲状腺ホルモン受容体 α/β のホルモン受容体、ストレス応答に関わるグルココルチコイド受容体、薬物代謝酵素誘導に関わるプログネロンX受容体、ペルオキシゾーム増殖剤活性化受容体 α/γ 、ダイオキシン受容体を介した作用をレポーター遺伝子アッセイ法により調べた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,900,000	570,000	2,470,000
20年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：環境保健、シックハウス症候群、化学物質、核内受容体、室内空気

1. 研究開始当初の背景

(1) 住宅や学校・オフィスビルなどの高気密化に伴い、建材や内装材などから発生する化学物質が室内空気汚染を引き起こし、居住者に様々な健康被害を引き起こすことが報告されている。これらは、シックハウス症候群やシックスクール症候群と言われ、公衆衛生上極めて憂慮すべき問題となっている。このような健康被害を引き起こす室内空气中に存在する化学物質としては、ホルムアルデヒドやトルエンなどの揮発性物質が知られているが、実際にシックハウス症患者宅の室内空気中からは、フタル酸エステル類や臭素系・有機リン系難燃剤などを含む様々な半揮

発性化学物質が検出されている。

(2) 近年、多種類の人工化学物質によるエストロゲン (女性ホルモン) 受容体 (ER)、アンドロゲン (男性ホルモン) 受容体 (AR)、甲状腺ホルモン受容体 (TR) などのホルモン受容体へのアゴニスト活性やアンタゴニスト活性が報告され、このような作用を有する化学物質は内分泌かく乱物質 (いわゆる環境ホルモン) と呼ばれている。生体にはこれらの受容体を含め 48 種類もの核内受容体が存在する。例えば、副腎皮質ホルモンの受容体、すなわちグルココルチコイド受容体 (GR) はストレス反応に関与し免疫系を抑制する方向に働くことが知られている。一方、ペルオ

キシゾーム増殖活性化受容体 (PPAR)、プレグネノロンX受容体 (PXR)、ダイオキシン受容体であるアリル hidrocarbon 受容体 (AhR) は、薬物代謝酵素群の発現調節に関与していることが知られている。しかしながら、環境毒性学の観点から、これらホルモン受容体を含めた核内受容体に対する環境化学物質の反応性については知見が限られている。

(3) これまで我々は、環境化学物質による ER、AR、TR 等の核内受容体への作用を高感度に測定するレポーター遺伝子アッセイ法を開発し、この方法を用いて農薬やフタル酸エステル類 (可塑剤) の核内受容体への作用を明らかにしてきた。また、新築住宅やシックハウス症候群患者宅の室内空気を採取し分析機器 (GC/MS) を用いて調べ、様々な化学物質が室内空气中に存在することを認めている。ホルモンなどの化学物質は微量で核内受容体に作用して生体に影響を及ぼすが、室内空气中に存在する半揮発性化学物質は脂溶性が多く、核内受容体をターゲットにする可能性が考えられる。さらに、シックハウス症候群や化学物質過敏症の患者は女性に多いことから、ホルモンバランスの関与を指摘する報告もある。また、これらの患者はある種のストレス症状を引き起こすことや個人差があることから遺伝的な薬物代謝系の異常を示唆する報告もある。このようなことから、室内空气中化学物質は核内受容体を介してシックハウス症候群や化学物質過敏症患者のホルモンやストレス反応及び薬物代謝系に影響を及ぼしている可能性が考えられる。

2. 研究の目的

室内空气中化学物質について、10 種類の核内受容体 (ER α/β , AR, GR, TR α/β , PPAR α/γ , PXR, AhR) との反応性 (アゴニスト及びアンタゴニスト活性) を感度の高いレポーター遺伝子アッセイ法を用いて調べる。この *in vitro* スクリーニングで比較的強い活性が認められた化学物質をマウスに投与し、その核内受容体が発現する組織での標的遺伝子の発現変化を調べ、*in vivo* での作用を確認する。

以上の研究により、シックハウス症候群や化学物質過敏症患者宅に存在する室内空气中化学物質 (100 種類以上) の各種核内受容体へのアゴニスト及びアンタゴニスト作用を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 室内空气中化学物質の探索・測定

旭川医科大学付属病院でシックハウス症候群または化学物質過敏症と診断された患者宅の室内空気汚染物質について、GC/MS 法を用いて調べ、約 70 種類の化学物質を同

定した。

(2) ヒト型 GR, PXR, PPAR α/γ のレポーター遺伝子アッセイ法の確立

受容体発現プラスミド及び応答配列を含むレポータープラスミドを用いて、細胞選定やプラスミド導入条件などアッセイ法の最適化を行った。

(3) 室内空气中化学物質における核内受容体活性の *in vitro* スクリーニング (図 1)

ヒト型核内受容体 (ER α , ER β , AR, TR α , TR β) 遺伝子及び対応する応答配列を有するレポーター (ルシフェラーゼ) 遺伝子を導入した細胞に、室内空气中化学物質を添加後培養して、各種受容体に対するアゴニスト活性及びアンタゴニスト活性を測定した。

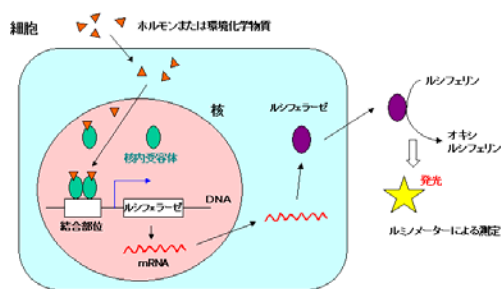


図1 レポーター遺伝子(ルシフェラーゼ)アッセイ法の概要

(4) マウスを用いた室内空气中化学物質による遺伝子発現変化の測定

in vitro スクリーニングで比較的強い活性を示した化学物質をマウスに (腹腔内または経口) 投与し、各種受容体の発現組織における標的遺伝子の発現変化について定量 PCR 法を用いて測定することにより *in vivo* での影響を確認した。

4. 研究成果

(1) シックハウス症や化学物質過敏症患者宅の室内空気を捕集し、ガスクロマトグラフ/質量分析 (GC/MS) 法により約 70 種類の化学物質を同定するとともに、これまで文献上で報告されている約 140 種類の室内空气中化学物質と合わせて約 200 種類の揮発性有機化合物 (VOCs) をリストアップした。これらの化学物質には、有機リン系や臭素系難燃剤、フタル酸エステル類、パラベン類、ベンゾフェノン類、有機リン系やピレスロイド系殺虫剤、木材から放出されるテルペン類が含まれていた。

(2) 標準品として入手可能であり、揮発性が極めて高い物質 (沸点 100°C 以下) を除く約 100 物質について、内分泌に関わるエストロゲン受容体 (ER α ・ER β)、アンドロゲン受容体 (AR)、甲状腺ホルモン受容体 (TR α ・TR β) の各種核内受容体及び薬物代謝酵素

CYP1A 誘導に関わるダイオキシン受容体 (AhR) を介した作用をレポーター遺伝子アッセイ法により調べた。いくつかの物質から ER α / β アゴニスト作用や AR アンタゴニスト作用を検出した。とくに難燃剤・可塑剤の中には、ER α / β アゴニスト作用と AR アンタゴニスト作用を併せ持つ物質が認められた。また、テルペン類には、ER β アゴニスト作用が認められた。一方、TR α / β や AhR を介する作用は、ほとんど認められなかった。

(3) ストレス応答に関わるグルココルチコイド受容体 (GR)、薬物代謝酵素 CYP3A 誘導に関わるプログネロン X 受容体 (PXR)、薬物代謝酵素 CYP4A 誘導に関わるペルオキシゾーム増殖剤活性化受容体 (PPAR) α 、脂質代謝に関わる PPAR γ の各種核内受容体活性を検出するためのレポーター遺伝子アッセイ法を新たに確立した。

(4) 化学物質の中でも室内空気から広く検出されるポリブロモジフェニルエーテル類 (PBDEs) 及びリン酸エステル類 (PEs) の難燃剤について 10 種類の核内受容体 (ER α / β , AR, GR, TR α / β , RXR α , PPAR α / γ , PXR) 活性とダイオキシン受容体 (AhR) 活性を詳細に調べた。PBDEs 8 物質及びその代謝物 (水酸化体 4 物質, メトキシ体 4 物質) の多くは、ER α / β アゴニスト・アンタゴニスト活性及び AR アンタゴニスト活性を示した。また、GR アンタゴニスト活性や TR α / β アンタゴニスト活性を示す物質も認められた。RXR α 、PPAR α / γ 及び AhR に対してはほとんど活性を示さなかったが、これらの化合物の多くに、PXR アゴニスト活性を認めた。PBDEs 及び代謝物の化学構造とホルモン受容体活性との間には、いくつかの関連性が認められ、とくに PBDE 水酸化体は、PBDEs や PBDE メトキシ体に比べ受容体活性が強く、パラ位水酸基の近傍にあるブロモ基の存在がホルモン受容体との相互作用に大きく影響することが示唆された。PEs 11 物質のうち、いくつかは ER α / β アゴニスト活性を認め、さらに AR 及び GR アンタゴニスト活性を認めた。これらの化合物に TR α / β 、RXR α 、PPAR α / γ 及び AhR 活性は認められなかったが、7 物質に PXR アゴニスト活性を認めた。PEs のうち構造的に側鎖の大きい物質は、相対的に疎水性が高く分子サイズが大きいことから核内受容体のリガンドとして機能し易いと考えられた。一方、PXR アゴニスト活性を示したいくつかの PBDEs 及び PEs をマウスに投与し、肝臓における CYP3A11 遺伝子の発現誘導を RT-PCR を用いて検討したところ、PBDEs は誘導能を有していたが、PEs は誘導能が認められなかった。このことから、PEs は生体内で代謝を受けやすく、リガンドとして機能しなかったことが推察された。

(5) 本研究は多種類の環境化学物質につい

て多種類の核内受容体への作用を調べた研究であり、その研究成果はこれまで報告されていない新たな事象を多く含んでいる。成果としては学会発表が先行しているが、今後順次、外国雑誌での論文発表を行う予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

① Kojima H., Takeuchi S., Uramaru N., Sugihara K., Yoshida T., and Kitamura S. Nuclear hormone receptor activity of brominated diphenyl ethers and their hydroxylated and methoxylated metabolites in transactivation assays using Chinese hamster ovary cells. *Environmental Health Perspectives*, in press (2009). 査読有

② Takeuchi S., Takahashi T., Sawada Y., Iida M., Matsuda T., and Kojima H. Comparative study on the nuclear hormone receptor activity of various phytochemicals and their metabolites by reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 32, 195-202 (2009). 査読有

③ Takeuchi S., Iida M., Yabushita H., Matsuda T., and Kojima H. *In vitro* screening for aryl hydrocarbon receptor agonistic activity in 200 pesticides using a highly sensitive reporter cell line, DR-EcoScreen cells, and *in vivo* mouse liver cytochrome P450-1A induction by propanil, diuron and linuron. *Chemosphere*, 74, 155-165 (2008). 査読有

④ Kojima H., Takeuchi S., Anezaki K., Yamaguchi K., Otsuka H., Sawadaishi K., Honda K., Yabushita H., and Iida M. Determination of dioxins in emission gas, ash and atmospheric air samples using a highly sensitive AhR-mediated reporter cell line, DR-EcoScreen cells. *Organohalogen Compounds*, 69, 1234-1237 (2007). 査読有

⑤ 小林智、武内伸治、小島弘幸、高橋哲夫、神和夫、渡辺一彦、「改修工事に伴いシックハウス症候群が発生したマンションにおける室内空気中化学物質の測定と症状誘発に関与した物質の推定」、北海道立衛生研究所報、57、23-28 (2007) 査読有

⑥ 武内伸治、小島弘幸、小林智、高橋哲夫、「化学物質過敏症患者の症状に関与する室内空気中化学物質の検索 (第 3 報)」、北海道

[学会発表] (計 21 件)

①小島弘幸、武内伸治、浦丸直人、杉原数美、北村繁幸、「臭素化難燃剤PBDEおよびその代謝物によるホルモン受容体を介した内分泌攪乱作用」、日本薬学会北海道支部第132回例会、2009年5月30日、札幌市(札幌コンベンションホール)

②武内伸治、飯田満、高橋哲夫、小島弘幸、「植物由来化学物質における核内受容体PXR及びPPAR $\alpha/\beta/\gamma$ アゴニスト作用」、日本薬学会第129年会、2009年3月26日、京都市(国立京都国際会館)

③岩瀬恵理、小島弘幸、杉原数美、浦丸直人、藤本成明、黒木広明、北村繁幸、太田茂、「臭素化難燃剤PBDEの甲状腺ホルモン受容体結合活性の代謝による変動」、日本薬学会第129年会、2009年3月26日、京都市(国立京都国際会館)

④小島弘幸、武内伸治、佐田文宏、根岸正彦、「農薬200物質におけるヒト及びマウスPXRアゴニスト活性のスクリーニング」、第11回日本内分泌攪乱化学物質学会、2008年12月14日、東京都(東京ビッグサイト)

⑤武内伸治、小島弘幸、神和夫、北村繁幸、黒木広明、白石不二雄、「PCB水酸化体100物質におけるグルココルチコイド受容体活性のスクリーニング」、第11回日本内分泌攪乱化学物質学会、2008年12月14日、東京都(東京ビッグサイト)

⑥小島弘幸、武内伸治、小林智、伊藤俊弘、吉田貴彦、「有機リン系難燃剤における核内受容体活性のプロファイル」、フォーラム2008衛生薬学・環境トキシコロジー(日本薬学会主催)、2008年10月17日、熊本市(熊本市市民会館)

⑦武内伸治、小島弘幸、松田正、「脂溶性食品添加物における核内受容体活性のプロファイル」、フォーラム2008衛生薬学・環境トキシコロジー(日本薬学会主催)、2008年10月17日、熊本市(熊本市市民会館)

⑧岩瀬恵理、小島弘幸、杉原数美、浦丸直人、黒木広明、北村繁幸、太田茂、「臭素化難燃剤PBDEおよびTBBPAの代謝と内分泌攪乱作用の検討」、フォーラム2008衛生薬学・環境トキシコロジー(日本薬学会主催)、2008年10月17日、熊本市(熊本市市民会館)

⑨小島弘幸、武内伸治、小林智、伊藤俊弘、吉田貴彦、「臭素系及び有機リン系難燃剤による核内受容体PXRの活性化」、第17回日本臨床環境医学会学術集会、2008年7月4日、旭川市(旭川ターミナルホテル)

⑩姉崎克典、山口勝透、芥川智子、武内伸治、小島弘幸、「高感度AhRレポーター細胞を用いた大気中ダイオキシン類の測定(第2報)」、第17回環境化学討論会、2008年6月12日、神戸市(神戸国際会議場)

⑪小島弘幸、武内伸治、浦丸直人、北村繁幸、「臭素系難燃剤ポリブロモジフェニルエーテル及びその代謝物における核内受容体活性のプロファイル」、日本薬学会第128年会、2008年3月27日、横浜市(パシフィコ横浜)

⑫武内伸治、小島弘幸、松田正、澤田幸治、「植物由来機能成分の核内受容体を介した作用」、日本薬学会第128年会、2008年3月27日、横浜市(パシフィコ横浜)

⑬小林智、武内伸治、小島弘幸、高橋哲夫、神和夫、「シックハウス症候群の発症に関連する化学物質の検索システムの開発と実際例」、日本分析化学会北海道支部2008冬季研究発表会、2008年1月、札幌市(北大学術交流会館)

⑭小島弘幸、武内伸治、堤智昭、山口勝透、高橋哲夫、小林智、藪下尚智、飯田満、「高感度AhRレポーター細胞を用いた魚介類中ダイオキシン類簡易測定法の開発」、第10回日本内分泌攪乱化学物質学会、2007年12月10日、さいたま市(大宮ソニックシティ)

⑮武内伸治、小島弘幸、北村繁幸、黒木広明、白石不二雄、「PCB水酸化体100物質におけるアングロゲン受容体活性のスクリーニング」、第10回日本内分泌攪乱化学物質学会、2007年12月10日、さいたま市(大宮ソニックシティ)

⑯小林智、高橋哲夫、武内伸治、小島弘幸、神和夫、「シックスクールで検出された未規制化学物質(1-メチル-2-ピロリドン及びテクキサノール)濃度の推移と発生源の探索」、平成19年度室内環境学会総会、2007年12月1日、仙台市(東北文化学園大学)

⑰武内伸治、小島弘幸、北村繁幸、黒木広明、白石不二雄、「PCB水酸化体100物質におけるエストロゲン受容体 α/β 活性のスクリーニング」、フォーラム2007衛生薬学・環境トキシ

コロジエ（日本薬学会主催）、2007年11月1日、大阪市（アピオ大阪 森ノ宮ピロティホール）

⑱ Kojima H., Takeuchi S., Anezaki K., Yamaguchi K., Otsuka H., Sawadaishi K., Honda K., Yabushita H., and Iida M. Determination of dioxins in emission gas, ash and atmospheric air samples using a highly sensitive AhR-mediated reporter cell line, DR-EcoScreen cells. 27th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, 2007 September, Tokyo

⑲ 小島弘幸、武内伸治、山口勝透、大塚英幸、姉崎克典、澤田石一之、本田克久、藪下尚智、飯田満、「高感度AhRレポーター細胞を用いた排出ガス及びばいじん中ダイオキシン類の測定」、第16回環境化学討論会、2007年6月20日、北九州市（北九州国際会議場）

⑳ 武内伸治、白石不二雄、鎌田亮、中島大介、小島弘幸、滝上英孝、鈴木規之、白石寛明、「迅速で簡便な酵母を用いるAhRアゴニスト活性のアッセイ法について」、第16回環境化学討論会、2007年6月20日、北九州市（北九州国際会議場）

㉑ 姉崎克典、山口勝透、芥川智子、小島弘幸、武内伸治、藪下尚智、飯田満、「高感度AhRレポーター細胞を用いた大気中ダイオキシン類の測定とAhR活性物質の同定」、第16回環境化学討論会、2007年6月20日、北九州市（北九州国際会議場）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 弘幸 (KOJIMA HIROYUKI)
北海道立衛生研究所・健康科学部・研究主査
研究者番号：10414286

(2) 研究分担者

武内 伸治 (TAKEUCHI SHINJI)
北海道立衛生研究所・健康科学部・研究職員
研究者番号：20414287

千葉 真弘 (CHIBA MASAHIRO)
北海道立衛生研究所・健康科学部・研究職員
研究者番号：90414292

伊藤 俊弘 (ITOH TOSHIHIRO)
旭川医科大学・医学部・講師
研究者番号：20271760

(3) 連携研究者

小林 智 (KOBAYASHI SATOSHI)
北海道立衛生研究所・健康科学部・生活保健科長
研究者番号：00414285

吉田 貴彦 (YOSHIDA TAKAHIKO)
旭川医科大学・医学部・教授
研究者番号：90200998