

低用量問題作業班 取りまとめ中間状況報告

作業班長 井 上 達

班 員： 井 上 達
 関 澤 純
 小 野 宏
 菅 野 純

1. 背景的事項-----	2
2. 低用量問題に関連する新たな知見-----	3
低用量問題の概括-----	4
作用機構上の新たな知見-----	5
高次生命系の諸系列における知見-----	6
情報関連の成果とその知見-----	8
3. 今後必要な調査研究などの課題の提言-----	9
高感受性期—胎生期・新生児期・思春期の問題-----	9
高感受性期と低用量問題-----	9
生体影響の焦点—高次生命系-----	10
ゲノミクス手法による内分泌かく乱化学物質影響研究-----	10

1. 背景的事項

低用量問題についての背景的事項としては、世界保健機構の化学物質安全性計画による「内分泌かく乱化学物質に関する科学的最新知見の地球規模での評価(WHO/IPCS)¹」(以下、グローバルアセスメント)の出版以降、内分泌かく乱化学物質(EDCs)問題への全般的な認識が進展した点をあげることができる。

グローバルアセスメントでは、野生生物に関しては、時間的・空間的に限定的ながら、環境中のホルモン類似作用をもつ化学物質の暴露によって障害を受けていると考えられる事象が種々の関連性で認められる旨の指摘になっている。

さらに、実験動物については、哺乳綱動物の体内には絶えず大量の内在性ホルモンがあり、体内はそうしたホルモンにさらされ、またそうした内在性ホルモンに対する防御機構も備わっているとされ、従って成体での長期試験で眼に見えた影響を認める報告は見られず、成体での影響はさしあたり障害性の焦点とはならないものと判断している。これは、いわゆるホルモン様作用物質の生体に対する低用量作用が通常の試験法では多くの場合検出されなかったという、2000年10月、米国ノースカロライナ州で開催された低用量問題についてのワークショップで確認されている認識を基礎においている²。

この内在性のホルモンは、そうした制御からはずれて障害を引き起こすことがあり、医療上の目的である程度リスクを前提とした投与も行われる³。また胚細胞期や胎児期・新生児期のような形態形成期にあたる機能が安定する前の時点では、その影響が無視できないとするデータが集積している。この点は、思春期における影響についても同様と考えられる⁴。

ヒトでの発がん性に予防効果が期待されているいわゆる植物ホルモン(phytoestrogens)については、そうした予防効果の反面、(日常用量との乖離は大きいものの)高用量では機構上はエピジェネティックな発がん促進効果を持つことを示唆する指摘も散見される。後者のエピジェネティックな発がん促進効果については不明の点が少なくないが、これらが植物ホルモンの二面性の作用機構を意味するものか、それとも投与時期などによって変動する生体の側の生物学的な要素に起因するものか、乖離した二つの効果を説明する要因は現在明らかでなく、なお文献検索などの検討が必要である。

¹ WHO/International Programme on Chemical Safety; Eds, T. Damstra, S. Barlow, A. Bergman, R. Kavlock, G.van der Kraak., Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors. World Health Organization, 2002, pp. 180. (<http://www.ehp.niehs.nih.gov/who/>). 邦訳は、厚生労働省ホームページ参照 (http://www.nihs.go.jp/_edc/global-doc/index.html)

² 2000年10月、米国環境防護庁(EPA)は、ノースカロライナ州で、従来求められてきた無作用量(NOEL)や無毒性量よりも低い用量域*で、いま内分泌かく乱問題で対象となっているようなパラメータに該当する新たな影響が標準的な試験で用いられてきた用量よりも低い用量で観察され得るものかの如何を問う「低用量問題に関するワークショップ」を開催した。そこでは、ビスフェノール A(BPA)の低用量データ報告の認否について、確認されたとする報告と認められなかったとする報告の双方に信頼性(credibility)を認めた上で、低用量作用を示す試験の再現性や、長期試験がジエチルstilbestrol(DES)にも BPA にも作用を示さなかった事実に言及し、現状に於ける低用量問題の不確実性を結論した。*<http://nipserv.niehs.nih.gov/htdocs/liason/FinalRptLowDoseFR.html>

³ 経口避妊薬や、閉経後のホルモン補充療法などが、患者の希望を尊重しつつ慎重に対処される所以でもある。

⁴ EPA が思春期アッセイを取り上げていることから明らかなとおり、巻頭の要旨に組み込まれるべきであったと考えられる。

膜受容体の発見⁵は、オルファニ德斯らによって指摘されていた、核内受容体での説明が困難だった、遺伝子機能を介さないホルモン様作用⁶の理解を助ける役割を果たすと同時に、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。

以上の背景的事項にも明らかなおおりに、内分泌かく乱化学物質問題は、その基本的存在が確認され、メカニズムの面からもその基礎の一端が解き明かされるに伴って、低用量問題に関する研究の動向は、胚細胞期、胎児期・新生児期・思春期での影響を糸口にして、よりメカニズムを明らかにする中で解決を迫る方向に進んでいる。これらの認識にもとづいて、ここでは、内分泌かく乱化学物質問題の課題が集中しているいわゆる“高次生命系”、すなわち 内分泌系・免疫系・神経系など⁷での生体影響、もしくはその蓋然性に焦点をあてて、関連する新たな知見の概括を試みた。

2. 低用量問題に関連する新たな知見

厚生労働省が2001年に発表した中間報告書の追補では、「現時点で、入手できる科学的知見からは、低用量域における内分泌かく乱作用を直ちに断定することには疑問がある」とまとめている。その後発表された結果からも、内分泌かく乱化学物質影響として危惧の指摘された既知の生体影響を、既知の試験法、もしくはその一部、観察の条件を強化した試験法で、確認した例は、調べられた限りでは認められない⁸。これは旧来より知られるホルモン影響試験法のひとつであった子宮腫大試験をこの期、経済開発協力機構(OECD)で新たにとりあげることになった経緯からしてもやむを得ない結果とも考えられ、この間とりわけ試験法の開発が強調されてきた所以でもある。また受容体レポーターアッセイなどによりホルモンの影響の認められている物質で調べられた限りの結果で、全体に共通した低用量作用特有の指標ようなものも見出されておらず、内分泌かく乱化学物質として共通に概念づけ得る指標も見出されない。むしろ、様々な物質がそれぞれ別個の作用機構によって生体機構のかく乱に作用する可能性が窺われ、その中には、これまで知られていなかった様々な作用機構も報告されている^{9,10}。このことは、そうした概念の化学物質を想定したときの、一般性のある

⁵ Zhu H, Rice C, Pang Y, Pace M, Tomas P. Proc Nat'l Acad Sci USA. 100 : 2231-2236, 2003.

⁶ ノンゲノミック(non-genomic)な機構(Moggs and Orphanides, EMBO Rep. 2: 775-781, 2001).

⁷ 高次生命系は、発生・生殖面をはじめとした時間軸や、メモリー機構、多細胞間情報ネットワークを構成する機能軸などが特徴と考えられる。

⁸ Aoyama H, Suzuki K. Enhanced one-generation reproductive toxicity study in rats for detecting endocrine-disrupting effects of chemicals. Pure Appl Chem 75 (11-12): 2497-2501, 2003.

⁹ Inoue T. Hormonally active agents and plausible relationships to adverse effects on human health. Pure Appl. Chem., 75: 2555-2561, 2003.

¹⁰ Honma S, Suzuki A, Buchanan DL, Katsu Y, Watanabe H, Iguchi T. Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. Reprod Toxicol. 16: 117-122, 2002. / Palanza P, Howdeshell KL, Parmigiani S, vom Saal FS.: Exposure to a low dose of bisphenol A during fetal life or in adulthood alters maternal behavior in mice. Environ Health Perspect 110, Suppl.3:415-422, 2002. / Schonfelder G, Flick B, Mayr E, Talsness C, Paul M, Chahoud I.: In utero exposure to low doses of bisphenol A lead to long-term deleterious effects in the vagina. Neoplasia 4:98-102, 2002. / Schonfelder G, Wittfoht W, Hopp H, Talsness CE, Paul M, Chahoud I.: Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. Environ Health Perspect 110: A703-707, 2002. / Tinwell H, Haseman J, Lefevre PA, Wallis N, Ashby J.: Normal sexual development of two strains of rat exposed in utero to low doses of bisphenol A. Toxicol Sci 68:339-348, 2002. / Wetherill YB, Petre CE, Monk KR, Puga A,

試験法の開発が困難であることを意味している。

低用量問題の概括：

低用量問題は、同時に取り上げられた、閾値の有無、相乗性・相加性の有無、および高用量から低用量への外挿の妥当性の如何、反応の線形-非線形用量相関問題などを構成要素とし、密接な関連をもったいわば“ひとつの問題”である。この点から、閾値問題や相乗・相加性、あるいは用量相関問題について概観すると以下の通りである。

閾値の有無に関する証明は実質的には生物統計学的に用量相関のモデル型から導き出すことである。EPAのEarl Grayは、抗アンドロゲン作用を持つ物質の種々の雌化指標が同様のロジスティック・カーブもしくはS字状曲線をとっていて、調べた限りでベースラインレベルまで接近したと述べている^{11,12}。体内環境のホメオステシスから切り離れた実験系¹³では、*in vivo* 試験でさえも極めて低い用量で様々の反応が生ずることが知られている^{14,15}。生体は低用量ホルモン様物質を検知しないのではなく、検知した上でこれに対応する事実からして、このような有処置 *in vivo* 試験は、生体の低用量反応性の確認情報として有用であるが、有害性の判断の情報にはならない。

相乗性・相加性の有無の問題に該当するデータとしては、嘗てSoto¹⁶が複合アッセイ系確立の可能性を論じた報告が原点になると思われるが、注目されるのは、ロンドン大学のKortenkampのグループによる相加性に関する報告である^{17,18,19}。これによれば²⁰、明らかな

Knudsen KE.: The xenoestrogen bisphenol A induces inappropriate androgen receptor activation and mitogenesis in prostatic adenocarcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 1:515-524, 2002. / Ashby J.: Testing for endocrine disruption post-EDSTAC: extrapolation of low dose rodent effects to humans. *Toxicol Lett* 120:233-242, 2001. / Markey CM, Luque EH, Munoz De Toro M, Sonnenschein C, Soto AM.] In utero exposure to bisphenol A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland. *Bio Reprod* 65: 1215-1223, 2001. / Markey CM, Michaelson CL, Veson EC, Sonnenschein C, Soto AM.:The mouse uterotrophic assay: a reevaluation of its validity in assessing the estrogenicity of bisphenol A. *Environ Health Perspect* 109: 55-60, 2001. / Gupta C.: Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals. *Proc Soc Exptl Biol Med.* 224: 61-68, 2000. / Elswick BA, Welsch F, Janszen DB.: Effect of different sampling designs on outcome of endocrine disruptor studies. *Reprod Toxicol* 14:359-367, 2000./ Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Tillmann M, Markert B.: Effect of endocrine disruptors on prosobranch snail (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part I: Bisphenol A and octylphenol as xeno-estrogen. *Ecotoxicol* 9: 383-397, 2000. / Tinwell H, Joiner R, Pate I, Soames A, Foster J, Ashby J.: Uterotrophic activity of bisphenol A in the immature mouse. *Regul Toxicol Pharmacol* 32:118-126, 2000. / Howdeshell KL, Hotchkiss AK, Thayer KA, Vandenberg JG, vom Saal FS.: Environmental toxins: Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature* 401: 763-764, 1999.

¹¹ Gray LE Jr, Ostby J, Monosson E, Kelce WR.: Environmental antiandrogens: Low doses of the fungicide vinclozolin alter sexual differentiation of the male rat. *Toxicol Ind Health* 15(1-2): 48-64, 1999.

¹² Gray LE, Ostby J, Furr J, Wolf CJ, Lambright C, Parks L, Veeramachaneni DN, Wilson V, Price M, Hotchkiss A, Orlando E, Guillette L: Effect of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals. *Hum Reprod Update* 7(3): 248-264, 2001.

¹³ たとえば子宮腫大試験(Uterotrophic bioassay)。

¹⁴ Kanno J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W: *Environ Health Perspect* 109(8): 785-794, 2001.

¹⁵ 他方、十分に低用量の領域での、リガンドの受容体との会合は当然確率的に低くはなるので、近年発がん性領域でも“practical な”閾値はあるものとの考え方が散見され、内分泌かく乱問題領域でも同様と考えられる。

¹⁶ Soto AM, Fernandez MF, Luizzi MF, Oles Karasko AS, Sonnenschein C.: Developing a marker of exposure to xenoestrogen mixtures in human serum. *Environ Health Perspect* 105(3): 647-654, 1997.

¹⁷ Rajapakse N, Silva E, Kortenkamp A: Combining xenoestrogens at levels below individual no-observed-effect concentrations dramatically enhances steroid hormone action. *Environ Health Perspect* 110(9): 917-921, 2002.

¹⁸ Rajapakse N, Silva E, Kortenkamp A: Combining xenoestrogens at levels below individual

相加性(additives)を確認しており、ホルモン様作用のシグナル認識からそうした事柄もあり得ることは考えられ得るだけに結論の意味するところは重く、種々の角度からの検討が必要である。

反応の線形—非線形用量相関問題に関するデータは、従来のNOELやNOAELなどよりも低用量で何らかの変動パラメータが観察された、という形で結果が間接的に示されている。先のE. Greyは、vinclozolinで、このものの抗アンドロジェン作用が従来の無作用量レベル(数千mg/kg)より低いレベル(100~200mg/kg)で肛門・生殖突起間距離の短縮など様々の指標で雌化傾向を生ずると報告している²¹。

暴露される成体の組織毎に、各種の作用物質の影響が機能的にも反応順位相関的にも異なるといった例も観察されている。エストロゲン様活性をもつことが知られるノニルフェノール (NP)による子宮と肝臓における遺伝子発現変化を比較解析した結果によれば、子宮においてはエストラジオールに較べて低発現で知られるNPによる遺伝子の発現が、肝においては、より強い遺伝子発現を生じていた、という。これは同等のエストロジェン活性を有する化学物質でも標的器官によって異なった影響を与えることがあり得ることを示唆しており、内分泌かく乱化学物質の標的器官や複合影響を検討する上で留意がもとめられる²²。また骨芽細胞も同様の意味でエストロジェンの重要な標的器官と考えられるが、ゲニシュタイン、ビスフェノールA (BPA)、ジエチルスチルベストロール(DES)のヒト細胞(FOB株)に対する影響を見た結果では、BPAは、DESよりも強い増殖活性を促したという²³。この結果の生物学的意味は定まっていない。

作用機構上の新たな知見：

作用機構上の新たな知見としては、例えば内分泌かく乱作用の危惧が指摘される物質の、高次生命系への多面的な影響に対するシステムズ・バイオロジー²⁴の面からの検討が進んだことである。注目すべき結果として、受容体試験で女性ホルモン受容体結合性が示されていて且つエストロゲンと異なった作用機序を持つ内分泌様作用活性化学物質の様々な性質、あるいは、アリールカーボン受容体を介したダイオキシシン類(TCDD)の作用とエストロゲン受容体(ER)シグナルの相互作用関係^{25,26}などが明らかにされつつある。これらの結果は先に見

no-observed-effect concentrations dramatically enhances steroid hormone action. *Environ Health Perspect* 110(9): 917-921, 2002.

¹⁹ Silva E, Rajaakse N, Kortenkamp A.: Something from “nothing”—eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environ Sci Technol* 36(8): 1751-1756, 2002.

²⁰ 報告者らの文中にあるような相乗性(synergy)は意味せず、相加性(additive)に相当すると思われる。

²¹ Ostby J, Kelce WR, Lambright C, Wolf CJ, Mann P, Gray LE Jr.: The fungicide procymidone alters sexual differentiation in the male rat by acting as an androgen-receptor antagonist in vivo and in vitro. *Toxicol Ind Health* 15(1-2): 80-93, 1999.

²² Watanabe H, Suzuki A, Goto M, Lubahn DB, Handa H, Iguchi T. Tissue-specific estrogenic and non-estrogenic effects of a zenoestrogen, nonylphenol. *J. Mol. Endocr.*, 33: 243-252, 2004.

²³ この背景機構については検討中という。

²⁴ 系統生物学。細胞の働き(時間変化や刺激に対する応答遺伝子の発現など)を現象としてとらえ、その現象を再現する仕組みには、どのような機構が考えられるかを調べることで生命現象の本質を探ろうとするアプローチ。化学反応論はその原型である。

²⁵ ダイオキシシン受容体(AhR)を介した内分泌かく乱は、エストロジェン非依存性のERへの結合・転写活性化と、エストロジェン依存性に活性化したERのユビキチン化の促進という二つの機構のバランス下で引き起こされるものと提唱されている。すなわち、リガンド活性化AhRは、エストロジェン非依存的にERを介した転写機能を活性化し、他方、エストロジェンによる活性化ERの転写機能は抑制されるという。この結果は、これまでの報告にも示唆されていたダイオキシシン

た低用量効果、複合効果、作用機構にも関わる影響を持つものと考えられる。

高次生命系の諸系列における知見：

この項目に関わる知見を個別にみると、まず発生・生殖系列に関する知見では、BPAを妊娠マウスに投与し、生まれた雌の仔マウスにみられる影響を調べた報告では、膣の開口日が有意に早まっていた。このものの成熟後の交配結果では、少なくとも初産では、妊娠率、産仔数、性比に影響は見られていない²⁷。BPAの出生直後ラットへの高用量投与では、成熟後に雌に無排卵が観察され、遅延性無排卵機構として注目される。

胚細胞期、胎児期、新生児期に生体が不可逆的な影響を受ける可能性を持つことはグローバルアセスメントの指摘にも見られるとおりであり、これに関連した知見が報告されている。ここでの論点は、胚細胞期、胎児期、新生児期でのホルモン受容体の発現の報告と、それらに関連する種差の問題と考えられる。前者については、エストロゲン受容体(ER)などのホルモン受容体の発現が、新生児雄ラットの発生段階でアンドロゲン受容体(AR)を発現している細胞はすべてERを発現し、またセルトリ細胞でER β はARよりより早く発現していること、胎児の生殖細胞を含むほとんどの芽細胞ではER β を発現しているがARは発現しておらず、これが外部からのEDCsへの応答を考える上で重要な意味をもつものと指摘がある²⁸。そしてヒトにおける発現様式が実験動物と異なるという種差の面から、より高濃度の天然エストロゲンにさらされているヒトで、比較的に弱い外界からのホルモン活性物質に関わるマウスやラットと同様の発現が見られるかについては、疑問が出されている²⁹。しかしながら、

類の作用が内分泌かく乱に関連する可能性を裏付けている。いまだ実質的なデータは乏しいが、同様の変化は、他の核内受容体についても引き起こされる可能性が示唆されるの、今後の大きな課題となるものと考えられる。

²⁶ 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.

²⁷ Honma S, Suzuki A, Buchanan DL, Katsu Y, Watanabe H, Iguchi T.: Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. *Reprod. Toxicol.*, 16: 117-122, 2002.(多世代にわたる継世代影響を見る実験は行われていない。)

²⁸ Williams K, McKinnell C, Saunders PTK, Walker M, Fisher JS, Turner KJ, Atanassova N, Sharpe RM : Neonatal exposure to potent and environmental oestrogens and abnormalities of the male reproductive system in the rat: evidence for importance of the androgen-oestrogen balance and assessment of the relevance to man, *Human Reproduction Update* 7, 3 (2001) 236-247

²⁹ Witorsch RJ: Low-dose in utero effects of xenoestrogens in mice and their relevance to humans: an analytical review of the literature, *Food and Chemical Toxicology* 40(2002)905-912

ヒトとマウスの妊娠における内分泌学的な種差につき、性ホルモンの生成・変換臓器とその時期、および濃度と存在状況の違いが指摘され、その結果、マウスで観察された生殖系への影響がヒトでは、また、BPAなどでマウスについて見られた低用量影響はヒトでは見られないであろうと推論されている。すなわち、マウス・ラットはエストラジオールとエストロンを生産するがヒトはこれに加えてエストリオールを生産するという違いのみならず、ヒト母親の妊娠後期における血中エストラジオールは15-20ng/mLでラット・マウスの妊娠後期の30-60 pg/mLの数百倍である。胎児中濃度はヒト(5-10ng/mL)、マウス(100-150ng/mL)と50-100倍である。ヒト胎児血ではさらに妊娠後期にエストロン(10-15ng/mL)、エストリオール(50-100 ng/mL)濃度も高い。ヒトでは性分化は7-14週(胎児血中エストラジオールは2-6ng/mL)と早期であるがマウスでは胎齢15日以降(胎児血中エストラジオールは100-150pg/mL)でずっと後になる。さらに胎児血漿中フリーフォーム・エストラジオールは1-4.5%だが、マウス血漿中フリーフォーム・エストラジオールは0.2%と推定される。