

### (3) 低用量問題

#### 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)<sup>1</sup>」(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<sup>2</sup>。

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<sup>3</sup>。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<sup>4</sup>。

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

<sup>1</sup> 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>)

<sup>2</sup> 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>.

<sup>3</sup> 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。

<sup>4</sup> 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。

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。

膜受容体の発見<sup>5</sup>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<sup>6</sup>の理解を助ける役割を果たすとともに、内分泌かく乱問題における、現状で未知の要因の介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となっており、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<sup>7</sup>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<sup>8</sup>。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様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<sup>9,10</sup>。このことは、そうした概念の化学物質を想定し

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

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

<sup>7</sup> 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。

<sup>8</sup> 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.

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

<sup>10</sup> 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

たときの、一般性のある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、及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<sup>11,12</sup>。体内環境のホメオステシスから切り離れた実験系<sup>13</sup>では、in vivo 試験でさえも極めて低い用量で様々な反応が生ずることが知られている<sup>14,15</sup>。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・相加性のある問題に該当するデータとしては、嘗てSoto<sup>16</sup>が複合アッセイ系確

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, 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.

<sup>11</sup> 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.

<sup>12</sup> 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.

<sup>13</sup> たとえば子宮腫大試験(Uterotrophic bioassay)。

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

<sup>15</sup> 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。

<sup>16</sup> 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.

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<sup>17,18,19</sup>。これによれば<sup>20</sup>、明らかな相加性 (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ゲ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(100~200 mg/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<sup>21</sup>。

暴露される成体の組織ごとに、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ゲ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ためられる<sup>22</sup>。また骨芽細胞も同様の意味でエストロゲ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)、ジエチルスティルベストロール (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<sup>23</sup>。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<sup>24</sup>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目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ン類 (TCDD) の作用とエストロゲン

<sup>17</sup> 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.

<sup>18</sup> 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.

<sup>19</sup> Silva E, Rajapakse 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.

<sup>20</sup> 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。

<sup>21</sup> 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.

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

<sup>23</sup> この背景機構については検討中という。

<sup>24</sup> 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。

受容体(ER)シグナルの相互作用関係<sup>25,26</sup>などが明らかにされつつある。これらの結果は先に見た低用量効果、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<sup>27</sup>。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ERβ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ERβ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<sup>28</sup>。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<sup>29</sup>。しかしながら、他方、ヒトやウサギの核内受容体RXRに関する研究<sup>30</sup>によれば、

<sup>25</sup> ダイオキシン受容体(AhR)を介した内分泌かく乱は、エストロゲン非依存性のERへの結合・転写活性化と、エストロゲン依存性に活性化したERのコピ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、エストロゲン非依存的にERを介した転写機能を活性化し、他方、エストロゲンによる活性化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ン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。

<sup>26</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>27</sup> 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。)

<sup>28</sup> 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

<sup>29</sup> 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

げっ歯類のRXRと分子種が異なり、BPAで現在マウスやラットで観察されている影響よりヒトへの影響が小さいとする根拠はないとする考え方もあり、認識の統一には、さらなる研究の蓄積が必要である。なお、雄性生殖器関連の情報としては、独自に確立されたマウス前立腺の無血清器官培養法によれば、 $10^{-9}$ Mのエストラジオールが、TGF $\alpha$ 強陽性の扁平上皮化生を誘導するとの観察が観察されている<sup>31</sup>。検討の結果、これは前立腺におけるER $\alpha$ 強を介して誘導されるTGF $\alpha$ が、扁平上皮の化生を引き起こすものと考えられているが詳細は明らかでない。

グローバルアセスメントにも明らかなように、免疫・感染防御系に関する知見は乏しい。未発表データとして見出されるものとしては、①成体マウスを使った*in vivo*<sup>32</sup>におけるDESの影響<sup>33</sup>、②胎児胸腺器官培養によるDES、エストラジオール、BPA、p-n-オクチルフェノール、ベンジルn-ブチルフタレートなどの化学物質のリンパ球のT細胞増殖分化への影響<sup>34</sup>、③同じく5種類の化学物質の脾臓T細胞の増殖に及ぼす影響などについて検討した結果、T細胞の早期の増殖・分化に抑制的な影響を与えるという。胎児系では、妊娠マウスに飲水投与でBPA(2.5ug/ml及び10.0ug/ml)を投与し、その胎児の免疫系への影響をみた実験によれば、免疫系の発育を遅延させていると考えられる変化が観察されるという<sup>35</sup>。またリンパ球のB細胞系については、ノニルフェノール(NP)、BPA、フタル酸ブチルベンチル(BBP)、フタル酸ジブチル(DBP)といった物質の、マイトジェンのIL-2、IL-10、IFN- $\gamma$ などのサイトカイン産生に対する影響が、低用量域まで観察され、このときBPAでは、細胞内カルシウムイオン濃度が上昇し、タンパク質のチロシンリン酸化が併行して起こっていることが確認されている<sup>36</sup>。

神経系では、神経幹細胞にER $\alpha$ 、ER $\beta$ などが発現していることが従前より報告されている。これを用いて、DES暴露後のその分化・自己複製能が低下している旨の未発表データも見られる。前駆細胞にはオーファン受容体RVR、TR4などの発現が見出されているが生物学的背景は明らかでない。性分化に及ぼす神経内分泌学的な影響研究が進展しているが、用量との関係などはまだ見られない<sup>37</sup>。

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)ですと後になる。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。

<sup>30</sup> Bruce Blumberg : 未発表データ。

<sup>31</sup> 厚生科学研究(井上班)報告・未発表データ。

<sup>32</sup> 生体個体レベルでの実験。

<sup>33</sup> Utsuyama M, Kanno J, Inoue T, Hirokawa K. Age/sex dependent and non-monotonous dose-response effect of diethylstilbestrol on the immune functions in mice. *Toxicol Lett.* 135: 145-153, 2002.

<sup>34</sup> T細胞系機能については、高酸素下器官培養システムにおける、胎児胸腺細胞(CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>)から亜集団(CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>)への分化・増殖が、0.01-1nM程度の低用量のDESやBPAの添加によって抑制されたとされている。

<sup>35</sup> 新規未発表データ。

<sup>36</sup> Yamazaki T, Ezaki O. Effect of endocrine disruptors on lymphocyte responses. *Organohalogen Compounds.* 56: 107-110, 2002. / Yamazaki T, Okada Y, Hisamatsu Y, Kubota S, Kayama F. Effects of endocrine disrupting chemicals on lymphocyte responses. *Organohalogen Compounds.* 49: 394-396, 2000.

<sup>37</sup> レーザー捕捉法による単一ニューロンを同定する方法によって、同定されたGnRHニューロンからtotal RNAを取り、GnRH1およびGnRH3におけるPXRやRXRなどの連絡の検討から、GnRH1およびGnRH3が、PXRによって制御されていることを意味すると考えられ、生殖原器の性分化が、GnRH1によって、生殖行動がGnRH3によって支配されているものと推定している。これらの発現

行動に及ぼす影響が注目を集めているが、これらの報告はここ数年内にやっと出始めたところであり、知見は乏しい。Bisphenol A(BPA)に関連した行動関連のデータとしては、Wistar系の妊娠ラットへのBPA 1.5mg/kg (NOAELは50mg/kg<sup>38</sup>)の投与が、仔の成育後の行動様式と、脳の青斑核(locus ceruleus)の小型化などの雌化傾向を惹起したといい<sup>39</sup>、抗男性ホルモン様作用化学物質でも行動変化が見られたとされている<sup>40</sup>。BPA 0.1ppmを出産前1週間投与した妊娠Wistarラットから生まれた仔ラットでは、ストレス対処行動の性差の消失(雌化)が見出されている<sup>41</sup>。同様の変化は、嗅覚応答様式でも示唆されたという。

#### 情報関連の成果とその知見：

以上、高次生命系を中心とした事象の他には、リスク評価情報として、BPAの低用量影響についての文献調査が進行中である<sup>42</sup>。生体影響の蓋然性が境界領域に位置するものと考えられているBPAについて、2000年から2004年の5年間に報告の見られた168件の文献を対象に、邦文の信頼性を含む内容的検討を行った上で、これらをデータベース化する作業が進行中である。

食物や生体内には、アリアルヒドロカーボン受容体(AhR)<sup>43</sup>に対してリガンドとなり得る種々の物質が明らかになっており、その作用機構が注目されている<sup>44</sup>。これらの物質は低用量で作用すると考えられるが、詳細は明らかでない<sup>45</sup>。天然のAhRリガンドの存在量と作用メカニズムに関して行われた文献調査によれば、緑茶、ウーロン茶、コーヒー、リンゴジュース、トマトジュースからの抽出物でリガンド活性物質の存在が認められている。発がん一般に関する調査(低用量影響に関する検討を含む)によれば、ジエチルスティルベスト

に必要な用量関連のデータは得られていない。(Palhar IS. Gonadotropin-releasing hormone receptors: neuroendocrine regulators and neuromodulators. *Fish Physiol. Biochem.* in press).

<sup>38</sup> US-NTP(1982)ラット(F344)2年間経口投与慢性毒性・発がん性試験併用試験による。尚、別報、古川ら(1994)によれば、13週間反復投与毒性試験では、500mg/kg/day。

<sup>39</sup> 粟生(Aou)らによれば、Wistar系の妊娠ラットへの Bisphenol A 1.5mg/kg (NOAELは50mg/kg)投与は、仔の成育後のオープン・フィールドテストにおける行動と、脳の青斑核(locus ceruleus)の小型化など雌化傾向を惹起したと報告している(Kubo K, Arai O, Ogata R, Omura M, Hori T, Aou S. Exposure to bisphenol A during the fetal and suckling periods disrupts dexual differentiation of the locus coeruleus and of behavior in the rat. *Neurosci Lett*, 304, 73-76, 2001. / Kubo K, Arai O, Omura M, Watanabe R, Ogata R, Aou S. Low dose effects of bisphenol A on sexual differentiation of the brain and behavior in rats. *Neurosci Res.* 45, 345-356, 2003).

<sup>40</sup> Hotchkis AK, Ostby JS, Vandenberg JG, Gray LE Jr. Androgens and environmental anti-androgens affect reproductive development and play behavior in the Sprague-Dawley rat. *Environ Health Perspect.* 110(suppl 3): 435-439, 2002.

<sup>41</sup> Kawai K, Nozaki T, Nishikata H, Aou S, Takii M, Kubo C. Fetal exposure to bisphenol A induces aggressive behavior in pubescent male mice. *Environmental Health Perspective* 111, 175-178, 2003.

<sup>42</sup> 2000年から2004年の5年間に報告の見られた168件の文献について、低用量影響データの有無の確認の上、14名の専門家の協力を得て、レビューとデータベースの作成に着手した。調査に先立って、調査票を作成された調査項目は、著者名、論文原題名、出典、対象生物、影響標的臓器、影響レベル(細胞・組織・個体)、暴露方法、暴露時期(胎生期など)、暴露濃度と用量段階、試験記録信頼性保証、および、論文の概要などからなる。調査対象は、ラット88、マウス53、ヒト27、その他27からなり、標的臓器は、神経系16、免疫系8、生殖系91、その他42、影響生体レベルは、細胞56、組織52、個体63、その他24、暴露期は、胚・胎児期35、周産期22、出生後41、成熟期54、その他株細胞45、などとなっている(集計途中)。

<sup>43</sup> 脚注12, 14を参照。

<sup>44</sup> 脚注12, 14を参照。

<sup>45</sup> 各種のリガンドは、ダイオキシン型、ベンツピレン(B[a]P)型、インディルピン型に分類され、前二者は、特有の毒性を示し、インディルピン型の主として食品などに由来する生体内代謝産物リガンドのそれは毒性は低いものと想定されている。

ロール(DES)の雌雄性器腫瘍や種々の異常発生には閾値が確認できなかつたとされているので、そうした機構が他の内分泌かく乱化学物質といわれる物質にも起こりえるものかどうか今後の調査の課題となる。

発がん性に関する知見に注目すると、低用量発がんに関する実験的検討では、ベンゼンヘキサクロリド( $\alpha$ BHC)の、ジエチルニトロソアミン(DEN)をイニシエーターとする発がん二段階法を用いた0.01ppmから500ppmまでの用量に対する検討が行われており、35週の実験結果で観察された腫瘍頻度は、0.1ppmに極小値を示す、非線形の、下に凸の頻度曲線が得られている<sup>46</sup>。他方、低用量域での高用量からの外挿を上回る発がん性を肯定する文献は見出されず、既存の発がん性に関する実験結果と符合している。またタモキシフェン(TXP)の高用量はE2アゴニストとして作用していることが知られているが、このことは、作用機作が用量によって異なることがあることを示唆している。周生期暴露の後期発がんに関する調査では、いずれについても、明らかな低用量作用は認められないと判断されている。男性性器がん、乳腺・女性性器癌に関する調査では、Ashbyらの追試によれば、von Saalらの観察した低用量作用の再現性は得られず、見解の統一に至っていない。この乖離について実験に与える影響因子としては、飼育条件、動物の遺伝背景、体重、飼料中の植物エストロゲン量などの要素が指摘されている。

### 3. 今後必要な調査研究等の課題の提言

本邦における内分泌かく乱化学物質の生体影響研究は、歴史が浅い。そうした相対的に短い研究期間ながら、この期、国際的に注目される知見が得られ、それらの研究が厚生労働科学研究として世界に発信されつつある点は評価されよう。他方、内分泌かく乱研究では、上記に通覧してきた通り、その試験法の面からも、リスクアセスメントの面からも、それぞれに認識の進展は著しいにもかかわらず依然として不明の点が多い。その理由は、この問題の基盤となる知見で新たな知見が集積しつつも、根幹に関わっていて解明されていない事柄にもとづいているように考えられる。したがって、今後の課題としては、そうした基盤研究の引き続く重要性を強調せざるを得ない。

以上によりさしあたり以下のような個別的な諸課題が引き続き検討されるべきと考えられる。

#### 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<sup>47,48</sup>。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も、研究上、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。例えば早発老化(premature ageing)を引き起こす可能性の指摘もあるが、その真偽も

<sup>46</sup> 6週令の雄性 F344 ラットを用い、DEN を週 1 回、3 週にわたって投与し、 $\alpha$ BHC をプロモーターとして低用量(0.01ppm)から 0.05、0.1、1.0、および高用量(50, 500ppm)が混餌投与されている。

<sup>47</sup> 脚注 1 に同じ。

<sup>48</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.



それに対するリスク認識も定まってはいない。但し、実験動物学的には、早発老化は、種々のエピジェネティックな発がん性の上昇や前倒しを引き起こすことが知られている。

### 高感受性期と低用量問題

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いる<sup>49</sup>。それらを、核内もしくは膜の受容体を介しての生体影響と考える考え方が示されている<sup>50</sup>。

これに対して、無処置の成体が検知できない用量オーダーにおける“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ことが必要との考え方もある。内分泌かく乱化学物質の危険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も必要である。

注) 米国医薬食品局(FDA)<sup>51,52</sup>や、同じく米国 EPA<sup>53</sup>の研究者らによって非線形反応性が確認されるとともに、英国の研究者らも低用量域に限局的ながら相加反応について一端の実験的事象を報告している<sup>54</sup>。これは、形態形成期である胎生期に特発的に影響する胎生期ウィンドウ現象とリンクするものと信じられている<sup>55</sup>。

### 生体影響の焦点－高次生命系

EDCs が高次生命系に与える影響は、生体作用影響研究の焦点となりつつある<sup>56</sup>。生理学的な知見に関しても未知の点が多く、しかも端緒的に明らかになっているこれまでに明らかになりつつある EDCs 関連の知見から見るならば、引き続き、免疫系、甲状腺-中枢神経系・行動などの領域についてのさらなる検討を進めることが必要と考えられる。

注) グローバルアセスメントの免疫系の記載は不十分であり、補充の必要がある。併せて、各種受容体結合域上流のスズやヒ素などによる xenobiotic element を介した免

<sup>49</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. 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不可逆反応としての変化が観察されている。

<sup>50</sup> 厚生科学研究（井上班）報告参照

<sup>51</sup> Guo TL, White KL Jr, Brown RD, Delclos et al. *Toxicol Appl Pharmacol*. 181: 219227, 2002.

<sup>52</sup> 脚注 29 参照。

<sup>53</sup> G. Ankley: Personal communication.

<sup>54</sup> Rajapakse N et al. *Environ Health Perspect* 110: 917-921, 2002./ Silva E et al. *Environ Sci Technol* 36: 1751-1756, 2002.

<sup>55</sup> 脚注 46 参照。厚生科学研究（井上班）報告。新生児期マウスの膈のエストロゲン作用臨界期は生後3日にあり、この時点での DES 投与後の影響がマイクロアレイ法を用いて解析されている。DES の投与により、上皮組織でのエストロゲン応答遺伝子(ER) のリン酸化を介した EGF 様成長因子-erbB 受容体系の活性化、引き続く MAPK や Akt などの系のリン酸化とそれに伴う AF-1 領域のリン酸化に至るエストラジオール非依存性のアクチベーションループが形成されることが、受容体阻害剤などを用いて示されている。

<sup>56</sup> ホルモンの概念は、すでに生物学的には細胞によって血中に放出されるサイトカインを含む体内すべての細胞機能に拡張されており、その受容体を有する組織は、EDCs の対象となる蓋然性をもつ。高次生命系は総じて記憶の仕組みを含む情報伝達システムを保持しており、免疫系の影響、神経・行動系への影響が焦点となるものと認識される。異物代謝との複合影響なども、取り残された研究課題である。

疫系シグナルへの修飾が、これらの複合作用の背景にあるものと考えられている。

### ゲノミクス手法による内分泌かく乱化学物質影響研究

バイオマーカーとなる遺伝子プロファイルの抽出の試みが進んでおり、これを更に進めてプロテオミクスを基礎としたバイオマーカーを同定することには、行政上のメリットが少なくない<sup>57</sup>。具体的手法としては、想定される EDCs で引き起こされ得る生体障害マーカーに特化したチップの構築<sup>58</sup>と、専ら遺伝子発現そのものを表現型として取り扱う（リバース・サイエンス法）方法<sup>59</sup>などが考えられる。

上記は、それぞれ用途に応じて有効性と考えられ、併せて以下の諸点の留意が必要である。

- ① 初期変化による長期変化の予測性の如何
- ② 用量相関に対する方法論と、用量特異的遺伝子プロファイリング
- ③ 複合効果の予測性（有力手段と考えられつつある）
- ④ 動物種間外挿性（相同表徴系に対応する遺伝子プロファイリング）
- ⑤ 試験管内細胞・組織と個体レベルでの遺伝子発現の相互相関性など<sup>60</sup>。

これらはとりもなおさず先の低用量問題であげた課題と重なり合う部分が少なくない。

ゲノミクス手法とともに、インフォマティクスの果たす今後の役割の重要性が焦点になっている。これら Omics 手法の導入については、WHO/IPCS がすでにベルリンにて<sup>61</sup>、また OECD が京都にて<sup>62</sup>ワークショップを開催し、留意すべき諸点などをまとめつつある。

以上、引き続き低用量問題を巡る（高）感受性問題の検討が必要である。特に低用量問題と関連した試験系については、ヒトの受精を人為的に抑制するような adverse effect を引き起こす用量での影響が、通常の実験動物の試験法で検知できないという、根本問題の解明が進んでいない。子宮腫大試験系が取り入れられた原点に立ち返って検討を進める必要がある。

第2にマイクロアレイ法などを用いたゲノム発現解析による今後の内分泌かく乱化学物質試験法の解明が必要となっている。マイクロアレイなどを用いたゲノム発現解析は、多くのマイクロアレイが背景メカニズムの解析に用いられるのに対して、むしろ遺伝子発現パターンを表現型として取り扱う、いわば現象論的な試験系であるが、相乗効果や用量特異的遺伝子発現にリンクしたバイオマーカー解析の有力手段になるものと考えられている<sup>63</sup>。

第3に、これらとの対比の中で、相対的に作用の弱い多くの一般化学物質での、実験報告に即したプライオリティ設定などによるプラクティカルな対応の可能性が同

<sup>57</sup> Watanabe H, Suzuki A, Mizutani T, Kohno S, Lubahn DB, Handa H, Iguchi. Genome-wide analysis of changes in early gene expression induced by estrogen. *Genes Cells*, 7: 497-507, 2002.

<sup>58</sup> *ChineChip<sup>TR</sup> Probe Array Technology*, Copyright 2000, Affymetrix, Inc.

<sup>59</sup> T. Inoue & W.D.Pennie (eds) *Toxicogenomics*. Springer, Tokyo, Berlin 2003, pp.3-11.

<sup>60</sup> Inoue T, Igarashi K, Sekizawa J. *JMAJ (Japan Medical Association Journal)* 46: 97-102, 2003.

<sup>61</sup> 2003年11月17-19日ドイツ連邦リスク評価研究所、ベルリン：Proceedings は印刷中。

<sup>62</sup> 2004年10月13-15日国立京都国際会館、京都：Proceedings は印刷中。

<sup>63</sup> 脚注60参照。

れる。