

# 内分泌かく乱作用に係る問題の 経緯について

(財) 残留農薬研究所毒性部

青山 博昭

# SPEED' 98に至る経緯

- 環境中に放出されたDDTによる野鳥の卵殻の菲薄化 (Nature, 1967) , 哺乳類の子宮および鳥類の卵管に対するエストロゲン様作用 (Science, 1968) の報告
- 1940年から1971年 (米国) にかけて流産防止のためと称して妊婦に投与された合成エストロゲン (DES) により, 出産した女児に若年性の腔癌 (Vaginal clear cell adenocarcinoma) が発生したとの報告 (Am. J. Obstet. Gynecol., 1973)
- スキャケベック博士らのグループが, 1938年から1991年の間に公表された文献を基に, 約50年の間にヒトの精子数がほぼ半減したと報告 (BMJ, 1992)
- Our Stolen Future (奪われし未来) の発刊 (1996)
- 環境省 (当時は環境庁) がSPEED' 98を公表 (1998)

# 内分泌かく乱物質に関する国民の懸念

発癌性がある  
かもしれない

生殖毒性がある  
かもしれない

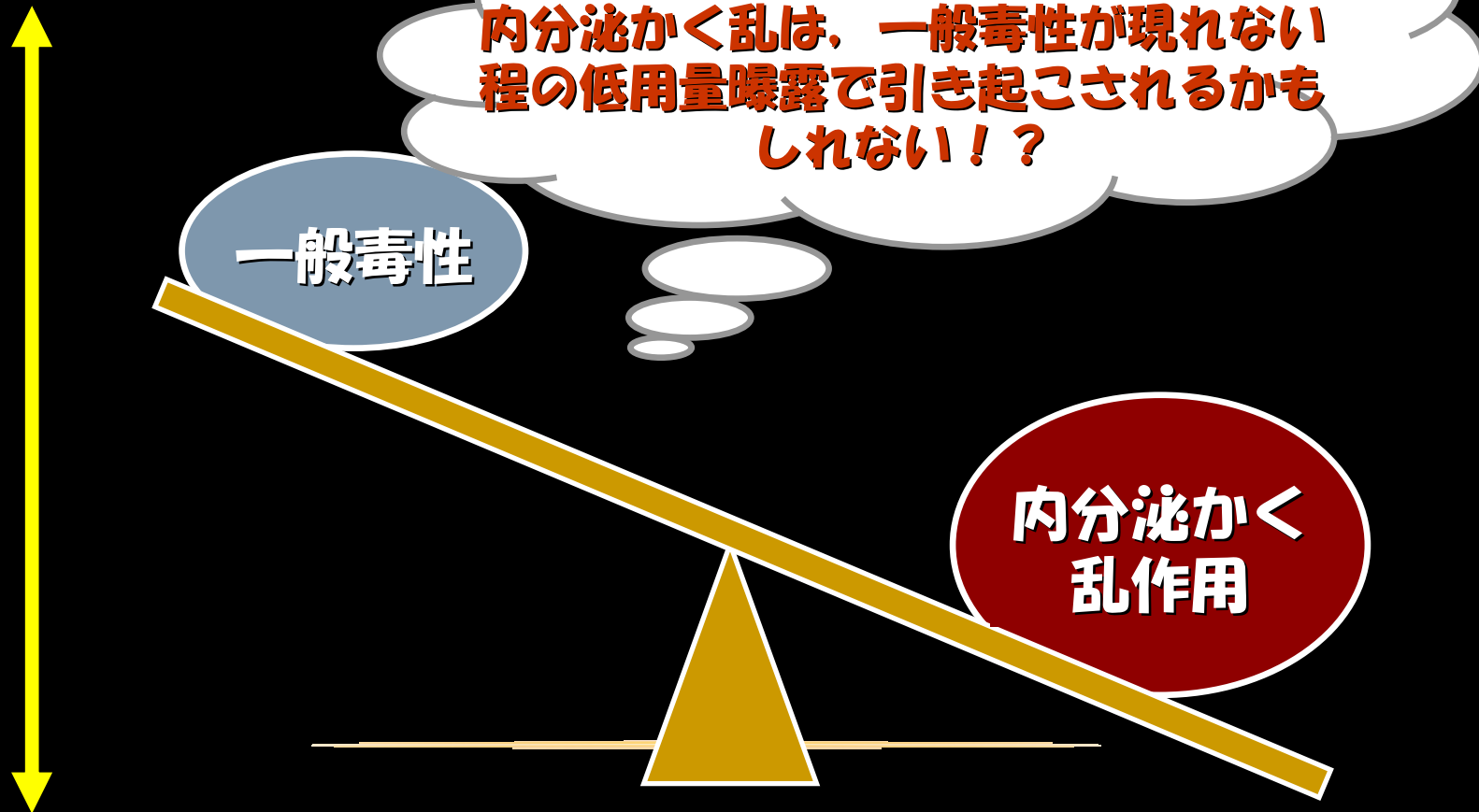
内分泌かく乱物質

免疫毒性がある  
かもしれない

神経毒性がある  
かもしれない

# 内分泌かく乱物質に関する国民の懸念

暴露濃度



**内分泌かく乱作用は特別な毒性なの？**

**落ち着いて  
冷静に考えてみよう！**

# Definition of Endocrine Disrupters (OECD)

## 内分泌かく乱物質の定義

*An endocrine disrupter is an exogenous substance that causes adverse effects in an intact organism, or its progeny, consequent to changes in endocrine function.*

**内分泌かく乱物質とは、内分泌機能の変化を介して無処置の（外科的に性腺を摘出するような処置を施していない）個体あるいはその子孫の健康に悪影響を及ぼす外来性物質である。**

# ヒトおよび野生生物に及ぼす 経口避妊薬（ピル）の効果と悪影響

---

**ヒト**

**排卵の抑制**

**受胎を回避できる  
(避妊成功)**

**Happy**

**野生生物**

**排卵の抑制**

**性比の偏り / 卵精巣形成**

**生殖器官や性行動の異常による  
不妊 / 性比異常による個体数減少**

**Unhappy**

---

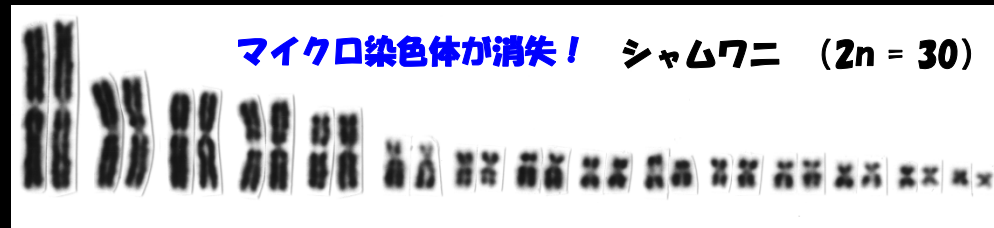
# 羊膜類の系統関係と核型および性決定様式



**Aves**  
**GSD**  
(zw)



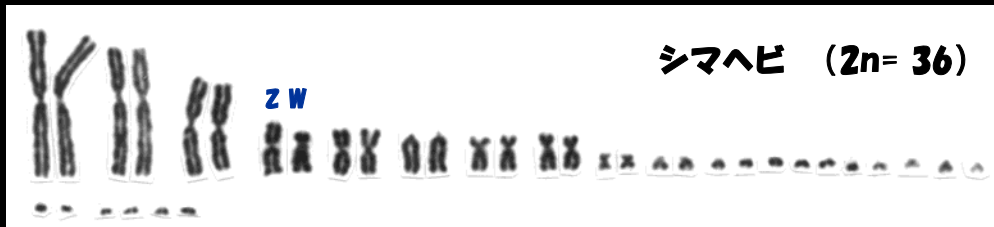
**Crocodylia**  
**TSD**



**Chelonia**  
**TSD / GSD**  
(zw / xy)



**Ophidia**  
**GSD**  
(zw)



**Mammalia**  
**GSD**  
(xy)





# 様々な化合物の持つ毒性に対する 正しい認識

# 従来の毒性学における毒性の分類

発癌性がある

催奇形性がある

催奇形性物質

発癌物質

内分泌かく乱物質は  
どこに  
分類するの？

# 作用機序（メカニズム）に基づく毒性の分類

肝臓や内分泌器官において  
酵素活性を修飾する作用

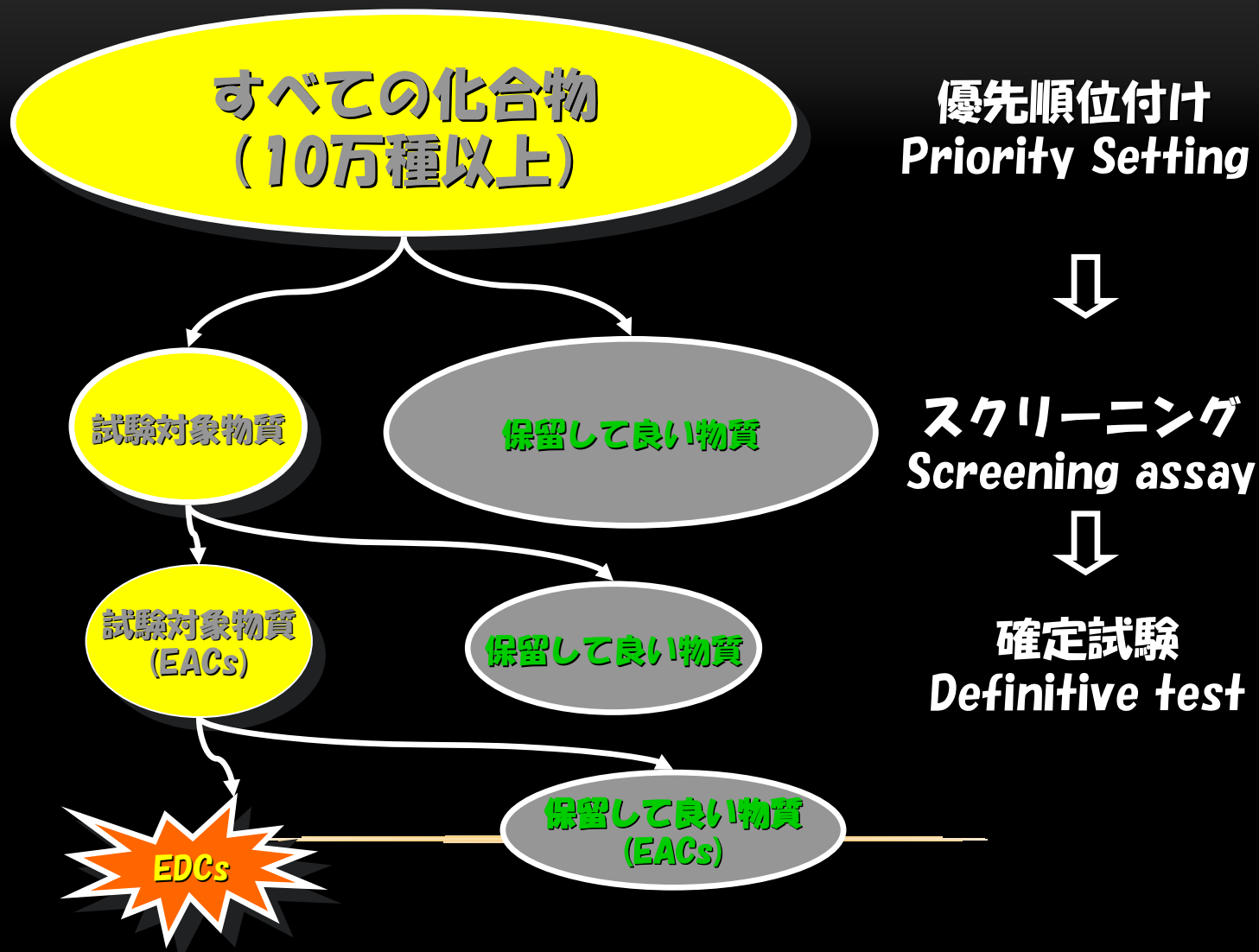
内分泌系に対する  
直接的な作用

遺伝子突然変異を誘発する作用

生殖・発生毒性

発癌性

# 提案された内分泌かく乱物質検出のためのスキーム



# OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals : OECDの内分泌かく乱物質検出基本戦略

<p><b>Level 1</b> Sorting &amp; prioritization based upon existing information</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- physical &amp; chemical properties, e.g., MW, reactivity, volatility, biodegradability,</li> <li>- human &amp; environmental exposure, e.g., production volume, release, use patterns</li> <li>- hazard, e.g., available toxicological data</li> </ul>	
<p><b>Level 2</b> <i>In vitro</i> assays providing mechanistic data</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>ER, AR, TR receptor binding affinity</b></li> <li>- Transcriptional activation</li> <li>- Aromatase and steroidogenesis <i>in vitro</i></li> <li>- Aryl hydrocarbon receptor recognition/binding</li> <li>- QSARs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- High Through Put Prescreens               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Thyroid function</li> </ul> </li> <li>- Fish hepatocyte VTG assay</li> <li>- Others (as appropriate)</li> </ul>
<p><b>Level 3</b> <i>In vivo</i> assays providing data about single endocrine mechanisms</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Uterotrophic assay (estrogenic related)</b></li> <li>- <b>Hershberger assay (androgenic related)</b></li> <li>- Non-receptor mediated hormone function</li> <li>- Others (e.g, thyroid)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fish VTG (vitellogenin) assay (estrogenic related)</li> </ul>
<p><b>Level 4</b> <i>In vivo</i> assays providing data about multiple endocrine mechanisms</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- enhanced OECD 407 (endpoints based on endocrine mechanisms)</li> <li>- male and female pubertal assays</li> <li>- adult intact male assay</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fish gonadal histopathology assay</li> <li>- Frog metamorphosis assay</li> </ul>
<p><b>Level 5</b> <i>In vivo</i> assays providing adverse effects data from endocrine &amp; other mechanisms for RA</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1-generation assay (TG415 enhanced)<sup>1</sup></li> <li>- 2-generation assay (TG416 enhanced)<sup>1</sup></li> <li>- reproductive screening test (TG421 enhanced)<sup>1</sup></li> <li>- combined 28 day/reproduction screening test (TG 422 enhanced)<sup>1</sup></li> </ul> <p><sup>1</sup> Potential enhancements will be considered by VMG mamm</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Partial and full life cycle assays in fish, birds, amphibians &amp; invertebrates (developmental and reproduction)</li> </ul>

# 内分泌かく乱作用評価バッテリー (ヒトに対する内分泌かく乱作用の予測)

## Screening (スクリーニング・テスト)

### *In vitro* tests (試験管内実験)

- Receptor Binding Assay (受容体結合試験)
- E-Screen (細胞増殖試験)

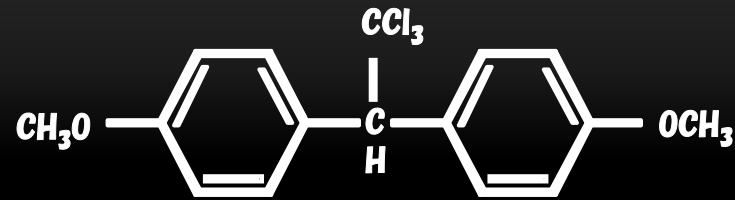
### *In vivo* tests (動物実験)

- Uterotrophic Assay (子宮肥大試験)
- Hershberger Assay (ハーシュバーガー試験)
- Enhanced TG 407 (補強型TG407試験)
- Teratogenicity Study (催奇形性試験)
- Two-Generation Reproduction Study (2世代試験)

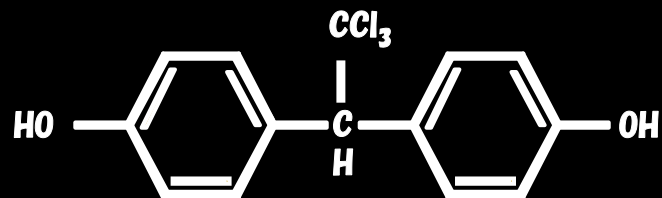
## Definitive (確定試験)

# Methoxychlor and its major estrogenic metabolite, HPTE

メトキシクロルと、エストロゲン様作用を持つ代謝物 (HPTE)

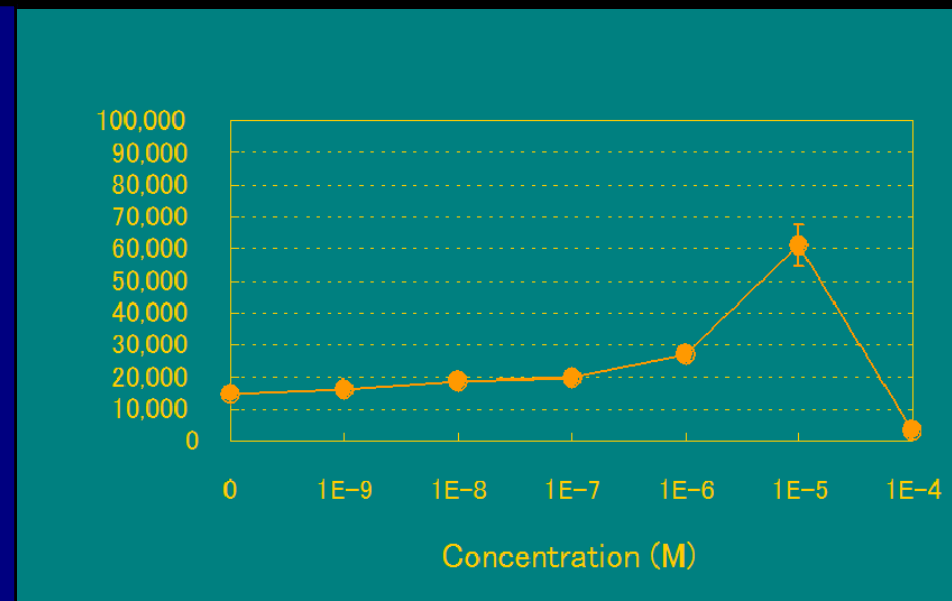
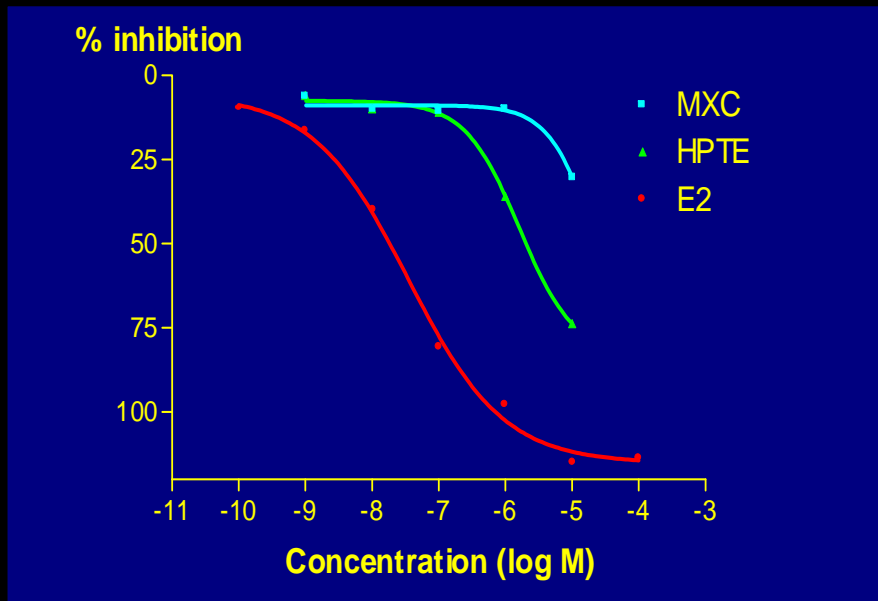


**Methoxychlor**



**Hydroxyphenyltrichloroethane  
(HPTE)**

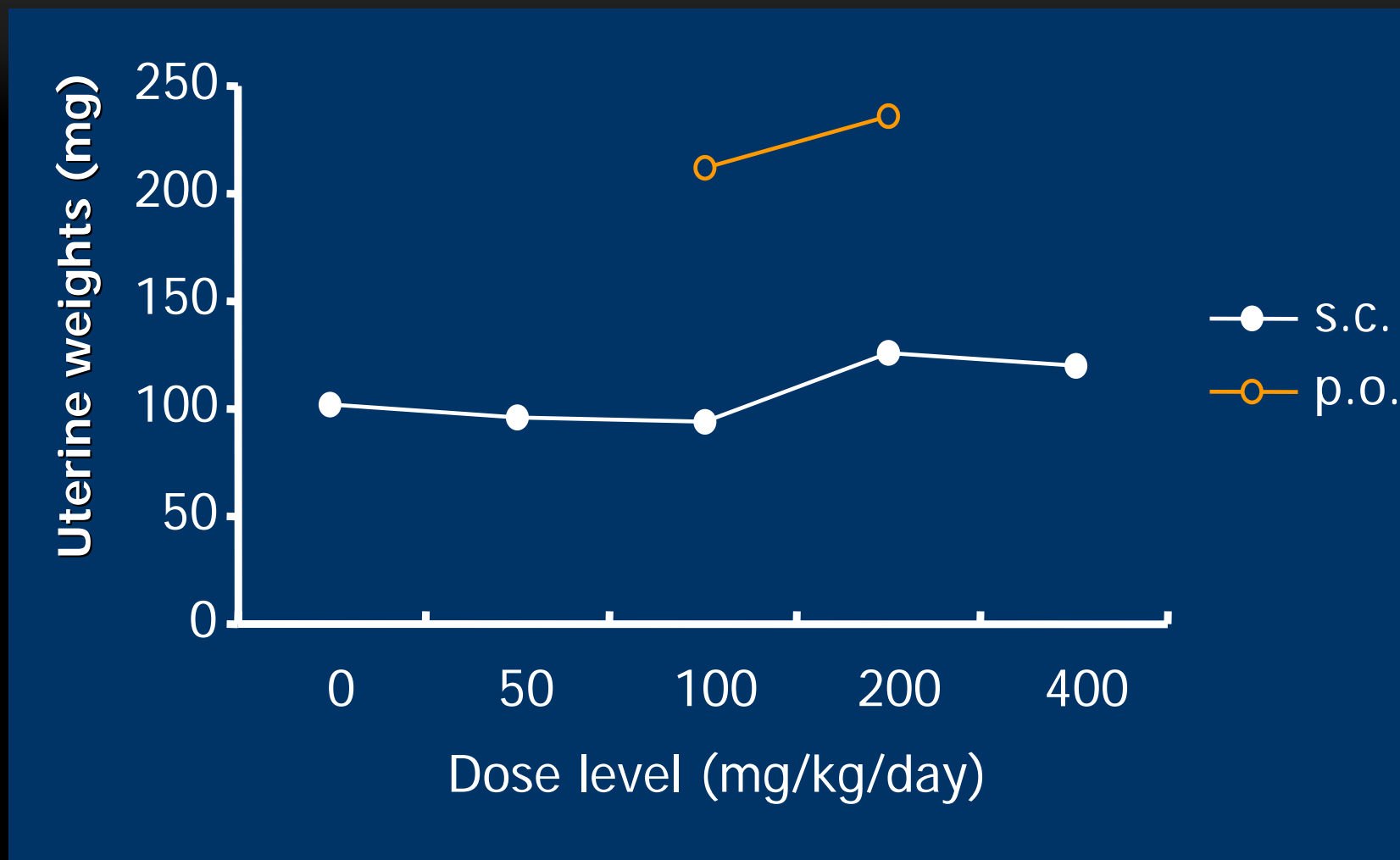
# 試験管内試験で検出された メトキシクロルのエストロゲン様作用 Receptor binding assay with ER-alpha/E-screen assay





# 卵巣摘出雌ラットによるメトキシクロルの子宮肥大試験

Results of uterotrophic assay in ovx rats with MXC



## メトキシクロルの2世代繁殖試験（ラット）における親動物の体重増加量 Group mean body weight gains (g) of parental rats treated with methoxychlor

世代	曝露濃度 (ppm)	雄親動物 (Mean ± S.D.)		雌親動物 (Mean ± S.D.)		
		交配前育成期	全試験期間	交配前育成期	妊娠期間	哺育期間
F0	0	352 ± 34	444 ± 46	164 ± 20	142 ± 22	2 ± 19
	10	360 ± 44	473 ± 62	160 ± 22	150 ± 21	7 ± 15
	500	260 ± 29***	327 ± 38***	117 ± 10***	127 ± 21	29 ± 11***
	1500	181 ± 21***	235 ± 27***	99 ± 13***	105 ± 22***	38 ± 17***
F1	0	433 ± 47	540 ± 69	224 ± 23	144 ± 17	3 ± 16
	10	448 ± 44	558 ± 58	227 ± 27	158 ± 15	6 ± 17
	500	325 ± 32***	407 ± 43***	170 ± 14***	131 ± 18	31 ± 13***
	1500	254 ± 28***	289 ± 25***	161 ± 12***	90 ± 21***	48 ± 17***

\*\*\*:有意水準 (p) < 0.001で統計学的に有意.

## メトキシクロルの2世代繁殖試験（ラット）における親動物の繁殖成績 Reproductive data for parental rats treated with methoxychlor

世代	曝露濃度 (ppm)	性周期が 正常であ った雌	交尾率		妊娠率	出産率	平均着床数 (mean ± S.D.)	平均出産児数 (mean ± S.D.)
			雄	雌				
F0	0	23/24	22/23	23/23	22/23	22/22	15.6 ± 2.6	13.7 ± 2.6
	10	24/24	23/24	24/24	19/24	19/19	15.7 ± 1.7	13.1 ± 3.0
	500	23/24	22/23	23/23	20/23	20/20	13.4 ± 2.5*	11.1 ± 3.2*
	1500	24/24	22/24	23/24	18/23	18/18	10.1 ± 2.5**	7.6 ± 2.9***
F1	0	24/24	20/24	22/24	20/22	20/20	15.4 ± 2.4	12.9 ± 2.8
	10	24/24	23/24	24/24	19/24	19/19	15.8 ± 2.9	14.2 ± 2.6
	500	24/24	24/24	24/24	23/24	23/23	12.1 ± 2.7**	10.5 ± 2.4*
	1500	18/23*	20/23	22/23	10/22**	10/10	8.2 ± 2.1***	7.0 ± 2.4***

交尾率 = (交尾した雄または雌の数 / 交配した雄または雌の数).

妊娠率 = (妊娠した雌の数 / 交尾した雌の数).

出産率 = (正常に出産した雌の数 / 妊娠した雌の数).

\*, \*\* and \*\*\*: 有意水準 (p) < 0.05, 0.01 または 0.001 で統計学的に有意.

# メトキシクロルの影響を調べた一連の試験結果

---

## 試験の種類

## 結果

---

### 試験管内実験

**ER binding assay**

+ (エストロゲン様作用あり)

**E-screen**

+ (エストロゲン様作用あり)

### 動物実験

**Uterotrophic assay**

+ (エストロゲン様作用あり)

**Hershberger assay**

- (アンドロゲン様作用なし)

**Developmental Tox.**

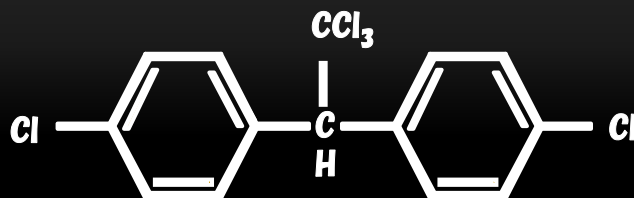
- (催奇形性作用なし)

**Two-gen. Repro. Tox.**

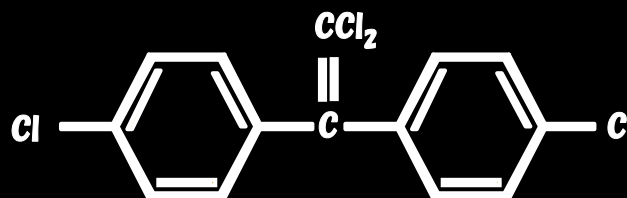
+ (明らかな生殖毒性あり)

---

***p,p'*-DDT and its major anti-androgenic metabolite, *p,p'*-DDE**  
***p,p'*-DDTと、抗アンドロゲン作用を持つ代謝物 (*p,p'*-DDE)**



**1,1'-(2,2,2-Trichloroethylidene)bis[4-chlorobenzene]**  
***p,p'*-DDT**



***p,p'*-DDE**

# p,p'-DDTの影響を調べた一連の試験結果

## 試験の種類

## 結果

### 試験管内実験

ER binding assay

+ (エストロゲン様作用あり)

E-screen

+ (エストロゲン様作用あり)

### 動物実験

Uterotrophic assay

- (エストロゲン様作用なし)

Hershberger assay

- (アンドロゲン様作用なし)

Enhanced-TG407

+ (ホルモンバランスの乱れ)

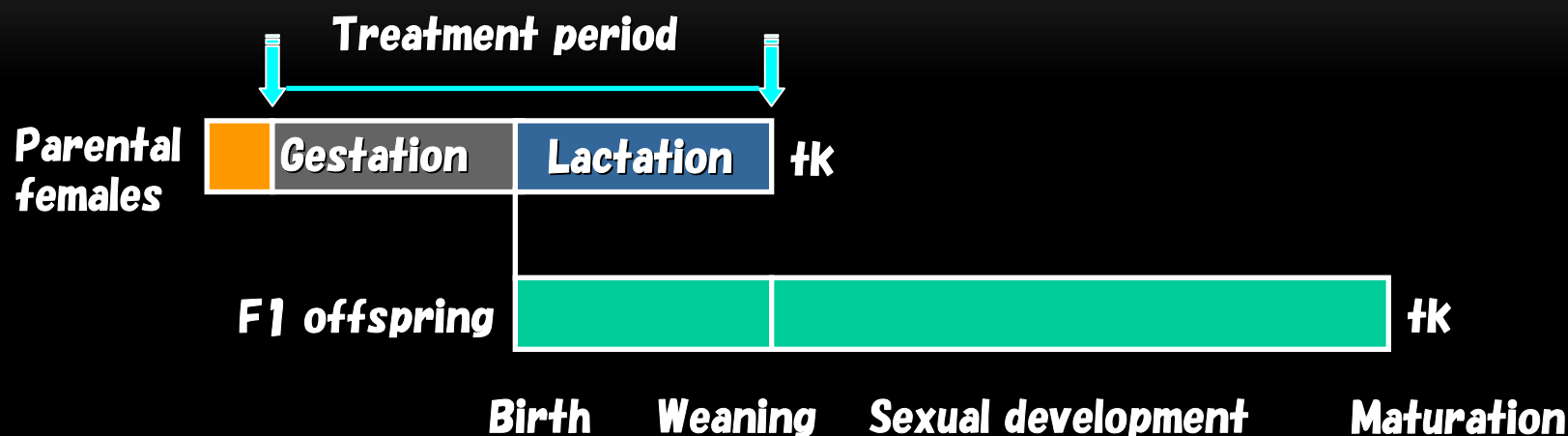
Developmental Tox.

- (催奇形性作用なし)

Two-gen. Repro. Tox.

+/- (ホルモンバランスがやや乱れたが、生殖毒性は検出されず)

# SPEED' 98における取り組みの1例： Wistar Hannover GALASラットを用いた1世代繁殖毒性試験



- リストに掲載された化合物について、我々が現実に曝露を受けるような低濃度の影響を評価した。
- クローズドコロニー由来の系統（Wistar Hannover GALAS）を用いた。
- 動物には、通常的基础飼料（植物エストロゲンを含むCE-2）を与えた。
- 被験物質の投与期間は、妊娠0日から哺育21日までとした。
- 強制経口投与、基礎飼料または飲水への混合により、被験物質を曝露した。
- すべての出産児を間引きすることなく哺育させ、離乳後に各検査に割り振った。

# 試験を実施した化合物と曝露用量

Name of chemicals	Dose levels		Name of chemicals	Dose levels	
	$\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ (low doses)	$\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$		$\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ (low doses)	$\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$
<b>Aldrin</b>	<b>0, 0.1, 0.5, 2.5, 12.5</b>	<b>1</b>	<b>Dipentyl phthalate</b>	<b>0, 2, 10, 50, 250</b>	<b>1000</b>
<b>Amitrole</b>	<b>0, 0.5, 5, 50</b>	<b>100, 1000</b>	<b>Dipropyl phthalate</b>	<b>0, 2, 10, 50, 250</b>	<b>2000</b>
<b>Benzophenone</b>	<b>0, 2, 10, 50</b>	<b>20, 100</b>	<b>Endrin</b>	<b>0, 0.2, 1, 5, 25</b>	<b>0.4</b>
<b>Bisphenol A</b>	<b>0, 0.473, 2.24, 11.8, 53.8</b>	<b>500</b>	<b>Heptachlor</b>	<b>0, 0.05, 0.5, 5</b>	<b>1, 3</b>
<b>Butylbenzyl phthalate</b>	<b>0, 2, 12, 60, 300</b>	<b>500</b>	<b>Hexachlorobenzene</b>	<b>0, 0.04, 0.4, 4, 40</b>	<b>40</b>
<b>Cys-Chlordane</b>	<b>0, 0.1, 0.5, 2.5, 12.5</b>	<b>10</b>	<b><i>beta</i>-Hexachlorocyclohexane</b>	<b>0, 0.1, 0.5, 2.5, 12.5</b>	<b>5</b>
<b><i>p,p</i>-DDD</b>	<b>0, 0.2, 1, 5, 25</b>	<b>300</b>	<b>Malathion</b>	<b>0, 1, 5, 25, 125</b>	<b>300</b>
<b><i>p,p</i>-DDE</b>	<b>0, 0.03, 0.3, 3, 30</b>	<b>50</b>	<b>Mirex</b>	<b>0, 0.02, 0.2, 2, 20</b>	<b>2</b>
<b><i>o,p</i>-DDT</b>	<b>0, 0.2, 1, 5, 25</b>	<b>50</b>	<b>4-Nitrotoluene</b>	<b>0, 1, 5, 25, 125</b>	<b>100</b>
<b><i>p,p</i>-DDT</b>	<b>0, 0.2, 1, 5, 25</b>	<b>10</b>	<b><i>trans</i>-Nonachlor</b>	<b>0, 0.05, 0.5, 5, 50</b>	<b>10</b>
<b>Di-<i>n</i>-butyl phthalate</b>	<b>0, 31, 63, 125, 250, 500</b>	<b>250</b>	<b>4-Nonylphenol (branched)</b>	<b>0, 6.9, 23.2, 70.9, 234</b>	<b>-</b>
<b>2,4-Dichlorophenol</b>	<b>0, 0.8, 4, 20, 100</b>	<b>400</b>	<b>Octachlorostyrene</b>	<b>0, 2.4, 12, 60, 300</b>	<b>50</b>
<b>Dicyclohexyl phthalate</b>	<b>0, 1.6, 8, 40, 200</b>	<b>500</b>	<b>4-<i>t</i>-Octylphenol</b>	<b>0, 3, 10, 30, 100</b>	<b>-</b>
<b>Dieldrin</b>	<b>0, 0.1, 0.5, 2.5, 12.5</b>	<b>1</b>	<b>Pentachlorophenol</b>	<b>0, 0.5, 5, 50, 500</b>	<b>30</b>
<b>Di-2-ethylhexyl adipate</b>	<b>0, 15, 150, 1500, 15000</b>	<b>600</b>	<b>Permethrin (mixture isomer)</b>	<b>0, 0.5, 5, 50, 500</b>	<b>100</b>
<b>Di-2-ethylhexyl phthalate</b>	<b>0, 10, 50, 250, 1250</b>	<b>100</b>	<b>Tributyltin chloride</b>	<b>0, 10, 30, 100, 300</b>	<b>2</b>
<b>Diethyl phthalate</b>	<b>0, 0.4, 2, 10, 50</b>	<b>2000</b>	<b>Triphenyltin chloride</b>	<b>0, 1.1, 11, 107, 370</b>	<b>1.117</b>
<b>Dihexyl phthalate</b>	<b>0, 2, 10, 50, 250</b>	<b>500</b>			



# 基礎飼料中における 植物エストロゲン濃度の変動

Diets	Lot no.	Contents of Phytoestrogens (mg/kg or ppm)				
		Daidzin	Daidzein	Genistin	Genistein	Coumesterol
CE-2	E2022	120	4.1	160	4.2	3
	E2062	120	5.8	160	6.9	2
	E2093	62	19	83	32	>1
	E2110	87	>5	120	>5	2
	E2041	120	>5	160	>5	5

もしも体重 300 g のラットが1日 当り20 gの基礎飼料を食べるとしたら、  
 対照群のラットが1日当りに摂取する植物エストロゲンの総量は平均でも  
 約17 mg/kgとなり、しかもその量は飼料のロットにより異なる。

# 基礎飼料中における汚染物質 (フタル酸エステル類) 濃度の変動

Lot no. of CE-2	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) of contaminants		
	Di-2-ethylhexyl Phthalate	Di-n-butyl phthalate	Nonylphenol
E2022	380	— (25 >)	22
E2062	350	55	ND
E2093	240	— (25 >)	ND
E2110	130	— (25 >)	ND

ND: Not determined.

もしも体重 300 g のラットが1日 当り20 gの基礎飼料を食べるとしたら、  
 対照群のラットが1日当りに摂取するDEHPの量は平均でも20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ とな  
 り、しかもその量は飼料のロットにより異なる。

# SPEED' 98における取り組みの成果

内分泌かく乱作用が疑われた65物質（群）について、

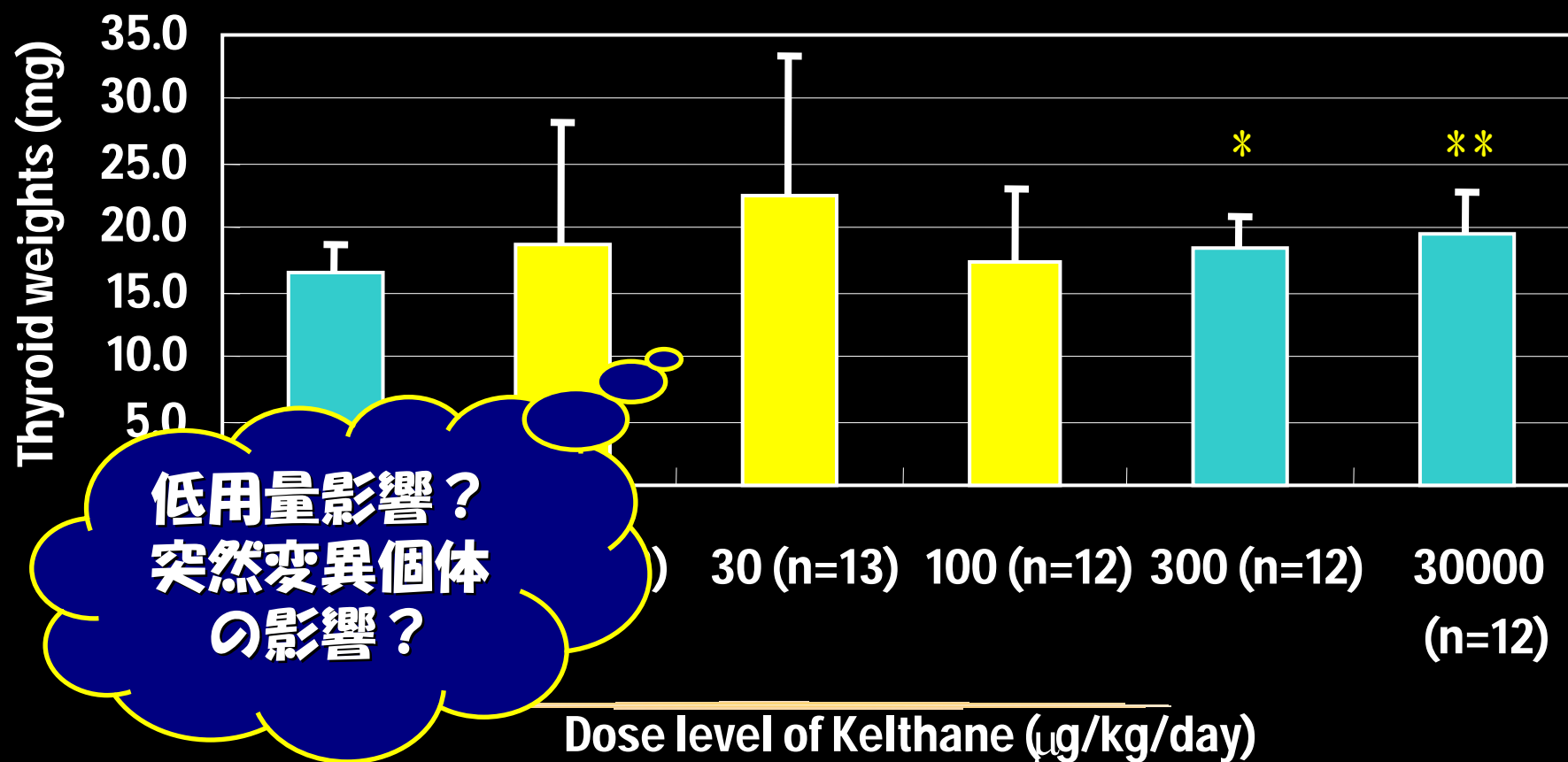
- 水質、底質、土壌、および大気中の濃度を測定した。
- 水生生物、野生生物および食事試料中の濃度を測定した。
- イボニシ（海産の巻貝）の雌における生殖器形成異常と、環境中の有機スス濃度との関連を確認した。
- 魚類に及ぼす影響を評価するためにメダカを用いた試験法を開発し、28物質を選んで試験を実施して、4-ノニルフェノール（分岐型）、4-tert-オクチルフェノールおよびビスフェノールAのメダカに対する内分泌かく乱作用を示唆した。
- アフリカツメガエル、ウスラ、オオミジンコなどを用いる試験法を開発した。
- ヒトに及ぼす影響を評価するためにラットを用いる1世代繁殖試験法を開発し、28物質を選んで試験を実施して、いずれの物質にもヒトが現実に曝露を受けるような低用量域では明らかな内分泌かく乱作用が認められないことを明らかにした。

# ExTEND2005における取り組み

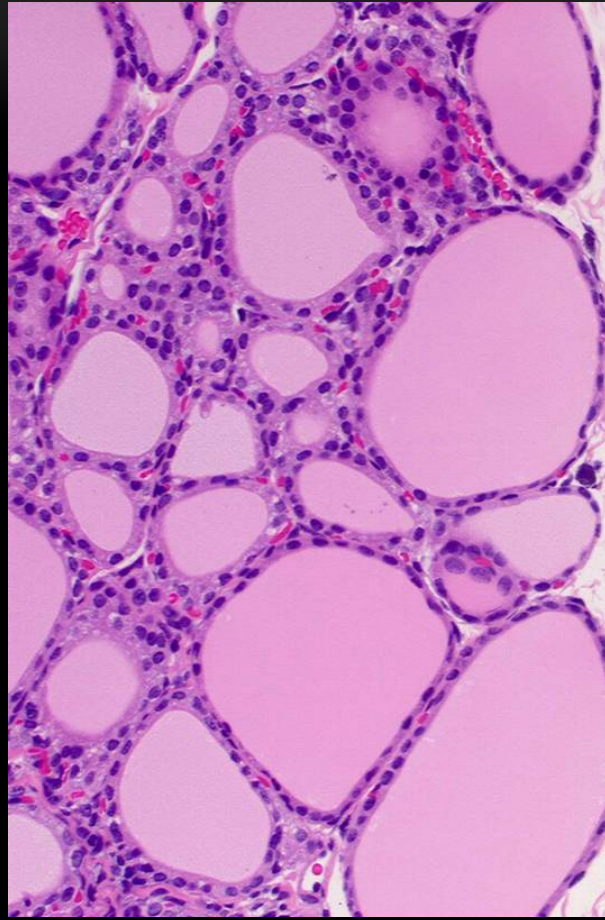
SPEED' 98における取り組みの成果を基に、反省すべき点は反省して、以下のプロジェクトを促進した。

- 野生生物の観察
- 環境中濃度の実態把握および曝露の測定
- 基盤的研究の推進
- 影響評価
- リスク評価およびリスク管理
- 情報提供とリスクコミュニケーション等の推進

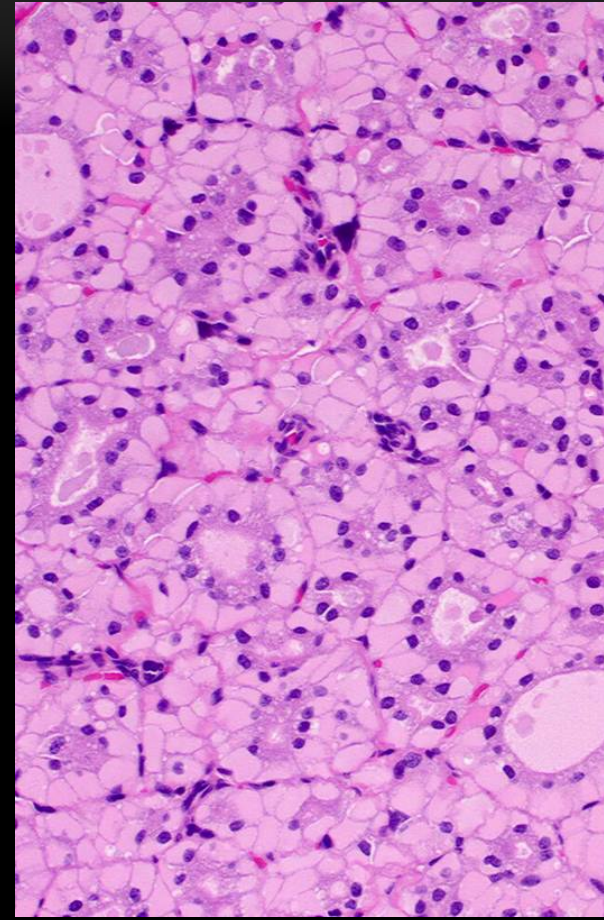
# ExTEND2005における取り組みの1例： 見かけ上の逆U字型用量反応関係の解析 母親の甲状腺重量の変動（ケルセンの1世代試験）



# ケルセンの1世代試験において、低用量群で観察された甲状腺の組織学的異常



正常な甲状腺



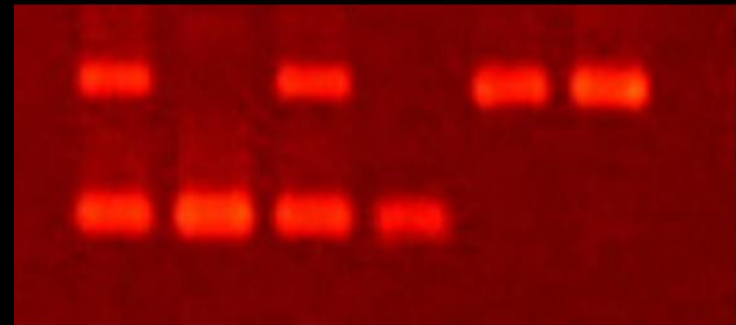
異常個体の  
重量が増加した甲状腺

# Wistar Hannover GALAS ラットに観察される 矮小症：甲状腺異常症の原因遺伝子解析



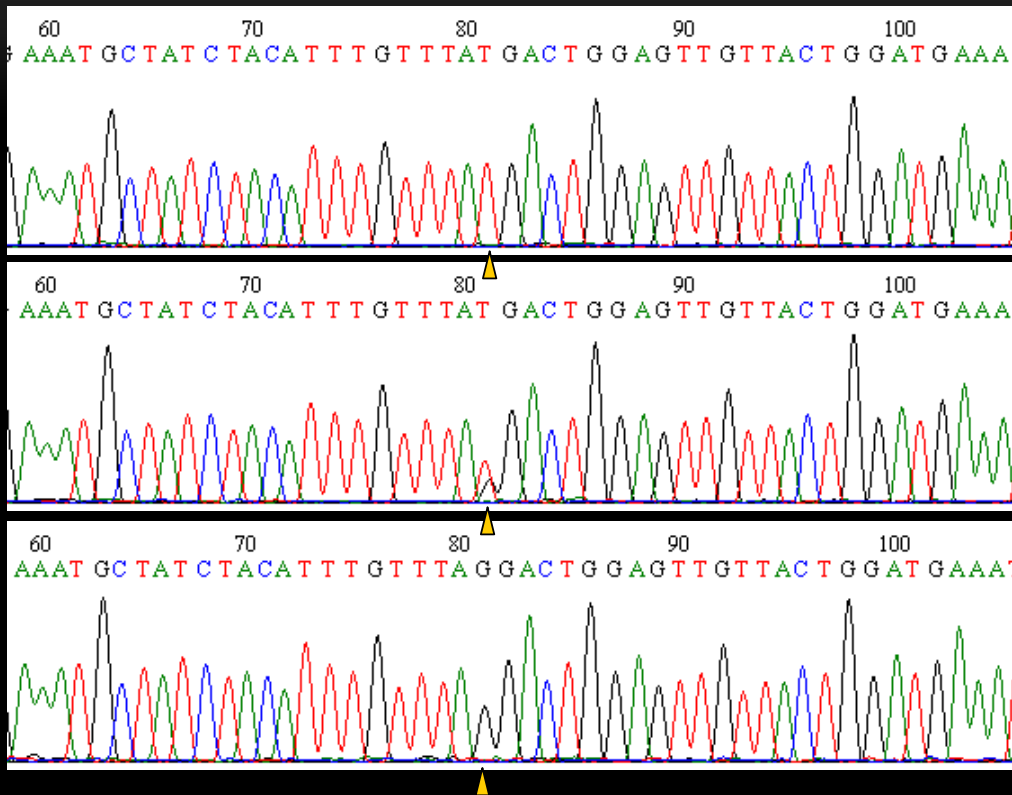
矮小個体と表現型正常な同腹児  
(突然変異遺伝子をヘテロにもち、甲  
状腺に組織学的異常がある)

Hetero Dwarf Hetero Dwarf Wild (SD) Wild (SD)



サイログロブリン遺伝子の  
電気泳動像  
(cDNA including exon 7)

# 第6イントロン/第7エクソン近傍領域の塩基配列



正常個体

変異遺伝子ヘテロ個体  
(外表は正常/甲状腺は肥大)

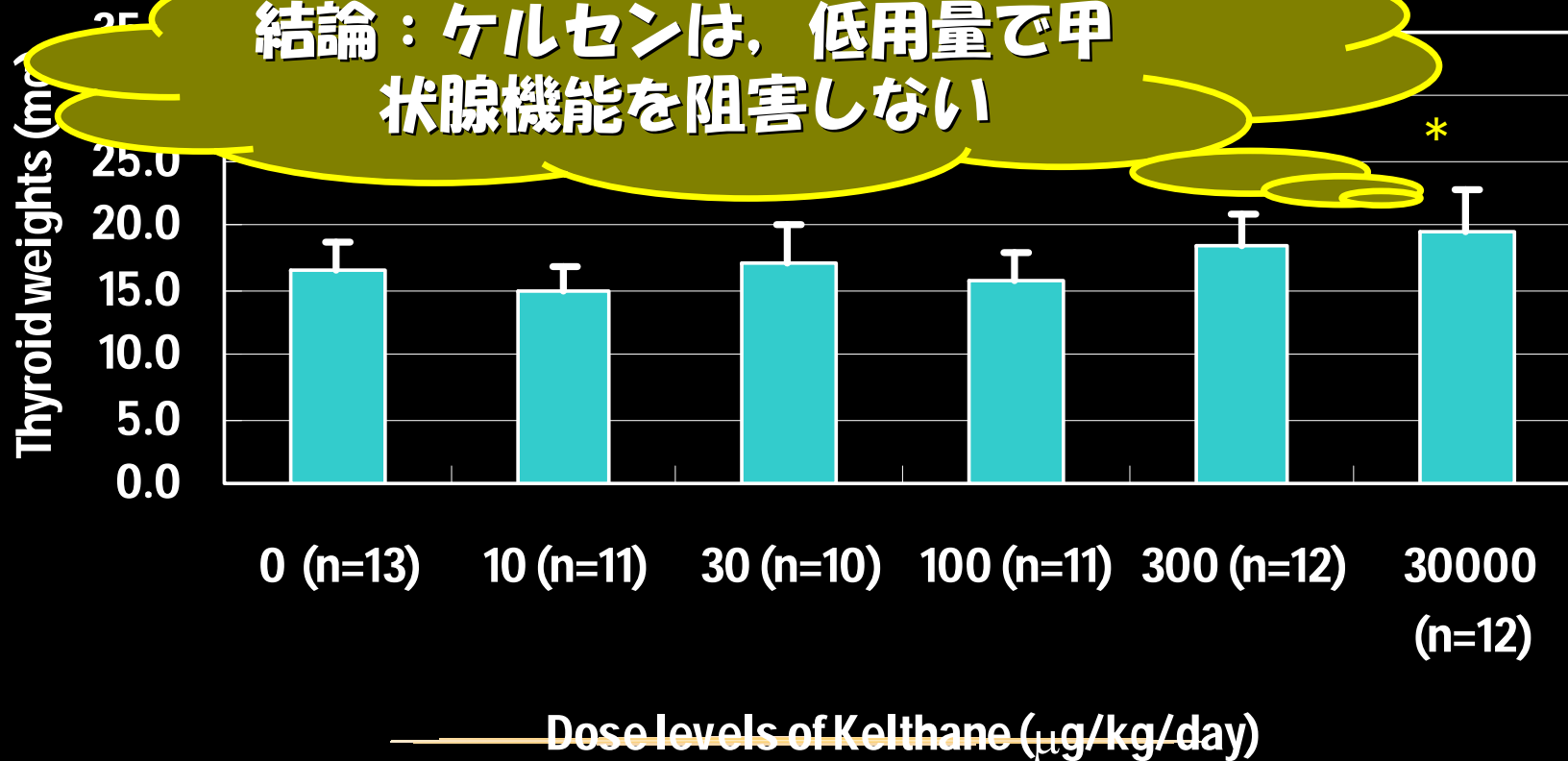
変異遺伝子ホモ個体  
(矮小/甲状腺は肥大)

サイログロブリン遺伝子の第6イントロン末尾 (Splice acceptor site) に「T」→「G」のSNP (1塩基置換) が存在するため、非翻訳領域の最後を意味する「AT」という配列を失って、第7エクソンが翻訳されない。



# 突然変異個体を除外後の用量反応関係 (突然変異個体を除外した後の解析)

結論：ケルセンは、低用量で甲状腺機能を阻害しない



# EXTEND2010の取り組みと成果



乞ご期待！