

平成30年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する
公開セミナー

2019年1月15日(火) 東京国際交流館 プラザ

内分泌かく乱物質研究から28年： 今までの経験から今後の展開へ



井口泰泉

横浜市立大学大学院
生命ナノバイオサイエンス研究科

自然科学研究機構・基礎生物学研究所



内分泌かく乱物質問題が始まってから、今年で28年になります。

内分泌かく乱物質とは、ホルモン作用を意図して作った物質ではないのですが、特に女性ホルモン、男性ホルモンや甲状腺ホルモンと似た作用、あるいはこれらのホルモンの作用を邪魔する働きを持つ物質で、生物に対して悪影響を及ぼす物質のことを指しています。

私は、内分泌かく乱物質問題の始まりからの歴史的な流れをお話しします。現在どのような研究や試験が行われているかについては、私の後の講演(山本先生、中村さん)にご期待ください。

内分泌かく乱物質問題の経過



1991	コルボーンによるウイングスプレッド会議から28年
1992	コルボーン、クレメント “Chemically-Induced Alteration in Sexual and Functional Development” 出版
1996	コルボーンらによる「奪われし未来」出版から23年
1997 1月	ホワイトハウス会議 (ワシントンD.C., スミソニアン博物館) 内分泌かく乱物質に関する省庁間会議の設置
1998	OECD 内分泌かく乱物質の試験法開発の開始から21年
1998 5月	当時の環境庁による Strategic Programs on Environmental Endocrine Disrupters '98 (SPEED '98) : 調査研究の開始から21年
1998 6月	環境ホルモン学会 (日本内分泌攪乱化学物質学会)発足 から21年
2000 4月	ミレニアムプロジェクト (物質の評価)
2002, 2013	WHO 報告書
2004 11月	ノニルフェノール、オクチルフェノール、ビスフェノールA、DDTのメダカへの悪影響 (ラットへの悪影響は見られない)
2015	OECD TG240, TG241 確定試験の確立
2016	内分泌かく乱研究から25年 (NIH/NIEHS)、2018: EU EDCのクライテリア

内分泌かく乱物質問題の今までの取組のまとめです。レイチェル・カーソンは、1962年の『沈黙の春』で、鳥の集団の減少は毒性の強い農薬が原因となっていることことを指摘しました。それを受けて、DDTをはじめとした毒性の強い農薬は禁止されました。それから20年以上経過しているのに、まだ集団が回復していないのは何故か、を話し合うために、コルボーン先生がミネソタ州のウイングスプレッドで会議を開いた、1991年を内分泌かく乱問題の始まりとしています。

その会議に参加された先生方が書いた総説をまとめたのが1992年の本です。この本と、その後の数年間の色々な研究をいろんな現状をもとにして書かれたのが『奪われし未来』という、化学物質の生物影響をわかりやすく解説した、一般的な読み物です。

「奪われし未来」の出版を受けて、1997年1月に、スミソニアン博物館の地下で、当時副大統領だったアル・ゴアの肝入りで会議(ホワイトハウス会議)が開かれました。日本からは、当時の環境庁の課長さん、厚生労働省の医薬品食品衛生研究所の井上先生と私が参加しました。このホワイトハウス会議を受けて、日本では、1998年に省庁連絡会議が始まりました。

1998年には環境ホルモン学会も設立されて、当時は2,000人以上の方が参加されていました。

2002年には、WHOがそれまでに発表されていた論文を集めて、生物への影響と物質との因果関係の有無についてまとめました。その10年後にも、研究の進展や、残されている問題などについて報告書を作成しました。

環境庁は、1998年にSPEED '98の戦略のもとに、内分泌かく乱物質と推定される物質のリストをつくりました。物質を測定するためには、どの物質を測定するかを決めなければなりません。日本の環境中の内分泌かく乱作用が疑われる物質の濃度を調べるプロジェクトが始まりました。

2004年は、まだOECDの試験法が開発されていなかったため、日本としては、メダカとラットを使って、産卵直後の卵、あるいは妊娠中の親に物質を投与して、どんな影響が出るのかを調べてみました。ラットへのいろいろな物質の試験では悪影響は見られませんでした。しかし、メダカを使った試験では、ノニルフェノール、オクチルフェノール、ビスフェノールA、DDTが、産卵数の低下や精巣での卵の形成(精巣卵)を引き起こしました。

2016年には、ワシントンにあるNIH(米国健康科学研究所)で、内分泌かく乱研究から25年、という会議が開かれました。内分泌かく乱物質問題の始まりとされるウイングスプレッド会議から25年、「奪われし未来」の出版から20年、NIEHS (米国環境健康科学研究所)設立50年、米国内分泌学会設立100年と、色々な節目の年でした。2018年にはEUの内分泌かく乱物質のクライテリアが決まりました。

Several Books which Proposed the Chemical Risk



先程も御紹介しましたが、レイチェル・カーソンさんが、1962年に『沈黙の春』で、毒性の強い農薬の問題を指摘しました。日本では、有吉佐和子さんの『複合汚染』という本があります。右側の、『Our Stolen Future』は、コルボーン、ピーターソン・マイヤーズとダイアン・ダマノスキさんの3人が書いた本で、「奪われし未来」と翻訳されています。

下の真ん中の本は、『メス化する自然』と訳されていますが、これはBBCのディレクターだったデボラ・キャドバリーさんが、BBCの放送のための取材をもとにして書いた本です。いずれの本も、化学物質の健康影響や野生生物への影響の懸念を指摘しています。

今日の話

- 内分泌(ホルモン)、内分泌系の調節(エストロゲン、アンドロゲン、甲状腺ホルモン)、
- ホルモン受容体の解明、ホルモン受容体に結合する化学物質
- 哺乳類、爬虫類、両生類、魚類のホルモン、ホルモン受容体の相違
- ホルモン受容体を介した悪影響: 発生中(胎児)への影響・試験法へ



内分泌と言われているホルモンについての説明、ホルモンはどのように調節されているかについて、特に女性ホルモン、男性ホルモン、甲状腺ホルモンを中心に簡単に説明したいと思います。

また、ホルモンごとに、ホルモンを受け取る特定の蛋白質(受容体)が、決まっています。女性ホルモンには女性ホルモン受容体があります。女性ホルモン受容体が無ければ女性ホルモンは全く作用しません。

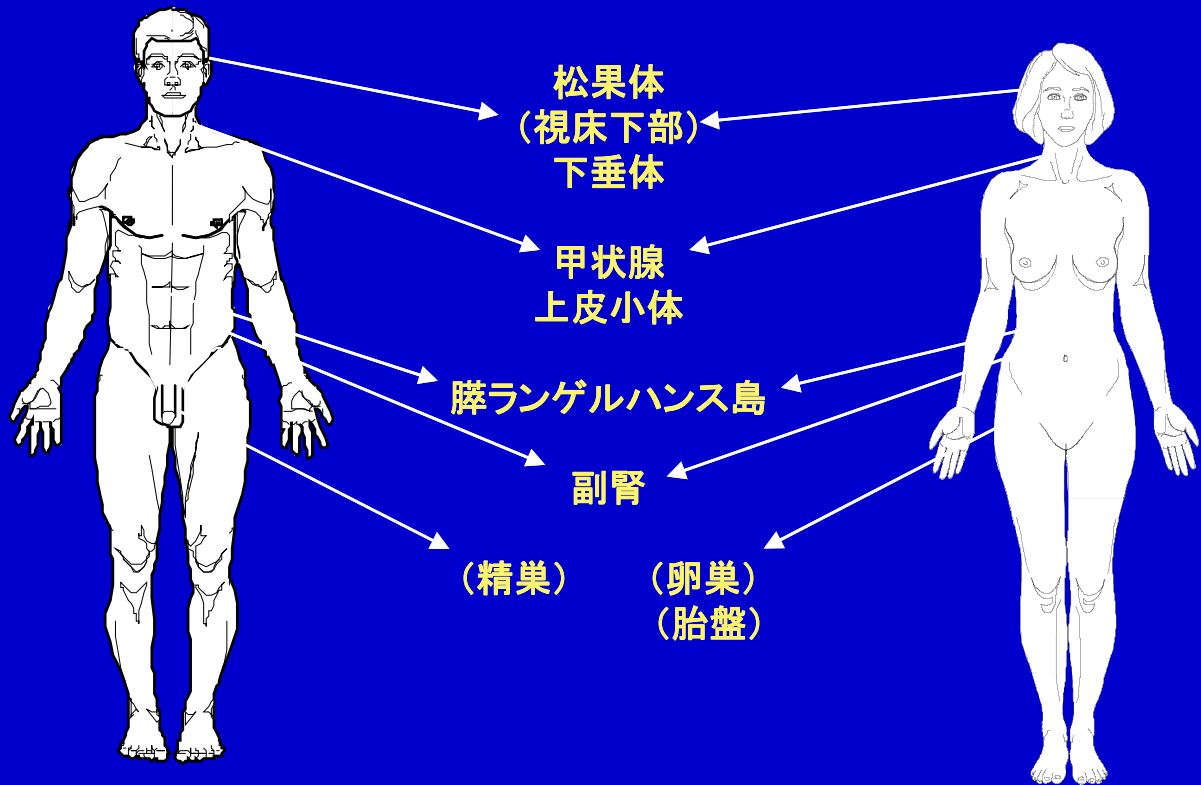
ホルモン受容体はいつ頃、誰が見つけたかという話もしたいと思います。

経済協力開発機構(OECD)では、ミジンコ、魚、カエルやネズミなどの、色々な動物を用いて、内分泌かく乱作用が疑われる物質の影響を調べるための試験法を開発しています。魚類は、日本ではメダカ、ヨーロッパではゼブラフィッシュ等を、またミジンコも使っています。

ホルモン受容体が無ければそのホルモンを投与しても何も起こりません。内分泌かく乱というのは、化学物質がホルモン受容体に結合して、不必要な時に余計な蛋白質を作らせたり、あるいはホルモンの働きを邪魔したりすることによって起こります。化学物質がホルモンの代わりに働いて、本来ホルモンが動かす遺伝子を勝手に動かしてしまうというのが問題とも言えます。今日の話で最も重要なことは、影響を受けやすいのは、ヒトでは大人ではなくて、胎児期ですし、マウスやラットでは胎児期から生まれて数日以内までです。ホルモンや化学物質に感受性の強い時期を「臨界期」と呼んでいます。

OECDでは、ラット、カエル、メダカやミジンコなどを用いて、物質の影響を調べる試験法を作っています。これは、次の演者の山本先生からお話いただけたと思います。

主な内分泌器官



5

ホルモンを分泌する内分泌器官では、脳底にある視床下部はホルモン調節の中樞です。すぐその下に下垂体(脳下垂体)があり、視床下部からの刺激を受けて、脳下垂体から、例えば甲状腺、卵巣、精巣、副腎などにホルモンを作れという指令を出します。精巣からはアンドロゲン(男性ホルモン)、卵巣からエストロゲン(女性ホルモン)、甲状腺からは甲状腺ホルモンが作られます。また、これらのホルモンが十分量作られると、それらのホルモンが視床下部に作用して、ホルモンを作る指令を止めさせる、負のフィードバックがあります。ホルモン量が不足すると視床下部からの刺激が下垂体を刺激してホルモンを作らせる刺激がそれぞれの器官に運ばれてホルモンが分泌されます。ホルモン量が多くなると、視床下部に届いて、ホルモン分泌を刺激するホルモンの分泌を止めるという、負のフィードバックにより、必要な量のホルモン量が体内にあるように調節されています。

我々に体の恒常性(ホメオスタシス)を維持するためには、内分泌系と免疫系と神経系が重要です。

ホルモン・内分泌の特徴

- ホルモンの語源は、「刺激する」「呼び覚ます」を意味するギリシャ語「ホルマオ」。
 - 細胞間情報伝達物質(化学伝達物質)
 - 極めて微量で恒常性維持(pg~ng/mL、 $10^{-6} \sim 10^{-12}$ mo/L)
 - 導管を介さず血管内へ分泌
 - 運搬経路として洞様毛細血管が発達(有窓血管)
 - 受容体を有する標的細胞に作用
 - 比較的 low 分子(ポリペプチド、糖蛋白、アミン、ステロイド、チロシン)
 - フィードバック機構により分泌制御
-
- ホルモンとは古典的概念として定義されている。
 - 一般に内分泌器官としては下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、膵島、(視床下部、精巣、卵巣)をいう。
 - 内分泌腺以外でもホルモン? 産生
腎(レニン・アンジオテンシン・エリスロポエチン)、消化管(セロトニン・ガストリン) 脂肪(レプチン)、心房(ANP)、唾液腺導管(EGF・NGF)、血管内皮(エンドセリン) 等
 - ホルモン以外の細胞間情報伝達物(神経伝達物質、免疫グロブリン、サイトカイン、EGF、NGF、IGF、など)

唾液、汗、消化液などは管を通して口の中、皮膚、胃、腸などの外に出るので外分泌と言います。これに対して、ホルモンは細胞で作られて、直接血管に入り他の臓器に運ばれて作用したり、近くの細胞やホルモンを分泌した細胞自身に作用をすることもあり、内分泌と呼ばれています。ホルモンのことを化学伝達物質とも言います。

ホルモンの量は非常に少なく、体の中ではpg~ng程度です。女性ホルモンはpgオーダーですし、男性ホルモンはngオーダーです。1円玉は1gですが、その1/1000が1mg、さらに1/1000が μ g、さらに1/1000がng、さらに1/1000がpgです。化学物質がホルモンのように作用すると言うときに、極めて微量で作用するということになりますが、化学物質が作用するときには、それなりの量がないと作用しません。

女性ホルモンと似た作用をする物質は女性ホルモンの受容体に結合します。ホルモンと受容体は、鍵と鍵穴とも言えます。ホルモンが鍵で受容体が鍵穴です。それは1:1の関係にあります。しかし、女性ホルモンの受容体には色々な物質が結合します。進化的には、女性ホルモンの受容体がホルモンの受容体としては最初に作られて、男性ホルモン受容体、副腎皮質ホルモン受容体、甲状腺ホルモンの受容体ができたと考えられています。

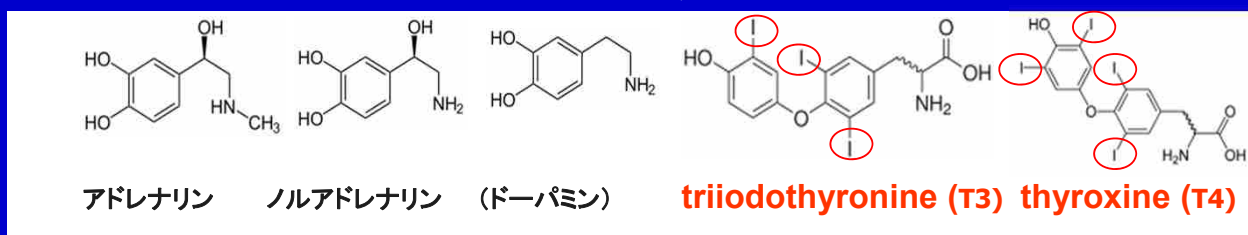
甲状腺ホルモンの受容体に結合する物質は、ほとんどありません。医薬品として合成された物質があるだけです。水酸化PCBが結合して弱いですが甲状腺ホルモンの働きを邪魔する事は知られています。

男性ホルモンの受容体に結合する物質はかなり見つかっています。200種類の農薬を調べたら、60種類程度は結合したという報告がありましたが、男性ホルモン作用は無く、男性ホルモンの阻害作用が見出されています。

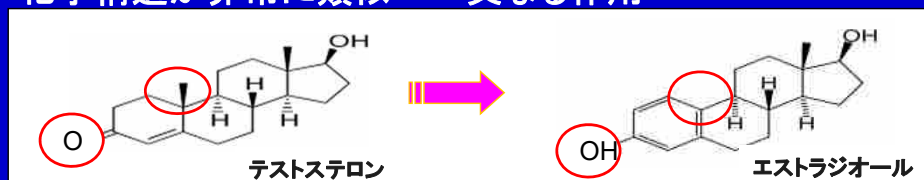
女性ホルモンの受容体に結合するものがどれくらいあるかは、後でお話しします。

ホルモンの化学的性状

- アミノ酸:チロシン誘導体(カテコラミン・甲状腺ホルモン)
カテコラミン:水溶性、甲状腺ホルモン(T3, T4):脂溶性

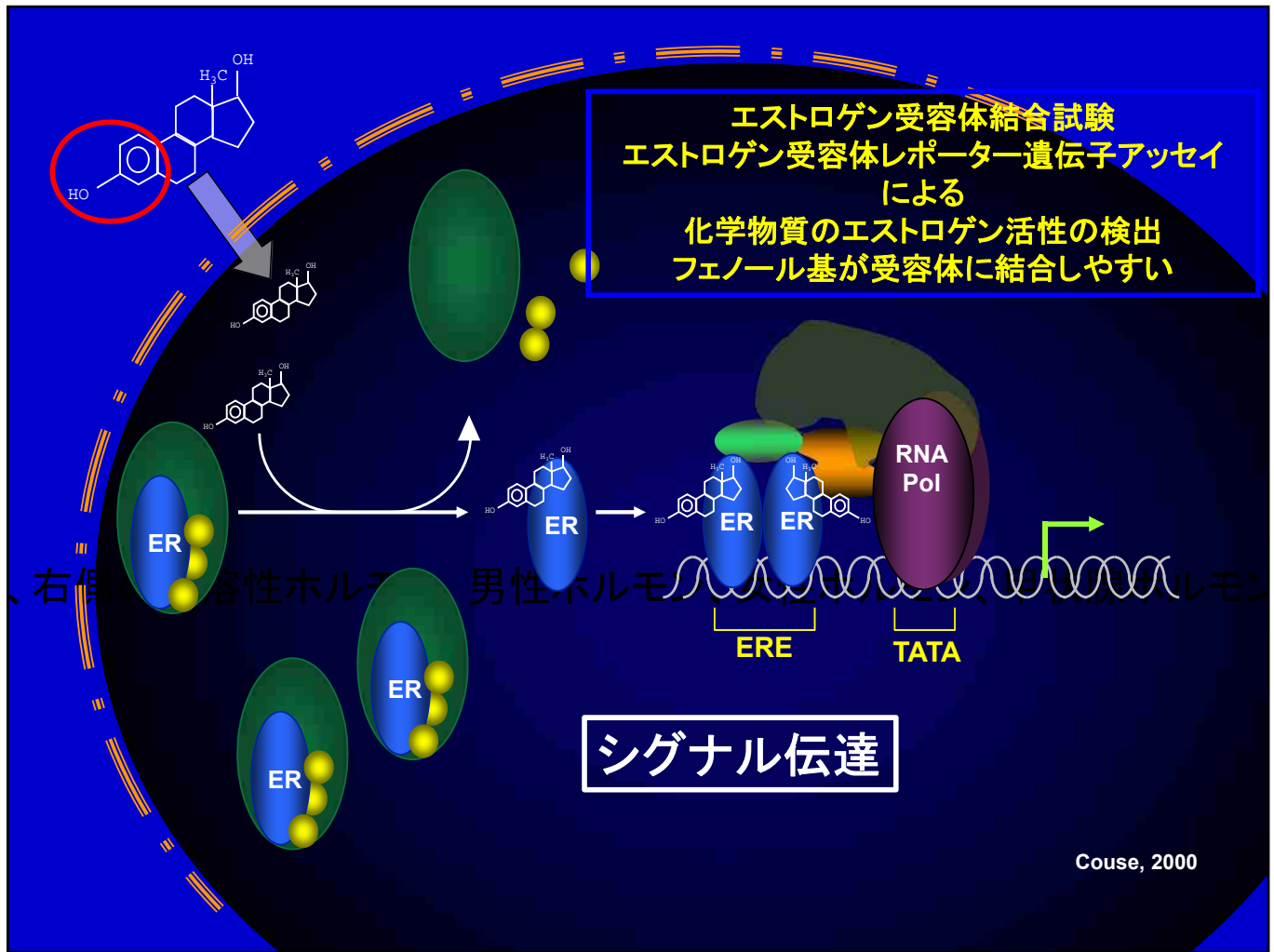


- 蛋白・ペプチド :水溶性
大分子量プレプロホルモン→プレホルモン→ホルモン
視床下部ホルモン、下垂体ホルモン、膵島ホルモン、上皮小体ホルモン
- ステロイド・脂肪酸誘導体:コレステロール - 副腎皮質ホルモン - 黄体ホルモン - 男性ホルモン(テストステロン) - 女性ホルモン(エストラジオール)
- 化学構造が非常に類似 ↔ 異なる作用



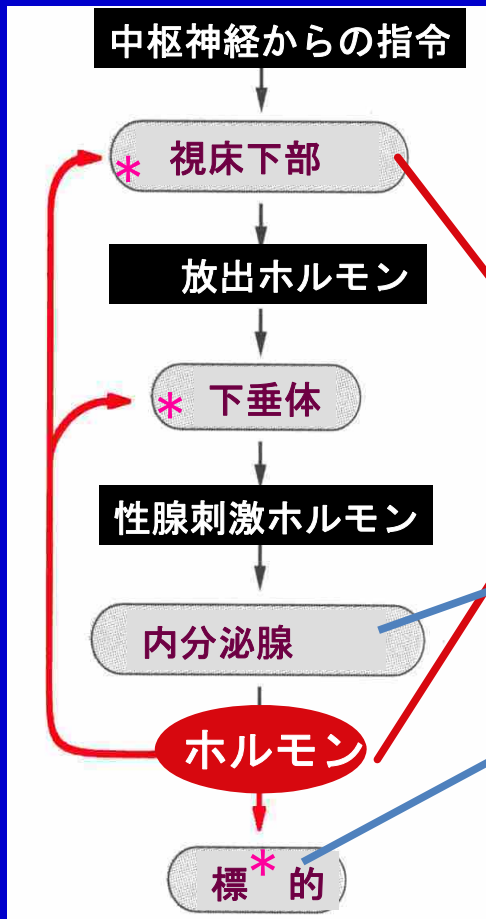
ホルモンの構造ですが、上の白抜きのところの右2つ、丸の中のIはヨードです。ベンゼン環が2つつながったところにヨードが4つ付いた形のサイロキシンという形で分泌されますが、作用する時には、ヨードが1個外れて、T3となり、強い甲状腺ホルモン作用をもちます。

下の白抜きのところは、左が男性ホルモン(テストステロン)、右側が女性ホルモン(エストラジオール)の構造を示していますが、非常によく似ています。違うところは丸のところですが、男性ホルモンは最初の亀の甲のところの左にOが付いていますが、女性ホルモンはOHになっています。亀の甲の構造にOHが付いたものをフェノールといいますが、こういう構造を持った化学物質が女性ホルモン受容体に結合して女性ホルモン作用を発揮すると考えられています。



男性ホルモン、女性ホルモン、甲状腺ホルモンは、受容体が核の中(濃い青部分)に存在しています。化学伝達物質であるホルモンは細胞の核の中にあるホルモン受容体に結合して、遺伝子発現のスイッチをオンにするなどの、シグナルとなります。

内分泌系の一般構造 ＝フィードバック系



・ホルモン受容体へホルモンが結合
(エストロゲンなどのステロイドホルモンの場合は核内受容体に結合する)

フィードバック・ループ

ホルモン産生の場
(卵巣・精巣・甲状腺など)

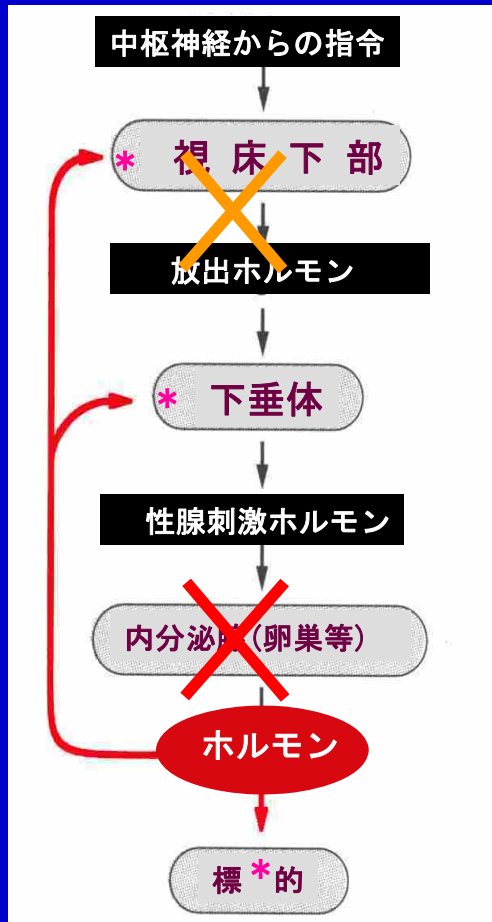
標的臓器
(エストロゲンの場合、子宮・乳腺など)
(アンドロゲンの場合、前立腺など)
(甲状腺の場合、全身)

卵巣で女性ホルモンが作られるためには、視床下部から生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンが分泌されて、下垂体を刺激し、濾胞刺激ホルモンと黄体刺激ホルモンが出て、卵巣に運ばれて卵巣を刺激することが必要です。また、卵巣からエストロゲン(女性ホルモン)が十分量分泌されると、逆に視床下部に働いて、生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンの分泌を押さええます。これをフィードバック機構と呼んでいます。

OECDでは、化学物質に女性ホルモン作用があるか無いかをみるときに、卵巣(左図の内分泌腺)を除去したネズミを使います。卵巣を摘出して1週間で、女性ホルモンの標的器官の子宮は小さく、軽くなります。視床下部—下垂体から女性ホルモンを出せという指令が出て、卵巣がないので女性ホルモンは作られないからです。つまり、視床下部—下垂体—内分泌腺(卵巣や精巣)のフィードバックを切断します。卵巣を摘出したネズミに化学物質を数日間投与して子宮の重量を測定し、子宮重量の変化により、女性ホルモン作用の強さを判断します。これを子宮重量増加試験と言います。

化学物質の男性ホルモン作用を見る場合には、精巣を摘出した雄を用いて、前立腺の重量を測定することになります。

生体を用いたアッセー系

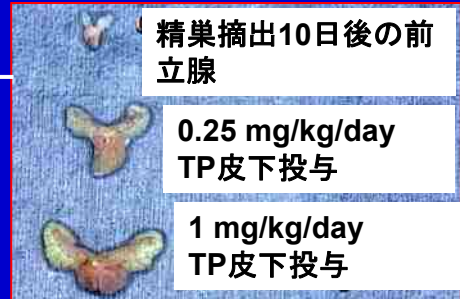


フィードバック・ループの破壊により、
外来性のホルモン様作用物質の影響が
高感度に検出できる。

子宮肥大試験



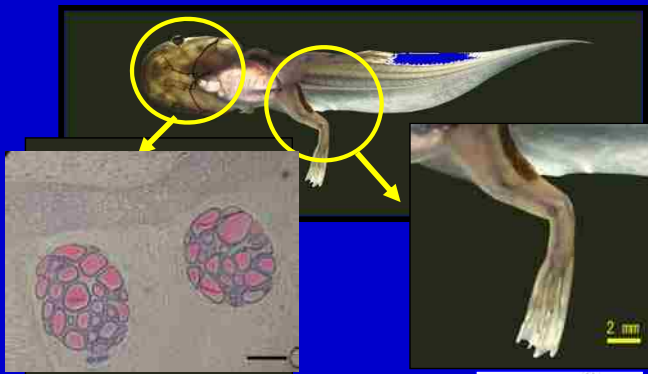
前立腺肥大試験
ハーシュバーガー
試験



右側の図の左側の子宮は、卵巣がついていますから非常に大きいですが、右側は卵巣を取って1週間で子宮が非常に細くなります。こういうネズミに化学物質を3日間投与して子宮重量を調べます。男性ホルモンの場合は、精巣を除去すると、右側の下から3番目、前立腺が小さくなっています。ここに男性ホルモンを投与すると、男性ホルモンの強さによって前立腺が大きくなっていく。これは女性ホルモン作用と男性ホルモン作用を調べるために1920年代に開発された方法です。

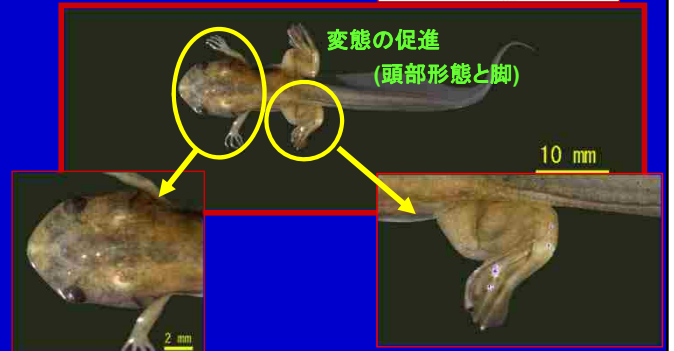
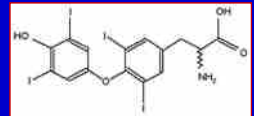
甲状腺ホルモンのかく乱による変態異常

Control



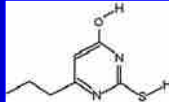
T4

$C_{15}H_{11}I_4NO_4$

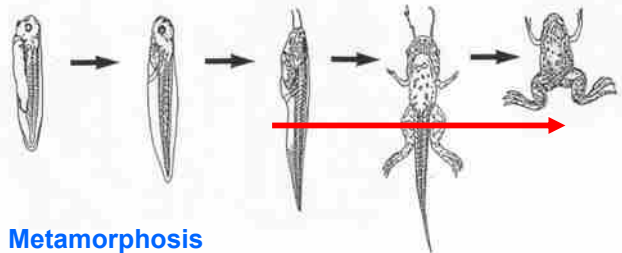


PTU

$C_7H_{10}N_2OS$



ホルモン合成阻害剤



Metamorphosis

Thyroid hormones

(-) inhibition

(+) Acceleration

オタマジャクシは手足が伸び、尾が短くなってカエルに変態します。この変態に甲状腺ホルモンが必要であることがわかっています。オタマジャクシの早い時期に甲状腺ホルモンを飼育水に添加すると、右側の上図のように、小さいカエルになります。甲状腺ホルモンの合成阻害物質を添加して、ヨードを取り込めないようにしてしまうと、甲状腺ホルモンは作れないので、オタマジャクシは大きくなるのですが、左下の図のように、足が小さい、あるいは濃度によっては全くできないという、変態阻害が起こります。

OECDでは、哺乳動物で甲状腺ホルモンの作用を調べる良い方法がなかったので、オタマジャクシを使う試験系を開発しました。もともと、カエルのためのカエルの試験として開発したものではありませんでしたが、勿論カエルのための試験としても使えます。この方法は、両生類変態試験で、化学物質の甲状腺ホルモン作用と抗甲状腺ホルモン作用を調べることができます。

哺乳動物と爬虫類、両生類、魚類、ミジンコの相違

	哺乳動物	爬虫類	両生類	魚類
性決定	Sry	温度 (ワニ、カメ、トカゲの一部)	Dmw (アフリカツメガエル) 変態: 甲状腺ホルモン	Dmy (メダカのみ)
性ホルモン	T, 5 α -DHT			11-KT(ケトテストステロン)
ステロイド合成	エストラジオール	エストロイド合成系は共通		
エストロゲン受容体	ER α , ER β			3-4種類
アンドロゲン受容体	AR 1種類			2種類
アロマターゼ	1種類			2種類
エストロゲンの影響				
発生影響	膣がん	メス化	メス化(精巣卵)	メス化(精巣卵)
成体影響	子宮肥大	オスでも肝臓で卵黄タンパク(ビテロゲニン)産生		
アンドロゲンによる二次性徴	髭、筋肉		母指隆起 nuptial pad	メダカ: 尻鰭、背鰭 カダヤシ: 尻鰭伸長

ミジンコ (単為生殖): 脱皮ホルモン、幼若ホルモン: 幼若ホルモンでオスを産仔
雄分化への遺伝子は類似(Double sex 1)

これは哺乳類から魚類までの、性決定、ホルモン合成系、二次性徴などの比較表です。

ステロイドホルモンの合成系は哺乳類から魚類までほぼ同じです。哺乳類から両生類までは男性ホルモンはテストステロン(T)ですが、魚類は11-ケトテストステロン(11-KT)という形になります。女性ホルモンは魚類まで全く同じです。

ホルモン受容体については、女性ホルモン受容体は、哺乳類から両生類までは2種類、男性ホルモン受容体は1種類です。魚類はその倍の3~4種類あるいは2種類あります。魚類だけ、ゲノム重複が起こっているため受容体が倍あるのです。

ホルモンによる悪影響の例もまとめておきました。女性ホルモンをマウスの胎児や生まれたばかりの新生仔に投与すると、膣がんができます。卵の中で発生中のワニとか、カメなどの爬虫類、両生類、魚類では、女性ホルモンにより雄の雌化が起こります。魚類では精巣中に卵ができるという精巣卵も知られています。成体のマウスに女性ホルモンを投与すると子宮が大きくなりますが、ワニから魚までは雄の肝臓が卵黄タンパク(ビテロゲニン、ビテロジェニン)を作ります。

化学物質の女性ホルモン作用を見るために、雄の魚の飼育水に化学物質を添加してビテロジェニンがどの程度できているかを調べる方法があります。男性ホルモンの作用としては、カエルでは親指の付け根のところが膨れます。メダカでは尻鰭が大きくなったり、尻鰭に乳頭状突起ができます。このような、ホルモンによる現象は試験法に組み込まれています。

Some Minnesota deformed frogs



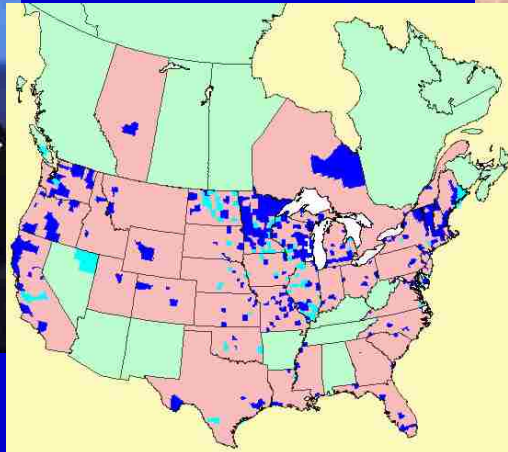
Found in 1992



Supernumerary limb



Duplicated paired limbs



Split hindlimbs

1992年に米国で見つかった野生のカエルの異常です。化学物質との関連は定かではありません。青く塗った場所で、このようなカエルの異常が報告されています。



鳥類、海生哺乳類あるいはピューマ、シロクマなどに、色々な異常が見出されています。農薬やPCB類の影響に加えて、ホルモン作用を持つ物質(内分泌かく乱物質)の影響についても研究が始まっています。

2004年アルバート・ラスカー賞受賞者

胚発生と代謝経路を統一的に調節する核内ホルモン受容体の発見



Pierre Chambon
Institute of Genetics and
Molecular and Cellular Biology,
Strasbourg, France
1986 ヒト ER α



Ronald M. Evans
The Salk Institute for
Biological Studies,
La Jolla, CA
1985 ヒト GR



Elwood V. Jensen
University of Chicago and
University of Cincinnati
College of Medicine
受容体の概念を提唱

**Korach et al. : ER α ノックアウトマウス (1993), ER α -ER β ダブルノックアウトマウス(1999)
ER α がないと不妊、女性ホルモンを投与しても子宮肥大が起こらない。
ダブルノックアウトマウスでは卵巣に精細管が形成**

ホルモンの受容体を見つけるのに貢献した先生方です。

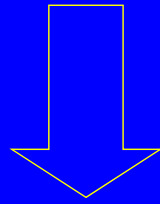
Elwood V. Jensen先生は、ホルモンが効くには受容体がないと効かないはずだということで、ホルモンの受容体の概念を作られました。

フランスのPierre Chambon先生は、1986年に人間の女性ホルモン受容体 α のアミノ酸配列、遺伝子配列を明らかにされました。

Ronald M. Evans先生は、1985年にヒトの副腎皮質ホルモンの受容体を見つけられました。ですから、ホルモン受容体の遺伝子配列とアミノ酸配列がわかったのはこのヒトの副腎皮質ホルモン受容体が最初です。こういう先生方の努力のおかげで、いろいろなホルモン受容体が発見されました。

では、受容体が働かなくしたらどうか。Chambon先生は、エストロゲン受容体の α タイプを全く働かない、ノックアウトマウスをつくりました。そうすると、いくら女性ホルモンを投与しても子宮重量は増えず、雌は不妊になることもわかりましたし、女性ホルモン受容体の α と β を両方を働かなくしてしまった雌のマウスでは、卵巣が精巣化するということが明らかにされています。内分泌かく乱物質にの影響を調べるためにも、ホルモン受容体遺伝子を働かなくした遺伝子改変動物が使われるようになっていきます。

環境因子



外因性物質



・遺伝毒性影響

- ・死
- ・癌
- ・催奇形性

・シグナルのかく乱

- ・内分泌系
- ・神経系
- ・免疫系



- ・ 内分泌かく乱は、ホルモン受容体が外因性物質を受容して起こるシグナルのかく乱
- ・ 発生の臨界期が重要

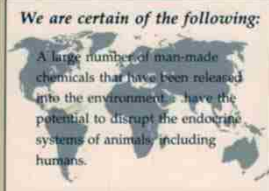


内分泌かく乱というのは、遺伝毒性とは違い、死ぬとか、がんになるとか、催奇形ではありません。左側の遺伝毒性影響はかなりの化学物質の量を投与しないと起こりませんが、右側のシグナルのかく乱は、胎児期や発生の初期に、ホルモンが必要のない、あるいはホルモン作用があってはならない時期にホルモン受容体に結合して、割合微量で作用しても悪影響となることもあります。大人ではホルモンの作用は可逆的で、元に戻りますが、発生中で感受性が高い時(臨界期)に作用すると、元に戻らない不可逆的な作用となることがあります。ホルモンは化学伝達物質とも言われており、ホルモンシグナルのかく乱が悪影響につながるので、内分泌かく乱はシグナルのかく乱とも言えます。

ウイングスプレッド会議のまとめとコンセンサス (1992)

Chemically-Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/Human Connection
eds. T. Colborn and C. Clement
Princeton Scientific Publishing Co.
1992, pp.403.

The Wildlife/Human Connection



edited by:
Theo Colborn and Coralie Clement

PRINCETON SCIENTIFIC PUBLISHING CO., INC.

♻️ printed on recycled paper

H.A. Bern, P. Blair, S. Brasseur,
T. Colborn, G.R. Cunha, W. Davis,
K.D. Dohler, G. Fox, M. Fry, E. Gray,
R. Green, M. Hines, T.J. Kubiak,
J.A. McLachlan, J.P. Myers,
R.E. Peterson, P.J.H. Reijnders,
A. Soto, G. Van der Kraak, F. von Saal,
P. Whitten

基礎: ウイングスプレッド会議のステートメント、哺乳動物の性分化、胎児は影響を受けやすい、環境エストロゲンと受容体
野生生物での証拠: 製紙工場排水の魚への影響、五大湖のサケの内分泌および生殖影響、環境汚染物質による野生生物への影響の総説、化学物質の海生哺乳類への影響
動物実験からの証拠: ダイオキシンの齧歯類のオスの生殖、および魚類の初期発生への影響、ホルモンおよびホルモン類似物質のヒトおよび齧歯類の雄の性分化への影響
ヒトでの証拠: ヒトの神経行動発達への影響、胎児期にDESを投与された女性の免疫反応、乳癌細胞を用いたエストロゲン活性を持つ物質のスクリーニング(E-screen)
ヒトの化学物質暴露の証拠: 内分泌系・免疫系をかく乱する農薬、一般化学物質の分布、除草剤・殺菌剤の暴露の可能性、ヒト組織中の有機塩素系内分泌かく乱物質

コンセンサス:

環境中に出ている多くの人工の化学物質は、ヒトを含む動物の内分泌系をかく乱する可能性がある

1991年のウイングスプレッド会議の内容は、左の写真の本にまとめられています。参加された方々の名前は本の下に書いてあります。これらの先生たちが集まって議論し、化学物質の中には、ホルモンのように作用して動物の内分泌系をかく乱して悪影響を起している場合があるという、内分泌かく乱物質というコンセンサスが得られています。

Life in a Contaminated World

Louis J. Guillette, Jr.¹, Taisun Iguchi²

Until the early 1960s, pesticide use was perceived as a benefit to agriculture and public health, with few detrimental consequences. This perception changed dramatically with the publication 50 years ago of Rachel Carson's *Silent Spring* (1). The book was the start of a debate that continues to this day on the relative benefits and risks of not just pesticides but all synthetic chemicals. Pesticides are unquestionably beneficial

the past decade, a growing literature (3–6) has examined how early life exposure to an array of chemical agents, found not only in pesticides but also in personal care products and plastics, can affect human health. The effects on endocrine signaling (and thus endocrine disruption) have been observed in the exposed generation and also in succeeding generations, but the conclusions are not without controversy:

**「沈黙の春」から50年
経世代影響
生殖細胞への影響**

l.jg@nuc.edu

to think that man might deteriorate by something so seemingly innocuous as the choice of an insect spray" in 1962 [p. 8 in (1)]. Although the mechanism to explain her observation was not well documented at the time, it is now well documented that exposure to endocrine-disrupting chemicals alters gene expression patterns that can lead to altered health later

Exposure to pesticides and other chemicals can have complex long-term health effects.

in life (7).

But what dose is required to cause an effect? A large literature in the fields of endocrinology and general physiology demonstrates not only that different effects can be induced at different doses but also that the mechanisms driving those effects can differ as well (7). A report from the Endocrine Society states that different effects should be expected when comparing high- and low-dose regimens of endocrine disruptors (3). Studies using acute high-dose exposures may thus be of limited value for predicting what might occur following the chronic low-dose exposures that almost every population on Earth is subjected to today, often at low but detectable concentrations.

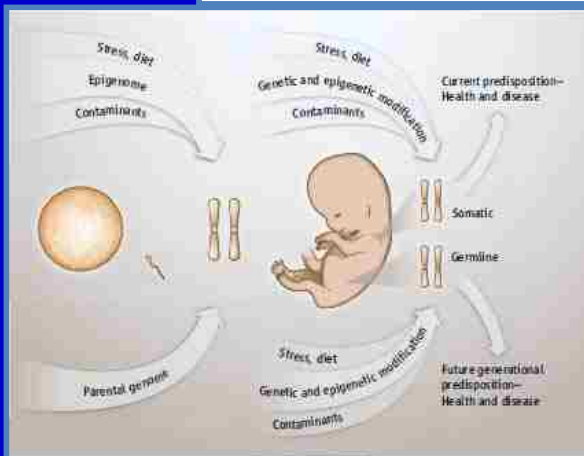
Early-life exposure to chemicals with endocrine disruption potential has been



1614

28 SEPTEMBER 2012 VOL 337 SCIENCE www.sciencemag.org

Guillette LJJr. & Iguchi T: Science, 337, 1614-1615, 2012.

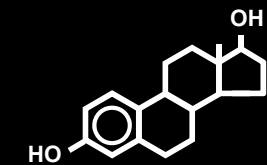


The role of the environment. Environmental factors, including numerous contaminants, have been shown to modify the parental genome, so that the genetic makeup of any offspring is a combination of a parental inherited genome (itself likely influenced by epigenetic mechanisms of the germline) and environmental influences on that germline during maturation. Environmental factors such as diet, stress, and contaminants can also modify the genome of the developing embryo by classic selection and mutation or by epigenetic mechanisms at both the somatic and germline levels. These modifications can produce predispositions for health and disease in the current lifetime of the individual. Future transgenerational effects could also be established through modifications in the germline genome or epigenome after exposures during the lifetime of that individual.

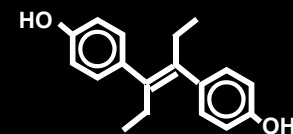
2012年は、1962年に『沈黙の春』が書かれて50年経って、これからどんな研究をしたいのか、「サイエンス誌」から今後の研究の必要性を提案するよにとの依頼がありました。この写真の二人で、生殖細胞ができる時期あるいは非常に発生の早い時期への影響、また、経世代影響を明らかにする研究の必要性を提言しました。

1962年は、『沈黙の春』だけでなく、私の先生の高杉先生が「サイエンス誌」に、生まれたばかりのネズミに女性ホルモンを投与すると、膣上皮細胞が不可逆的な増殖を続けて、1年ぐらいうると膣がんができるという研究結果を発表された年でした。

周生期エストロゲンによる 組織不可逆化 (DES シンドローム)



17β-Estradiol (E₂)



Diethylstilbestrol (DES)



1938 DESの合成 (Dodds et al., *Nature*, 141,247-248, 1938.) Bisphenol Aも合成

- Diethylstilbestrol (DES), 合成女性ホルモン
- 1945 – 1976: 流産防止剤として妊婦に処方
- 安全で効果があるとして、正常な妊婦にも処方された
- 処方された妊婦の総数は不明であるが、世界中では2-8百万人と推定されている。



1962 Takasugi, Bern and DeOme: *Science*, 138: 438-439, 1962.

出生直後のエストロゲン投与によるマウス膣の前癌病変

1971 Herbst et al., *N. Engl. J. Med.*, 284: 878-881, 1971.

- 悪影響:
 - 胎児期にDES曝露を受けた女性に低頻度ながら膣癌が発症
 - 高頻度で、男性、女性ともに生殖器官の機能異常



“The Fragile Fetus” (1992) by H.A. Bern



臨界期
胎児期の影響が
大人で現れる

高杉先生とバーン先生が書かれた「サイエンス」の論文が1962年。

右上の写真のチャーズ・ドッズ先生は、Diethylstilbestrol (DES) という合成女性ホルモンを1938年に合成されました。当時は女性ホルモンが不足しているから流産すると考えられていました。合成女性ホルモンを流産防止の薬として作った功績でサーを授与されています。イギリスでは貴族になるとこういうステンドグラスがいただけるらしいですね。ステンドグラスの中の人を持っている本の中にDESの構造が書いてあります。DESは1945年から76年まで妊婦さんに処方されました。はっきりした数はわかりませんが、200万～800万人の人が流産防止の目的でDESを処方されたと言われていています。

1971年に、右下の写真のHerbst先生が自分の勤めていたボストンの病院で10人ぐらいの若い女性の膣がんを見つけました。膣がんは100万人に1人というぐらい稀ながんです。調査したところ患者のお母さんが流産防止剤としてDESを飲んでいたということを見つけられました。この発見を契機に、妊婦にDESを処方することは禁止されました。その後も米国では、肉を柔らかくするために、ニワトリに投与されましたが、今は使われていません。

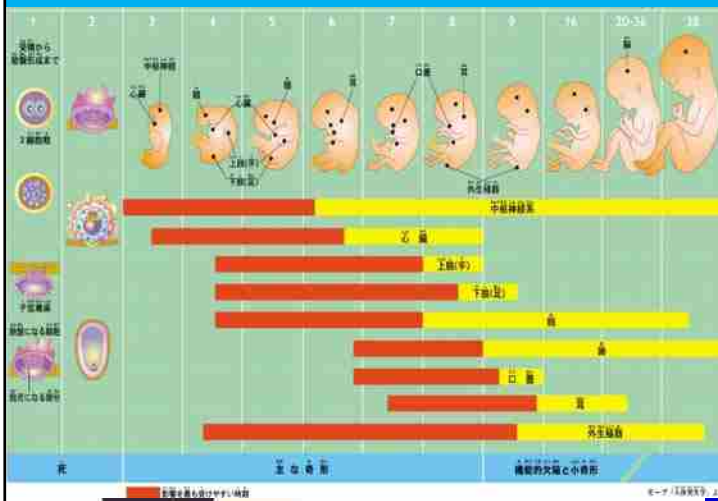
左側の写真のバーン先生は、胎児期は非常に脆弱な状態があるので、胎児期はホルモン作用物質に対して気をつける必要性を、“The Fragile Fetus”というふうな総説に書かれています。DES問題からも、ヒトでは胎児期が女性ホルモンに対して感受性が高いことが分かります。

ヒトでの経胎盤毒性

1950' : 有機水銀 水俣病
 1961: サリドマイド 奇形
 1971: ジエチルステルベストール (合成エストロゲン) 腫瘍

竹脇、高杉らによる新生仔期エストロゲンのラット、マウスへの影響: 1940-50年代から

ヒト胎児の化学物質に対する高感受性児期 Sensitive Windows in Human Fetus



LANDMARKS IN HUMAN TRANSPLACENTAL TOXICOLOGY

- 1950s Mercury (Minamata tragedy)
 - Env chemicals cause birth defects
- 1961 Thalidomide
 - chemicals (drugs) pass the human placenta
 - chemicals toxic to fetus but not mother
 - Structural Malformations seen at birth
- 1971 Diethylstilbestrol (DES)
 - chemicals (synthetic hormone) causes lasting effects in fetus
 - Effects may not be seen at birth but much later (e.g. transplacental carcinogenesis)

米国 環境保護庁: 1970

日本 環境庁: 1971、環境省: 2001

ヒトで、胎盤を通して胎児に悪影響を及ぼした、経胎盤毒性物質のまとめです。

先程、胎盤を通して悪影響を及ぼした合成女性ホルモンのDESのお話をしましたが、日本ではDESは処方されていません。

サリドマイドを妊娠した女性がつわり防止剤として飲んで手足が短い子が生まれた例があります。

残念ながら有機水銀の影響も経胎盤作用として見つかっています。

左下の図の赤いバーが、器官ごとの感受性の高い時期を示しており、妊娠9週目頃までが感受性の高い、臨界期となります。マウスは、妊娠期間が20日ですので、ヒトの妊娠3か月ごろの状態です。

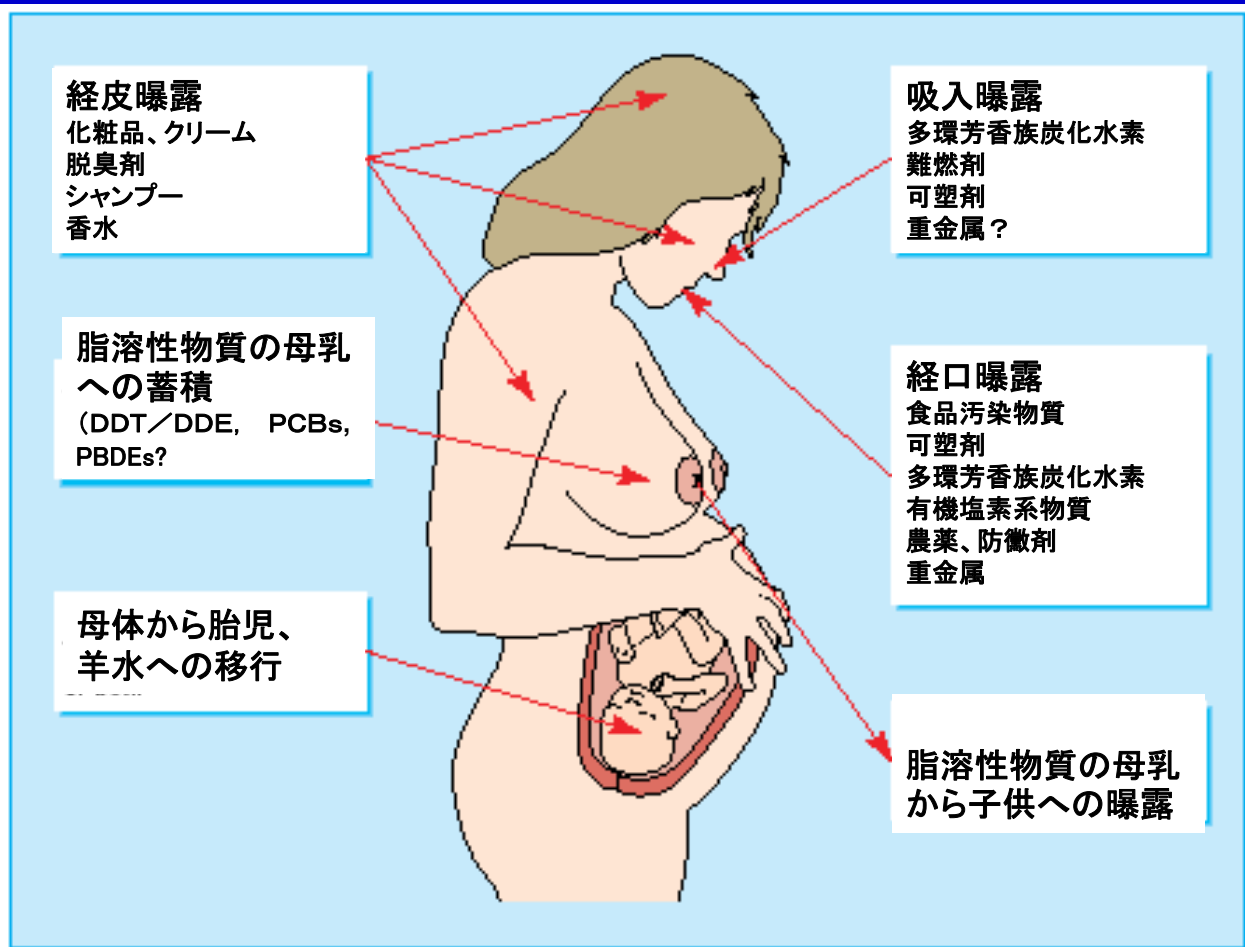


Fig 3 Routes of human exposure to some common environmental chemicals.

お母さんが妊娠中に取り込んだ物質は、胎盤を通して胎児に移行することが知られています。出産後は母乳から子供に伝わることになります。

胎児は物質に対する感受性が高いので、特に妊娠中から授乳中にかけては、化学物質に気をつけたほうが良いでしょう。

WHO/IPCS Document 2002

WHO/IPCS 定義 (2002):

“内分泌かく乱物質は内分泌系を変化させ、その結果として無処理の生物あるいはその子孫、集団に悪影響を及ぼす、外来性の物質あるいは複合物質である”

エストロゲン、アンドロゲン、
甲状腺ホルモンのアゴニストおよび
アンタゴニスト

(脱皮ホルモン、幼若ホルモンのア
ゴニストおよびアンタゴニスト)

Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors

WHO/PCS/EDC/02.2

Edited by
Terri Damstra
Sue Barlow
Aake Bergman
Robert Kavlock
Glen Van Der Kraak



2002年に、WHOは、内分泌かく乱物質の定義(内分泌かく乱物質は、内分泌系を変化させ、その結果として無処理の生物あるいはその子孫、集団に悪影響を及ぼす、外来性の物質あるいは複合物質である)を決めるとともに、それまでの報告されていたヒトや野生生物への化学物質の影響をまとめ、悪影響と関連すると思われる物質の確からしさ、などを評価しました。

ヒトで内分泌かく乱と考えられている現象 (WHO/IPCS)

悪影響	原因物質	関連性	回復傾向	仮説の信憑性	内分泌攪乱との関連
子宮内膜症	TCDD, PCBs	*	ND	高	中
神経行動発達異常	PCBs	***	ND	中	中
免疫機能低下	PCBs, TCDD	****	*	中	弱
乳がん	DDT, DDE, PCBs	*	ND	弱	弱
精子の質の低下	エストロゲン様物質、抗アンドロゲン物質	ND	ND	ND	弱

ヒトの場合では、PCB類やダイオキシン暴露と免疫系機能の低下との関連性が高いが、内分泌かく乱との関連性は弱いという判断です。精子の質の低下とエストロゲン様作用を持つ物質との関連は不明となっています。

巻貝と魚類で内分泌かく乱と考えられている現象 (WHO/IPCS)

悪影響	原因物質	関連性	回復傾向	仮説の信憑性	内分泌攪乱との関連
巻貝のインポセックス	TBT	****	****	高	高
オンタリオ湖のニジマスの発生・生殖異常	Dioxins, co-planar PCBs	****	****	高	弱
UK下水処理水によるビテロゲニン産生	エストロゲン様物質	****	**	高	高
オンタリオ湖の製紙工場排水による魚の生殖異常	漂白排水	****	***	高	高

ヒトに比べて野生生物では、物質と悪影響の関連、内分泌かく乱との関連が認められる例が多くあります。

船底防汚塗料のトリブチルスズなどの巻貝への影響や、イギリスの下水処理水に含まれるピルの成分の合成女性ホルモンが魚に悪影響及ぼしていることなどは、実験的にも証明できるので、物質と悪影響の関連性や内分泌かく乱との関連性が高いと判断されています。

アザラシ、鳥類およびワニで内分泌かく乱と考えられている現象 (WHO/IPCS)

悪影響	原因物質	関連性	回復傾向	仮説の信憑性	内分泌攪乱との関連
バルト海 アザラシの 生殖能低下	PCBs	**	****	高	中
五大湖の鳥 類の胚死亡 および水腫	PCHs (PCBs)	****	****	高	弱
卵殻の薄化	DDE, DDT 代謝物	****	****	高	中
アポプカ湖 のワニの生 殖異常	ジコホール、 農薬	***	**	中	中

バルト海のアザラシ、五大湖の鳥類、アポプカ湖のワニの例についても、ある程度は物質との関連性が認められています。

化学物質による生殖異常 (WHO/IPCS 2002)

	<p>インポセックス: 雌での輸精管、精子形成 有機スズ: TBT, TPT (内分泌系は不明)</p>	RXR
	<p>性転換 - 間性 - 精巣卵 - ホルモン産生異常 & 精子形成低下 エチニルエストラジオール, ノニルフェノール, エクイリン, 紫外線吸収剤</p>	ER, AR
	<p>性転換 - 間性 - 精巣卵 アトラジン(除草剤)? 多肢の奇形</p>	ER Aromatase?
	<p>性転換 - ペニス形成異常, ステロイドホルモン産生異常 ジコフォール, DDT関連農薬</p>	ER, AR, TR?
	<p>卵殻の薄化, 嘴の交差, 生殖腺異常 PCBs, ダイオキシン, 農薬</p>	ER
	<p>生殖器官異常, ステロイドホルモン産生異常 PCBs?</p>	ER?
<p>ヒト</p> 	<p>精子数減少, 尿道下裂, 神経行動異常, 免疫低下</p>	?

巻貝からヒトまで、悪影響とそれに関連すると思われる内分泌かく乱物質と、作用する受容体をまとめてみました。ヒトの場合には、原因物質は不明です。

Wingspread II July 17-21, 2003, Gunnison, Colorado



WHO/IPCS Workshop December 7-9, 2003, Tokyo



上の写真のように、2003年にウイングスプレッド会議の2回目がコロラド州のガニソンで開催されました。

同じ年にWHO/IPCSの会議が、井上先生を中心に東京で開催されました。

内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について

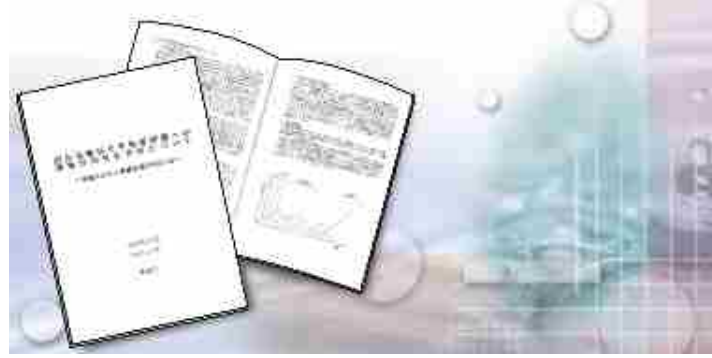
環境ホルモン戦略計画

SPEED'98

取組の成果

1990年代以降、世界各地での野生生物の観察結果から、環境中に存在している物質が生物体内でホルモンのように作用して内分泌系を攪乱することはないかと心配されるようになり、そして、米国の動物学者シニア・コンビーンらにより平成9年(1998年)に刊行された「Our Stolen Future(加害者なし未来)」では野生生物における化学物質による繁殖に影響が取り上げられ、人に対して同様な作用があるのではないかと懸念が持たれ、大きな反響を呼びました。

環境省(当時環境庁。平成13年(2001年)1月25日以降は環境省)では、平成10年(1998年)5月、専門家の研究等による検討結果に基づいて、それまでの科学的知見や今後の対応方針等を「内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について-環境ホルモン戦略計画SPEED'98-」としてとりまとめ(平成12年(2000年)、新しい国訳等を添付・修正)、これに従い、内分泌攪乱作用が疑われる化学物質の環境中の濃度の測定、生物の体内で内分泌系への作用を介した各種の影響が現れるのかどうかの検討、併せて国際共同研究など各種対応を遂げてきました。



日本の取り組み (環境省)

Strategic Programs on Environmental Endocrine Disruptors SPEED '98

< May 1998 (November 2000
additions/revisions)

- **環境中化学物質のモニタリングと野生生物の影響調査 (イボニシ、カワウ)**
- **ラットおよびメダカを用いた試験と試験手法の開発: *in silico*、レポーターアッセイ: OECD (DEHP, DINP, NP, OP, BPA, DDT)**
- **リスク評価・リスクマネジメント情報開示**
- **国際協力および国際ネットワーク**

1998年当時の環境庁は、「SPEED'98」という戦略のもとに、環境中の(内分泌かく乱作用を持つと推定される)化学物質のモニタリングと共に、幾つかの物質を選択し、日本独自の試験法で、ラットとメダカを使った試験を行いました。

Chemicals Suspected to have Endocrine Disruptive Activity

65 chemicals cited in the revised SPEED'98 (May, 1998)

<p>(1) Persistent Organohalogenates</p> <p>Dioxins PCBs Polybrominated biphenyl (PBB) Octachlorostyrene (-,-)</p> <p>(2) Agricultural chemicals</p> <p>Hexachlorocyclohexane (HCH) DDT DDE&DDD Chlordane Oxychlordane trans-Nonachlor Heptachlor Heptachlor epoxide Kepone (B,R) Aldrin Endrin Dieldrin Methoxychlor (B,-) Mirex (-,-) Toxaphene (B,-) Endosulfan (B,-) Kelcene (Dicofol) Hexachlorobenzene (HCB) Pentachlorophenol (PCP) 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid Alachlor (-,-) Atrazine (-,-) Simazine (-,-) (CAT) Metribuzin Trifluralin Nitrofen Amitrol Benomyl (-,-) Methomyl (-,-) Carbaryl (NAC) (-,-) Aldicarb (-,-) 1,2-Dibromo-3-chloropropane</p>	<p>Unintended products (POPs) Heat medium (POPs) Fire retardant By-product of organic Cl</p> <p>Insecticide Insecticide (POPs) Metabolites of DDT Insecticide (POPs) Metabolites of chlordane Insecticide Insecticide (POPs) Metabolite of heptachlor Insecticide Insecticide (POPs) Insecticide (POPs) Insecticide (POPs) Insecticide Acaricide Bactericide (POPs) Antiseptic, herbicide, bactericide Herbicide Herbicide Herbicide Triazine herbicide Herbicide Herbicide Herbicide Herbicide Herbicide, dispersion dye Bactericide Insecticide Insecticide Insecticide</p>	<p>Malathion Ethyl parathion Esfenvalerate Fenvalerate Permethrin (-,-) Cypermethrin Manzeb Maneb Metiram Zineb (B,-) Ziram (B,-) Vinclozolin</p> <p>(3) Antifouling agents</p> <p>Tributyltin Triphenyltin</p> <p>(4) Surfactants and raw materials for resin</p> <p>Alkylphenols (C5-C9) Nonylphenol (B,R) 4-Octylphenol (B,R) Bisphenol A (B,R) Styrene dimer and trimer*</p> <p>(5) Plasticizers</p> <p>Di-(2-ethylhexyl)phthalate Butyl benzyl phthalate Di-n-butyl phthalate (-,-) Dicyclohexyl phthalate Diethyl phthalate (-,-) Dipentyl phthalate (B,R) Dihexyl phthalate Dipropyl phthalate Diethylhexyl adipate</p> <p>(6) Others</p> <p>Benzo(a)pyrene (-,-) Benzophenone (-,-) 2,4-Dichlorophenol 4-Nitrotoluene N-Butylbenzene* (-,-) Cadmium, Lead, Mercury</p>	<p>Insecticide Insecticide Insecticide Insecticide Insecticide Insecticide Bactericide Bactericide Bactericide Bactericide Bactericide Bactericide</p> <p>Antifouling paints Antifouling paints</p> <p>Raw material for surfactants, Raw material for resin</p> <p>Plasticizer for plastics</p> <p>Not produced in Japan</p> <p>Plasticizer for plastics</p> <p>Unintended product Raw materials med. Prod. Cye intermediate Int. of 2,4-dinitrotoluene Intermediate</p> <p>*removed from list of the revised SPEED'98 (Nov. 2000)</p>
--	---	--	--

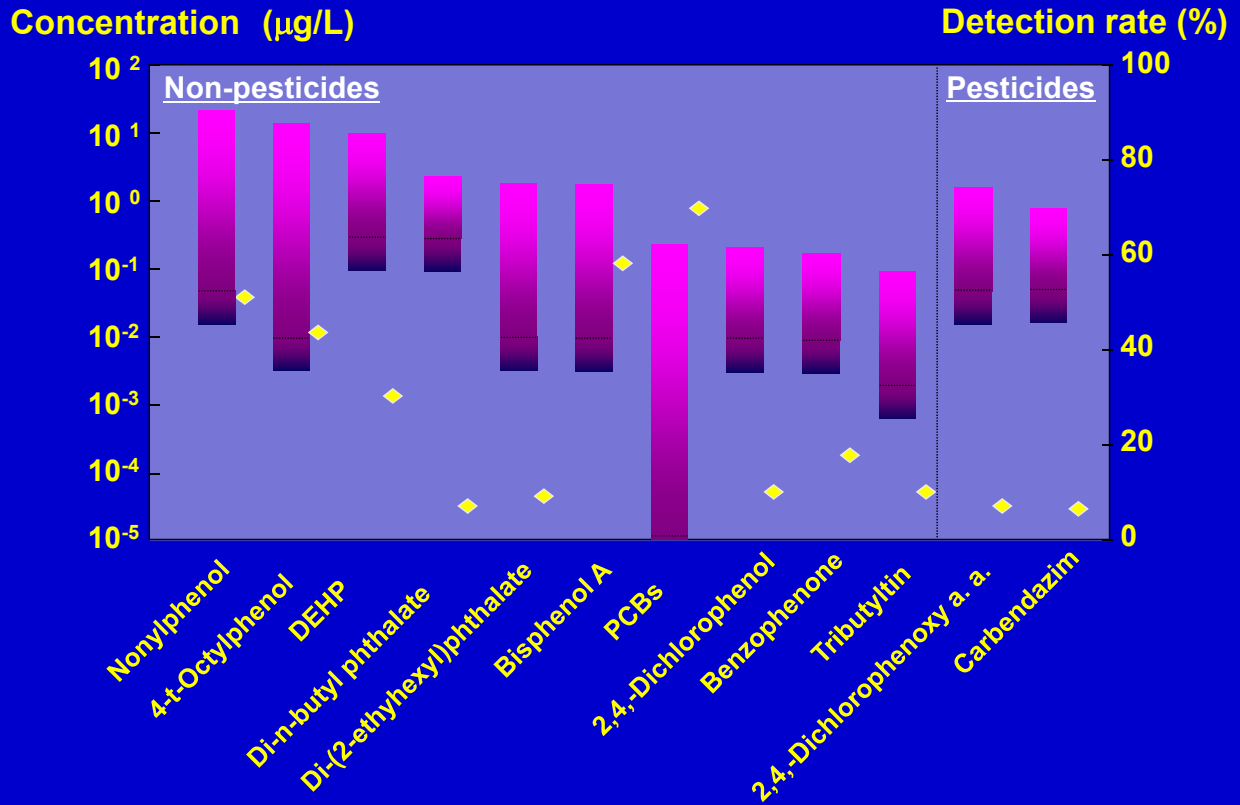
当時問題にした物質のリストです。有機塩素化合物、農薬、船底防汚塗料、樹脂の原材料、可塑剤などがあります。これはWWFのリストを利用しており、この表の物質を、大気、河川水、生物中などで測定しました。

Chemicals in Water: 61 chemicals measured; 27 detected

Polychlorinated biphenyl (PCBs)	Hexachlorohexane	Trifluralin
Polybrominated biphenyl (PBB)	DDT	Amitrol
Octachlorostyrene	DDE & DDD	Nitrofen
Tributyltin	Chlordane	Carbendazim
Triphenyltin	Oxychlordane	Methomyl
Alkylphenols	trans-Nonachlor	Carvaril (NAC)
Bisphenol A	Heptachlor	Dibromochloropropane
Styrene dimers and trimers	Heptachlor epoxide	Malathion
DEHP	Aldrin	Ethylparathion
Butylbenzyl phthalate	Endrin	Fenvalerate
Di-n-butyl phthalate	Dieldrin	Permethrin
Dicyclohexyl phthalate	Endosulfan	Cypermethrin
Diethyl phthalate	Methoxyflor	Manzeb
Dipentyl phthalate	Kelthane	Maneb
Dihexyl phthalate	Hexachlorobenzene (HCB)	Zineb
Dipropyl phthalate	Pentachlorophenol (PCP)	Ziram
Di-(2-ethylhexyl)adipate	2,4,5-Trichlorophenoxy a.a.	Vinclozolin
Benzo(a)pyrene	2,4-Dichlorophenoxy a.a.	
Benzophenone	Arachlor	
2,4-Dichlorophenol	Atrazine	
4-Nitrotoluene	Symazine (CAT)	Detected
n-Butylbenzene	Methribuzin	High detection rate

河川水中で検出された物質で、検出頻度が高かった物質をピンクで、低い物質は黄色で、検出されなかった物質は白で表しています。

水中で検出された物質 (Detection rate 5% or more)



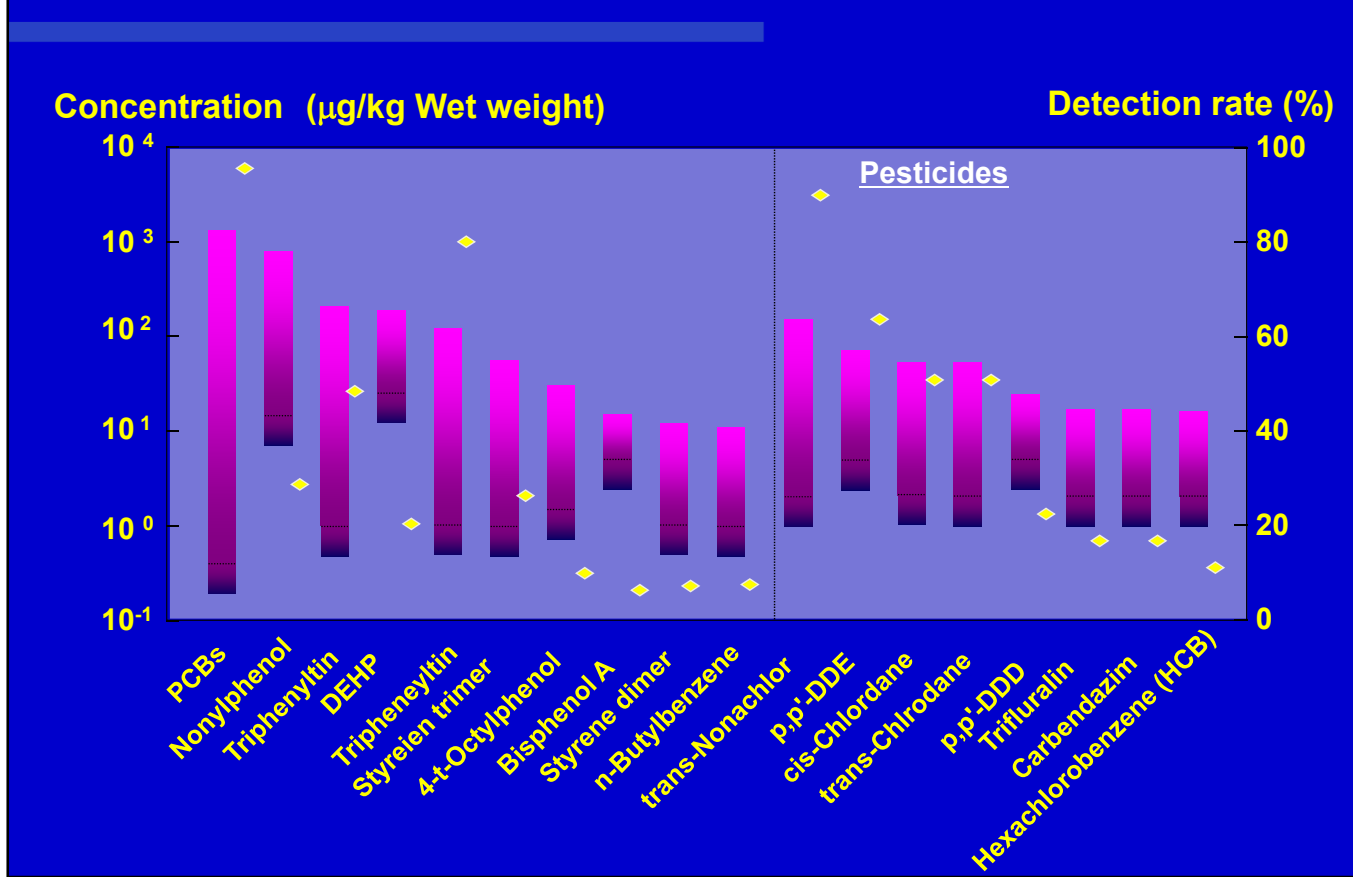
水の中で検出された物質としては、ノニルフェノールとかオクチルフェノールが濃度が高いですね。

Chemicals in Fish: 61 chemicals measured; 22 detected

Polychlorinated biphenyl (PCBs)	Hexachlorohexane	Trifluralin
Polybrominated biphenyl (PBB)	DDT	Amitrol
Octachlorostyrene	DDE & DDD	Nitrofen
Tributyltin	Chlordane	Carbendazim
Triphenyltin	Oxychlordane	Methomyl
Alkylphenols	trans-Nonachlor	Carvaril (NAC)
Bisphenol A	Heptachlor	Dibromochloropropane
Styrene dimers and trimers	Heptachlor epoxide	Malathion
DEHP	Aldrin	Ethylparathion
Butylbenzyl phthalate	Endrin	Fenvalerate
Di-n-butyl phthalate	Dieldrin	Permethrin
Dicyclohexyl phthalate	Endosulfan	Cypermethrin
Diethyl phthalate	Methoxyflor	Manzeb
Dipentyl phthalate	Kelthane	Maneb
Dihexyl phthalate	Hexachlorobenzene (HCB)	Zineb
Dipropyl phthalate	Pentachlorophenol (PCP)	Ziram
Di-(2-ethylhexyl)adipate	2,4,5-Trichlorophenoxy a.a.	Vinclozolin
Benzo(a)pyrene	2,4-Dichlorophenoxy a.a.	
Benzophenone	Arachlor	
2,4-Dichlorophenol	Atrazine	
4-Nitrotoluene	Symazine (CAT)	
n-Butylbenzene	Methribuzin	

魚の体内から検出された物質です。頻度が高い物質をピンク、検出頻度が低い物質は黄色、検出されなかった物質は白です。

魚に検出された物質 (Detection rate 5% or more)



魚の体内で検出された物質では、PCB、ノニルフェノール、フタル酸の類があり、農薬ではノナクロールやDDTの代謝物のDDEなどが検出されていました。

インポセックスと有機スズ濃度



一方、有機スズ化合物によるイボニシ(巻貝の一種)の生殖系異常(メスの目にオスの生殖器官が見られる)が我が国の沿岸部で広範囲に発見されました。実験的に環境中と同レベルの溶液濃度でイボニシを飼育したところ、同じ異常が見られており、そのメカニズムについて研究が行われています。

対象物質はトリブチルスズ、トリフェニルスズ、トリブチルジスズ、トリブチルモノスズ等の有機スズ化合物を総称して、イボニシに生殖系異常を誘発することが知られており、このうちトリブチルスズ、トリブチルモノスズは環境中で最も高い濃度で検出されており、実験的に対象物質の生殖系異常はトリブチルモノスズによる作用と考えられている。これら2物質による有機スズ化合物は、製造原料を主に用いられており、化学物質管理規制法による規制や自主規制検査等により現在、国内での使用はほとんどなくなっている。



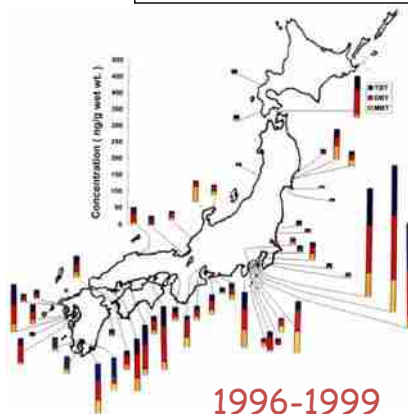
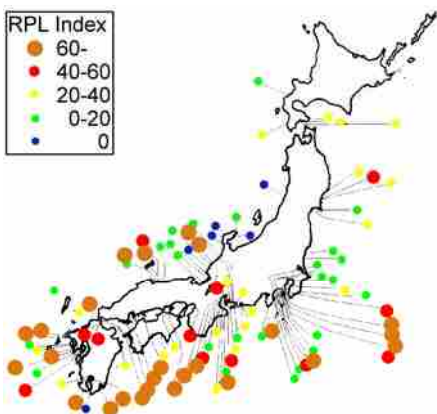
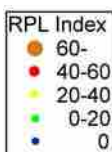
正常なオス ペニスをもったメス



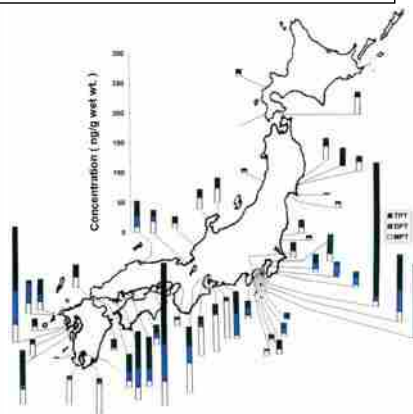
日本:39種類 世界:150種類程度
アワビの雌雄の成熟にずれ

ブチルスズ化合物

フェニルスズ化合物



1996-1999

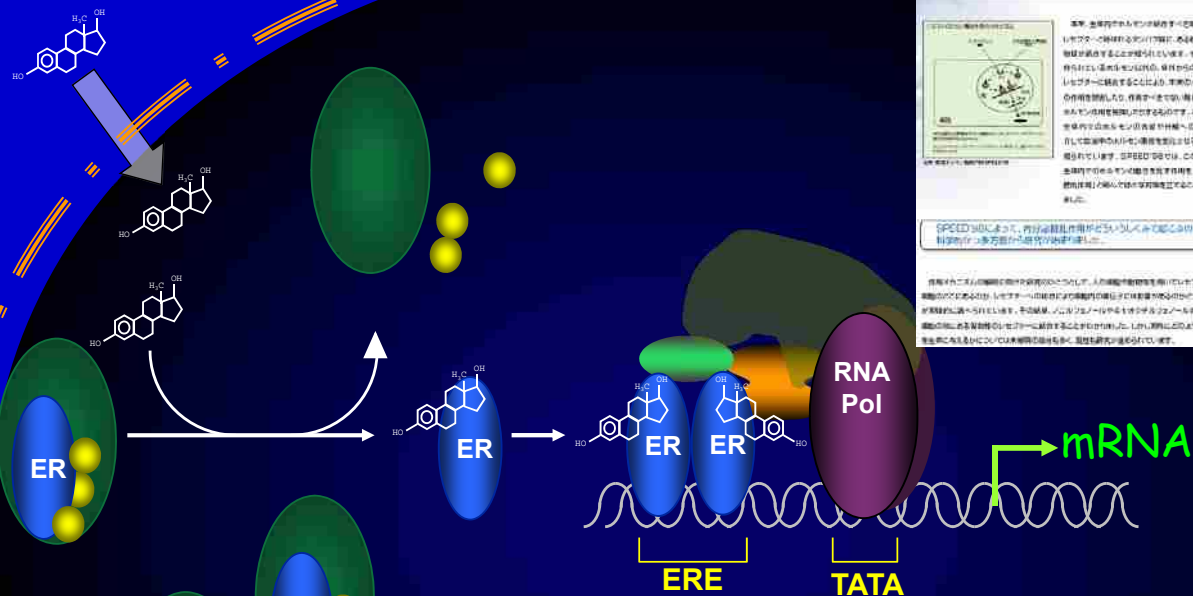


これは国立環境研究所の堀口先生が調査された巻貝のインポセックス(雌にペニスのような構造が形成)と船底防汚塗料に使われた有機スズの濃度の関係です。

有機スズ化合物は船が停泊するほぼすべての港で検出されており、有機スズの濃度と巻貝のインポセックスの長さとの関連があります。

この他に、カワウの体内や卵の中の化学物質の濃度などについても調査されています。

女性ホルモン作用を持つ物質



内分泌攪乱作用とは

内分泌系を乱すメカニズムとして様々な物質が考えられている。例えば、

近年、自然界から抽出される天然物や、合成化学物質が内分泌系を乱すことが知られています。自然界で存在する天然物は、単体から抽出され、セクターに結合することにより、天然ホルモンの作用を模倣したり、作用を阻害したり、作用を拮抗させたりすることが知られています。このように、自然界から抽出される天然物や、合成化学物質が内分泌系を乱すことが知られています。このように、自然界から抽出される天然物や、合成化学物質が内分泌系を乱すことが知られています。

SPCED 300によって、内分泌攪乱作用がどのようにして起こるのか、科学的に明らかにする研究が進行中...

自然界から抽出される天然物や、合成化学物質が内分泌系を乱すことが知られています。このように、自然界から抽出される天然物や、合成化学物質が内分泌系を乱すことが知られています。

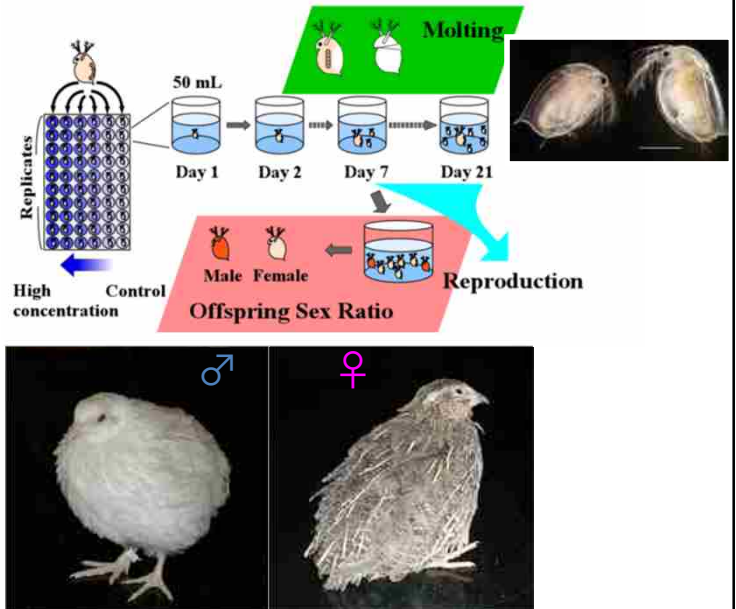
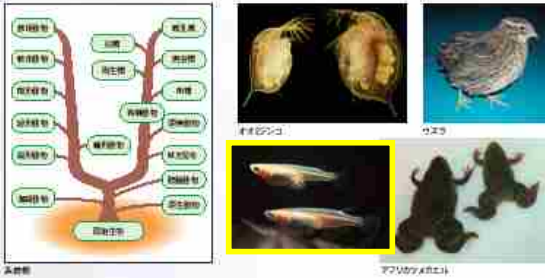
ER: 哺乳動物は2種類のエストロゲン受容体 (ER α , ER β)
魚類のエストロゲン受容体 3-4種類

化学物質が細胞に入り、核内にある女性ホルモン受容体に結合し、化学物質と受容体が二量体になって遺伝子の女性ホルモンの応答配列に結合すると、その下流の遺伝子が発現するという模式図です。

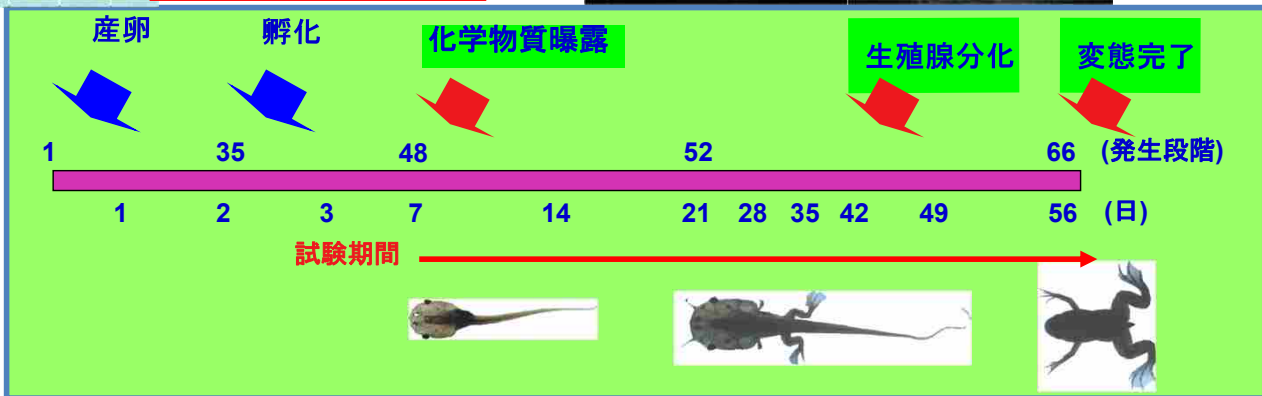
さまざまな生物への内分泌攪乱作用を調べる

鳥類・両生類・無脊椎動物

これらの生物に関しては現在、試験方法の開発が進められている段階です。



甲状腺ホルモンの影響
変態

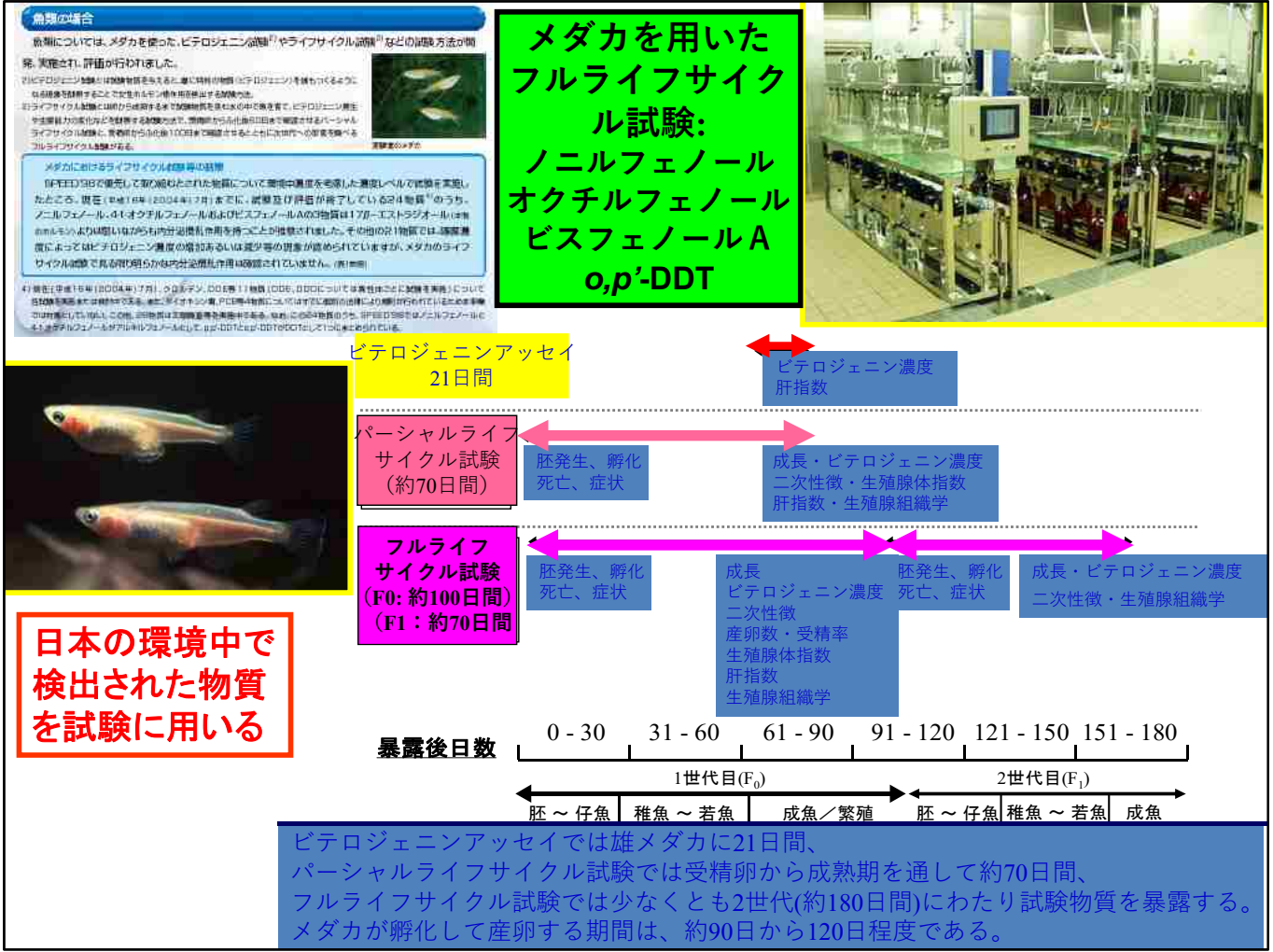


魚類(メダカやゼブラフィッシュ)、カエル(アフリカツメガエル)やオオミジンコを用いたOECDの試験法も1998年以来開発されて来ています。山本先生がこのあたりのお話をされると思います。

環境中の化学物質濃度

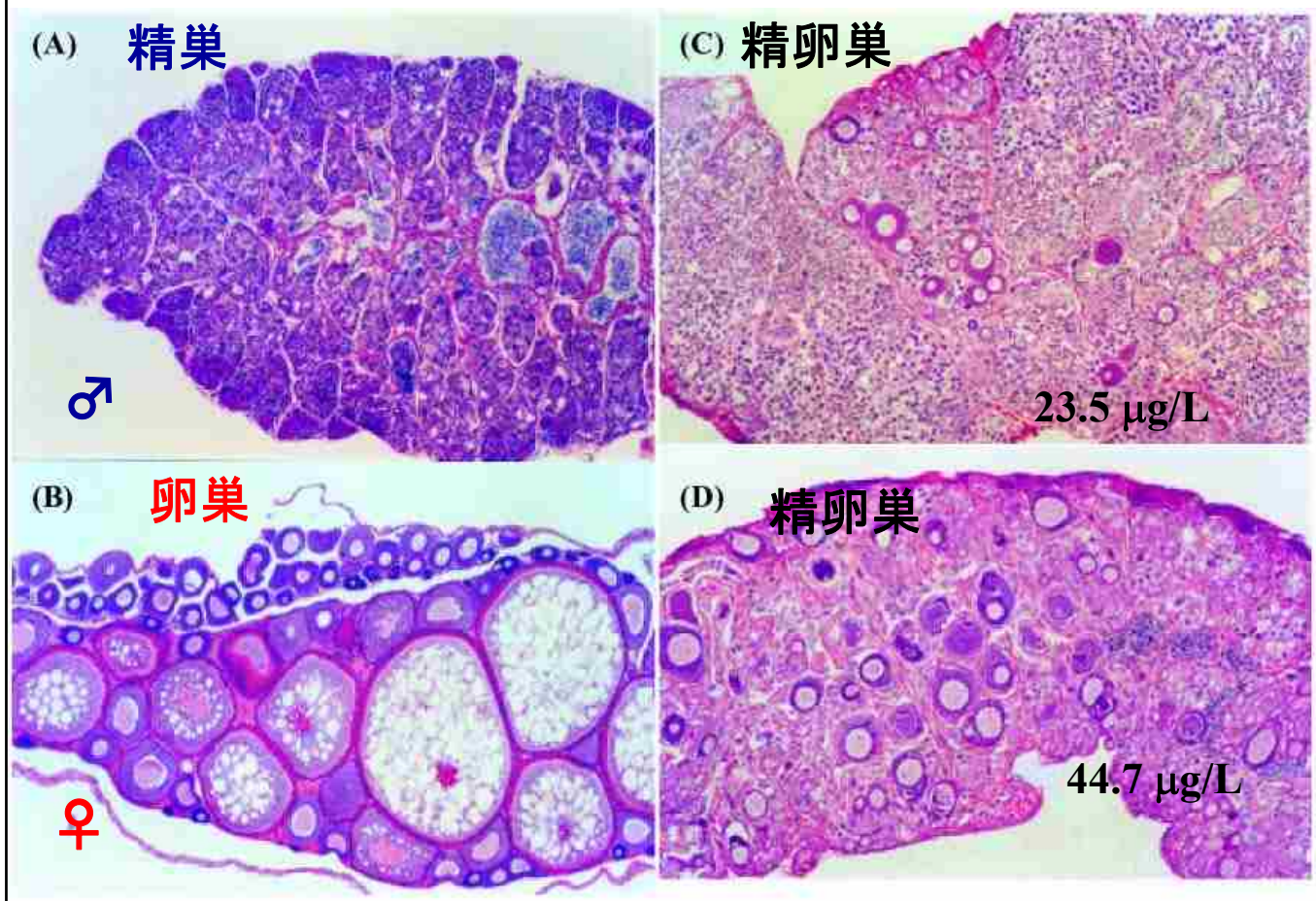
測定物質	年	水質
ノニルフェノール	1998	nd~21 µg/L
	1999	nd~4.6 µg/L
	2000	nd~7.1 µg/L
	2001	nd~5.9 µg/L
0.69 µg/L	2003	nd~2.9 µg/L (河川で42%)
エストラジオール	2003	nd~6.9 ng/L (河川で90%)
エチニルエストラジオール	2003	nd~6.5 ng/L (河川で14%)
オクチルフェノール	2003	nd~0.47 µg/L (河川で60%)
ビスフェノールA 0.28 µg/L	2003	nd~0.4 µg/L (河川で84%)
フタル酸ジエチルヘキシル	2003	nd~9.1 µg/L (河川で60%)
トリブチルスズ	2003	nd~5 ng/L (海域で50%)

ノニルフェノールは、1998年では河川水中に最高濃度が21µg/L検出されたのですが、現在は、赤字の0.69 µg/Lに減少しています。ビスフェノールAは現在、赤字の0.28µg/Lですが、もともと低かったので、今もあまり濃度変化はないようです。



メダカの受精卵を用いて、180日かかる2世代試験(フルライフサイクル試験)で、ノニルフェノール、オクチルフェノール、ビスフェノールA、DDTの試験を行いました。

メダカの生殖腺組織像（ふ化後60日）：ノニルフェノール




左側のスライド(A)の正常な精巣に比べて、ノニルフェノールの濃度を変えて曝露すると、(C)、(D)の精巣には卵(精巣卵)ができていることが分かります。ノニルフェノールの濃度を倍にすると、卵の数も増えています。



**USEPA decided
to use Medaka for
Risk Assessment
2002**

**OECD TG240
(MEOGRT)
2015**

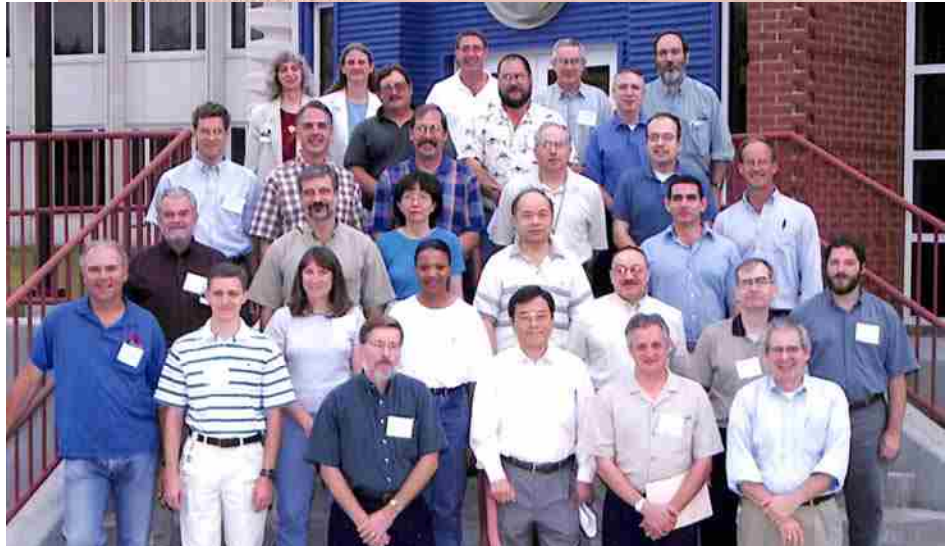
 **EPA** United States
Environmental Protection Agency
National Center for Environmental Assessment

Colloquium on the Use of Medaka in Risk Assessment Processes

Sponsored by the Risk Assessment Forum, Office of Water, and Office of Research and Development

Mid-Continent Ecology Division
National Health and Environmental Effects Research Laboratory
Office of Research and Development
Duluth, MN

July 30–August 1, 2002

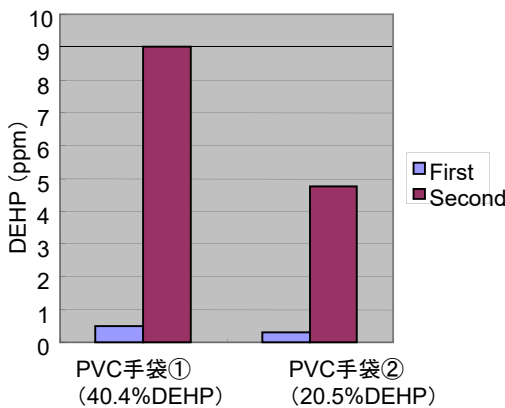


これは2002年に、米国環境保護庁(US EPA)の研究所での会議参加者の写真です。

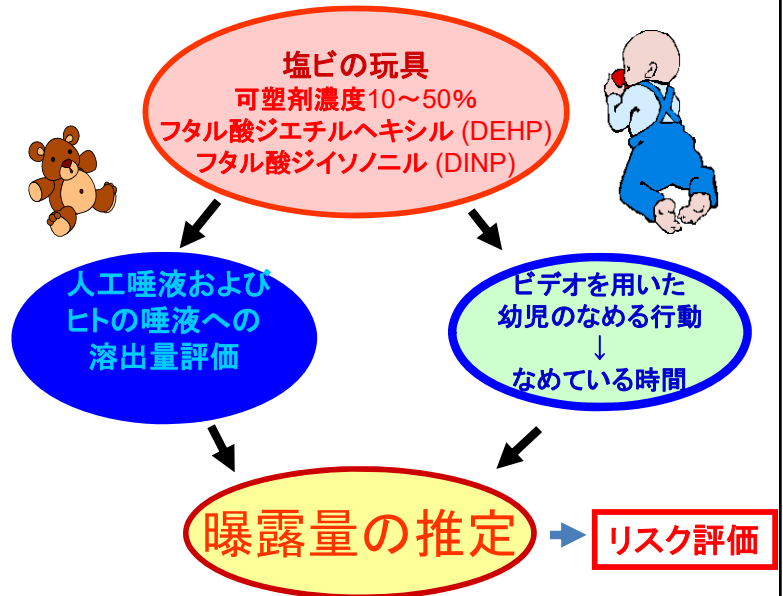
当時はアメリカから、長期の試験にどんな魚類を使うのが良いか、との相談を受けていました。私は、メダカを推薦しました。メダカの有用性を説明するために開かれた会議でした。メダカは雄を決める遺伝子がわかっていたので、ひれの一部を切って遺伝子を調べることで、雌雄の判別ができます。その結果、アメリカはメダカを、内分泌かく乱物質の試験に使うことに決めました。それ以降、日米二国間協力としてメダカを用いた試験共同で開発しOECDの長期試験に提案しました。これも山本先生に話の続きをお願いします。

厚生労働省：ヒト健康

PVC Globes



DEHP attached to oily food from PVC globes



これらの可塑剤(DEHP, DINP)を、食品に直接接触する材料や幼児が舐めることを目的とした玩具には使用禁止 (食品衛生法 2003年8月1日)

話を少し変えて、厚生労働省の取り組みも紹介します。私も厚生労働省の委員をしてもらいました。

当時コンビニ弁当を買い集めて、測定した結果、フタル酸エステル類の濃度が非常に高く、1食でヨーロッパの一日耐用摂取量を超えていました。フタル酸エステル類がどこから弁当の食材に入るのかを調べました。食材を弁当に詰めるのに、写真のような塩ビの手袋をして、例えばコロッケなどを詰めていました。また、丁寧に70-80%アルコールで手袋を消毒して使っていました。

例えば塩ビの手袋をして、3秒間食材をつまんで別の皿に移した場合は、左下の図の青のバーで示したフタル酸類が食材から検出されました。同じ手袋で2回目に3秒つまんだ食材からは紫色のバー(1回目の約20倍)の濃度が食材からフタル酸が検出されました。この結果から、塩化ビニルの手袋を食材に直接接触するように用いることを食品衛生法で禁止しました。

次は、右側の図ですが、これは子供の歯固めの問題です。子供を遊ばせてビデオ撮影を行い、口の中に物を入れている時間を測りました。最長6時間半でした。研究者は歯固めをなめて唾液から検出される可塑剤(フタル酸ジイソノニル)を測定したり、人工唾液につけておいて可塑剤がどれくらい漏れるかを測定しました。舐める時間×一定時間の間に漏れてくる可塑剤の量=子供への曝露量 となり、子供への曝露量が推定できます。これらの実験結果と、動物への影響として報告されている可塑剤の濃度を用いて、リスク評価を行いました。この場合にはまだ安全だったのですが、子供が使うものであるから禁止することに決まり、食品衛生法でこの2つの可塑剤を禁止しました。

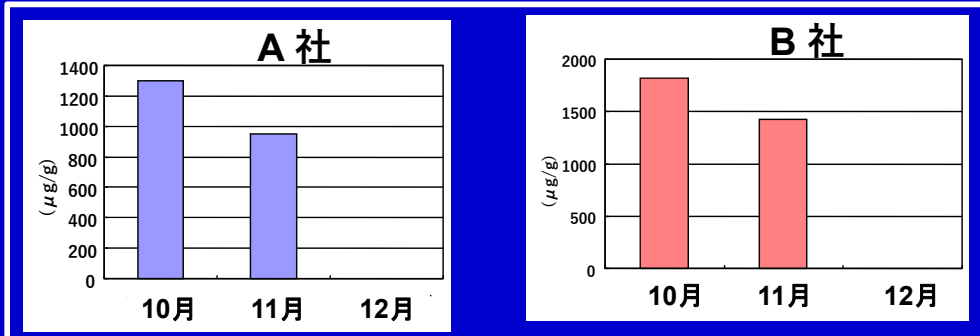


缶飲料のビスフェノールA

A	15.6	→	0.5	μg
B	29.5	→	1.3	
C	12.1	→	1.3	
D	35.7	→	-	



ラップフィルム中のノニルフェノール



缶入り食材中のフタル酸濃度

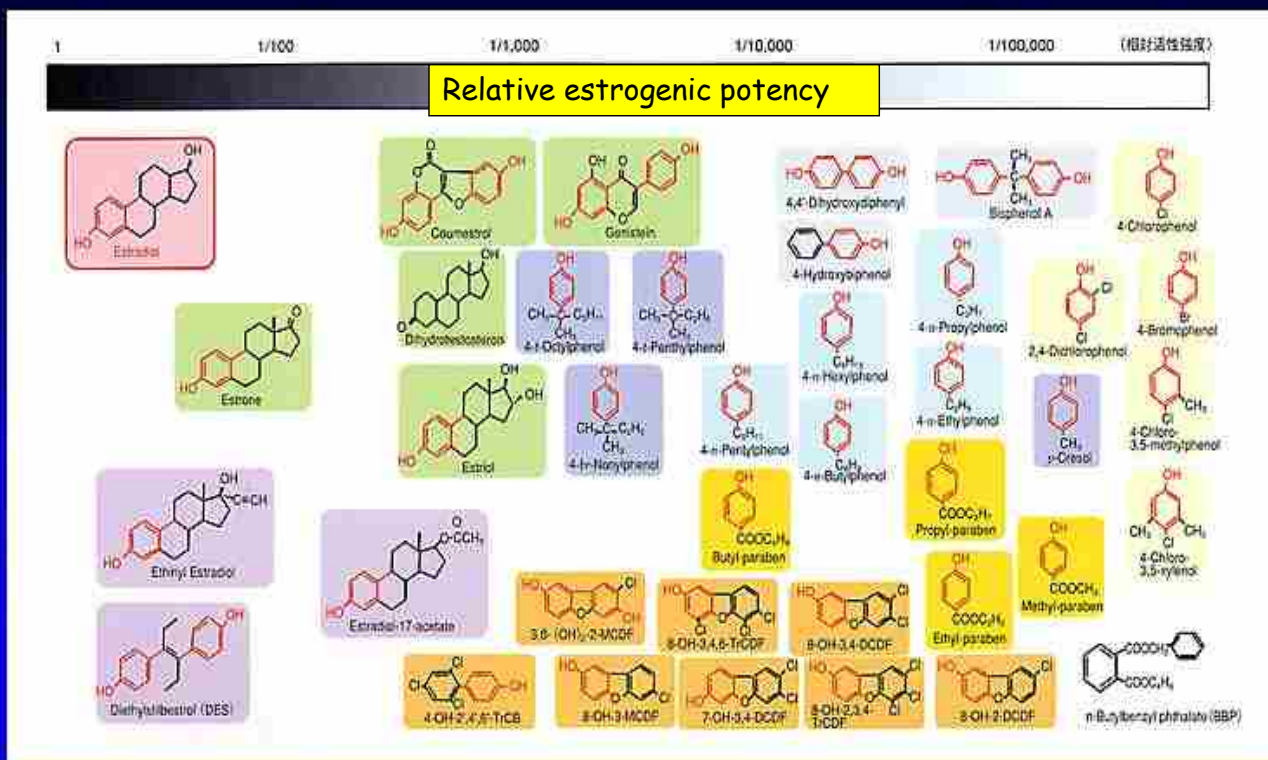


バーベキューソース (韓国)	DEHP	42,367	ng/g
豆板醤 (香港)		4,654	
アンデスポテ (コロンビア)		1,117	DBP 2,560
日本の食品		ND - 517	

次はビスフェノールAの話です。缶詰の内側のコーティングにビスフェノールAが使われています。缶飲料や缶詰からビスフェノールAが検出されていました。一番上の表のように、自助努力で製缶メーカーがビスフェノールAの重合方法を改良すると、飲料の中に漏れてくるビスフェノールAの量は減少しました。

ラップフィルムにはノニルフェノールが入っていたのですが、真ん中の図のように、2社ともに、11月から12月の間に、ラップフィルムにはノニルフェノールを入れることをやめています。このようなことが起こっていたことは新聞報道もありませんし、皆さんご存知ないと思いますので、ここで話しておきます。

ヒトのエストロゲン受容体を組み込んだ酵母を用いたエストロゲン活性試験 by 西原ら (大阪大)



この図の物質は女性ホルモン作用があり、左から右に行くにつれて、女性ホルモン作用は弱くなります。

この中には、ノニルフェノールやビスフェノールAも入っています。左上の女性ホルモンと比べると、女性ホルモン作用は1/1000とか1/10000くらいの強さしかありません。

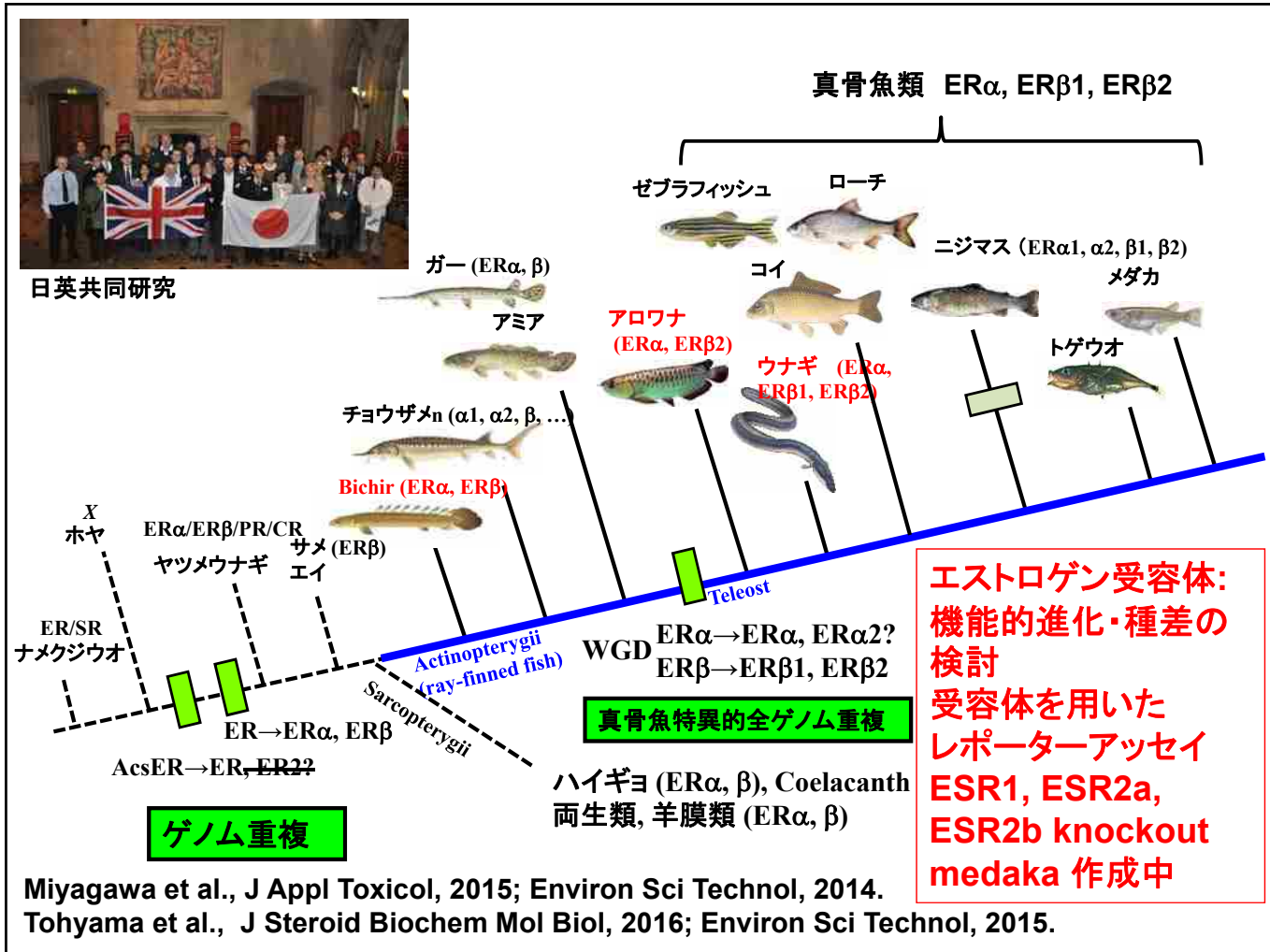
ベンゼン環に水酸基がついているフェノールの構造(この図では赤)を持っている物質には女性ホルモン作用がある可能性が高いと考えられます。

また、女性ホルモン受容体の構造も分かってきましたので、コンピューターを用いて、受容体のホルモンが結合するポケット部分の構造(鍵穴)に化学物質(鍵)がどの程度ハマりやすいかを計算するドッキングモデルもできています。

ER, AR の進化、甲状腺ホルモン受容体、
幼若ホルモン、脱皮ホルモン受容体、RXR



私たちは、この図に出ている動物から、女性ホルモン受容体遺伝子を取り出しています。



色々な種類の魚の女性ホルモン受容体遺伝子を取り出して、魚類はどのように進化しているかを研究しています。

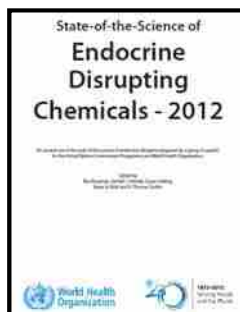
先ほども話しましたが、進化の上で、女性ホルモン受容体が最初にできており、鍵穴としては少しルーズでいろいろな物質が合鍵としてハマりますが、男性ホルモン、副腎皮質ホルモン、甲状腺ホルモンの受容体は厳密になり、甲状腺ホルモン受容体に結合する物質は、薬として開発された物質が1-2種類あるだけです。しかし、コンピュータが計算した、女性ホルモン受容体に結合する可能性のある物質は、調べた20万のうち2000種類程度あるようです。

WHO/UNEP EUの取り組み

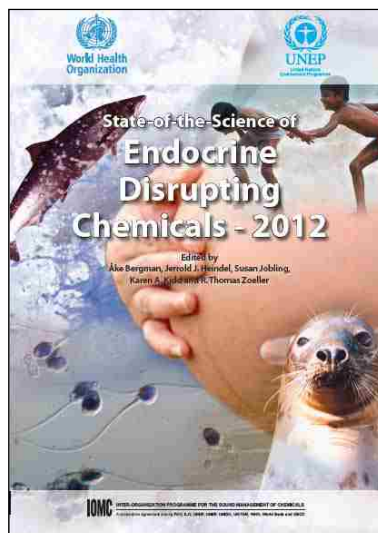
State-of-the-Science of Endocrine Disrupting Chemicals – 2012



WHO/IPCS 2002



Prof.
A. Kortenkamp
Brunel Univ., UK
1月15日、2019
環境省シンポジウム



WHO/UNEP 2012



Prof. Åke Bergman
Univ. Stockholm,
Sweden

12月7日、2016
環境省シンポジウム
浜離宮朝日ホール
(東京都中央区)
13時30分-17時

2013年には、内分泌乱物質問題への取組についての現状が、WHOとEUによりまとめられました。

問題となっていた物質数は2002年からの10年間で10倍程度に増えました。WHOの報告書をまとめた時の代表は2016年の環境省のシンポジウムにも招待された、Sweden、ストックホルム大学のバーグマン先生でしたし、EUのまとめは、本日の講演者でもある、イギリス、ブルーネル大学のコルテンkamp先生です。

WHOの報告書の中には、ヒトの前立腺がん、精巣癌、乳癌の罹患率が経年的に増加しているというような情報も入っていますが、内分泌かく乱物質との関連は不明です。

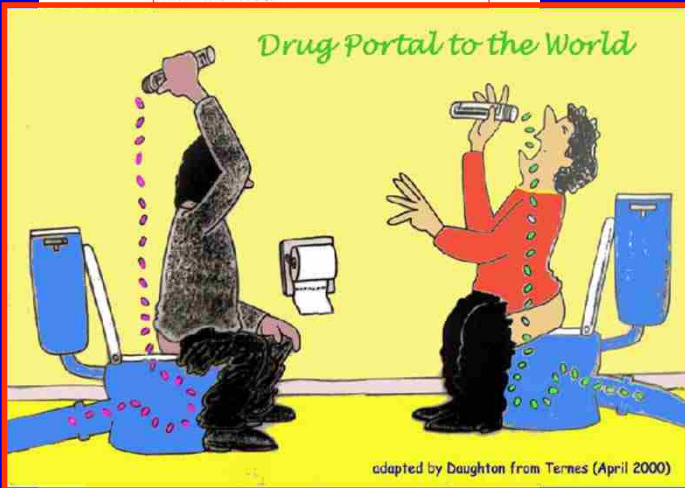
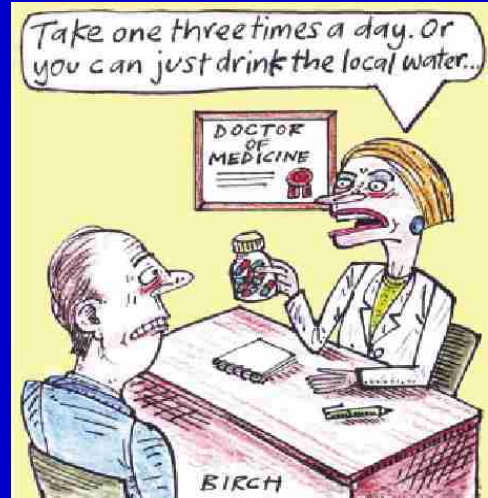
また、米国内分泌学会は、2009年と2012年に、内分泌かく乱物質の研究の必要性についての提言を行っています。

Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999–2000: A National Reconnaissance

DANA W
U.S. Geologi
Iowa City, Ia
EDWARD
U.S. Geologi
Denver, Colo



医薬品、PPCPs



95 organic wastewater
contaminants
139 streams across 30 states
1999-2000

**SETAC Pellston meeting
Salt Lake, in 2003.**

Environ. Sci. Technol., 36: 1202-1211, 2002.

内分泌かく乱物質問題と並んで、化学物質の中でも、医薬品の野生生物の影響を心配する声もあがり、2002年頃から、環境濃度の調査や、生物への影響を実験的に調べる取組が進められています。

排卵抑制剤のピルの成分でもある、エチニールエストラジオールや黄体ホルモンがイギリスの河川からは検出されており、実験的にも魚類の産卵への影響が報告されています。

日本：環境省の取り組み

SPEED 1998、ExtEND 2005、EXTEND 2010、EXTEND 2016

- 日本の環境調査(河川、底質、大気) (SPEED '98)
メダカ、カエルを用いた試験法の開発 (OECD TG229, TG230, TG231)
- メダカを用いて4物質の悪影響を公表
ノニルフェノール、オクチルフェノール、ビスフェノールA、DDT (2004)
- ラットを用いた試験では悪影響は見られなかった
- 化学物質のリスク評価に向けた取り組み(100物質): 2010
- 日米二国間協力: 日米協力で試験法開発 OECD TG240, TG241 (Dr. Yamamoto)
- 日英共同研究: イギリスの河川中の合成エストロゲンの濃度で、河川に生息しているコイ科のローチに悪影響があることを実験的に証明(3年間の実験)
- **EXTEND 2016: 日本の環境中で検出された物質を元に、内分泌かく乱作用および生物への悪影響の試験を継続中 (Dr. Nakamura)**

内分泌かく乱化学物質については、現在も、EUや米国を中心に多くの国で研究が進められていますし、OECDではラット、魚類、カエル、ミジンコ、巻貝などの無脊椎動物を用いた試験法の開発を行っています。

環境省では、スライドに示したように、1998年、2005年、2010年、2016年に、環境中の物質の濃度の把握、生物への影響を把握するための動物実験方法の開発、OECDの生物試験法開発への参加、内分泌かく乱作用が疑われる物質の論文の信頼性の調査、メダカ、カエル、ミジンコのホルモン受容体を用いた、試験管内試験法の開発、これらの動物を用いた短期試験、メダカやカエルを用いた確定試験方法の開発などを行い、幾つかの物質を用いて確定試験も始められています。

これらについては、国立環境研究所の山本先生、環境省の中村さんから解説していただきます。

内分泌かく乱物質問題の重要な問題

1. 低用量影響

未解決(低用量で影響があるという論文は発表されているが、悪影響との関連が明らかではない)

2. 複合影響

相加的な影響を示す論文は多いが、どのように試験するか？



Prof. Andreas Kortenkamp
Brunel University



Prof. Michael K. Skinner
Washington State Univ.

3. 世代を超えて伝わるエピジェネティック変異 Epigenetic Transgenerational Inheritance 生殖系列により影響が世代を超えて伝わる ビクロゾリン



Prof. Bruce Blumberg
Univ. California, Irvine

4. オベソジェン(脂肪細胞分化)作用を持つ物質 トリブチルスズ(TBT)は世代を超えて影響する

5. E、A、T受容体以外の核内受容体を介した悪影響？

最後に、今後の研究としてはスライドに示した5つの難しい問題について、引き続き研究を続ける必要があると思います。

内分泌かく乱物質問題で重要な研究としては、低用量影響、複合影響(コルテンカンプ先生が複合影響の提案者です。単独の物質の試験しかしていないのが現状ですが、環境中では多くの物質が同時に検出されますので、合わさった場合にはどんな影響になるかを知るための方法が必要です)。また、物質が世代を超えて影響することも報告されています。オベソジェンは肥満を引き起こす物質のことを表しています。女性ホルモン、男性ホルモン、甲状腺ホルモンのような作用を持つ物質や、これらのホルモンの働きを邪魔する物質が問題となっていますが、ほかにも多くのホルモンがありますので、今問題にしているホルモンだけでなく、ほかのホルモンと似た作用やそれらの働きを邪魔する物質についても調べる必要があります。

今後、研究の発展や、物質の試験が進むことを期待しています。ますます、国際的な協調が必要になっています。

これで終わります。ありがとうございました。