

新たな内分泌攪乱化学物質：化粧品中の紫外線フィルター

マルグレート シュルンフ

スイス チューリッヒ大学

このすばらしい国に招かれたことを、環境省の方々、ならびに主催者の方々に感謝します。ご承知のように、PCB は減少していますが、我々の周囲には、まだ多くの化学物質が存在しています。化学物質は、我々の文化の一部をなしていると言えます。我々は化学物質を使い、飲食物として摂取し、環境中に存在させています。だが、それらがどこにあるのか、危険なのかどうかという情報は、あまり知られていません。

内分泌攪乱作用をもつ UV フィルターについて考えることは、この状況を打開する手助けになるでしょう。まず、UV フィルターというものの背景を説明します。次に、*in vitro* と *in vivo* での同定について論じ、さらにリスク評価について述べます。

なぜ UV フィルターが使われるようになったのでしょうか。ご承知のように、地球のオゾン層は破壊が進んでいますが、それに対しては、太陽光線保護指数 (SPF) を高めることが図られました。

UV フィルターを含む化粧品も増加しており、昼夜兼用クリームや、さらにはローション、ヘアスプレー、整髪ジェル、シャンプー、泡入浴剤、口紅などにも使われていますが、成分として表示されていないことが多くあります。化粧品の保護を目的として使用された場合は、表示されないのです。

工業製品の製造にも、大量の化学物質が使用されています。プラスチック、塗料、繊維、カーペット、カーテンなど、あらゆる所に UV フィルターが使われていますが、何がどれだけ使われているかという情報は、まったく得られません。

一例を挙げると、スライドに示した美しい女性が使っている昼夜用クリームには、UV フィルターが含まれていると表示されています。広告では、これには若さを甦らせる効果があると謳われています。また彼女は、UV カットのヘアスプレーを使っています。子供たちは、UV カットの T シャツを着て暮らしています。

最近私は、スイスのデパートと食品チェーンストアで最大手の店を訪れ、Exelia Suncare という柔軟剤を目にしました。容器には、この製品を使用して洗濯を 1 回すると、衣類に SPF 8 の保護効果が得られ、5 回で SPF 20、10 回で SPF 30 の効果が得られると書かれています。その頃には瓶が空になりますが、使用をやめると太陽光線保護効果が薄れるため、継続することが望ましいとされています。

日焼け止めの SPF は、1950 年代には 1~2 でしたが、現在では 30 あるいは 60+まで上昇しています。無論、製品に添加される化学物質の量も増えていますが、含有量はクリーム of 基剤によって異なるため、どこにも表示されていません。

その一方で、UV フィルターは、汚染物質としてあらゆる場所に存在するようになりました。ヒトの母乳にも含まれていますし、湖や魚類にも、また有機溶媒にも含まれています。質量分析法に使われる高純度の有機溶媒にさえ、4-メチルベンジリデン・カンフルのピークが認められます。また、チューリッヒ湖やフッテン湖などの湖水にも、季節によって検出されます。

出産直後の同僚から提供されたヒト母乳について GC/MS 分析を行った結果でも、UV フィルター OMC (桂皮酸オクチルメトキシ) のピークが同定されました。標準試料と母乳中のピークをスライドに示します。

我々が試験を行った UV フィルターのうち、最初の 6 種類は、HMS (ホモサレート; Eusolex HMS)、OD-PABA (オクチルジメチル PABA)、4-MBC (メチルベンジリデン・カンフル)、OMC (桂皮酸オクチルメトキシ)、Bp-3 (ベンゾフェノン-3)、B-MDM (ブチルメトキシジベンゾイルメタン) でした。図中、赤で示したもの (OD-PABA、4-MBC、OMC、B-MDM) はエストロゲン性であり、緑で示したものの (HMS、Bp-3) は抗アンドロゲン性でした。不活性なものは、6 種類のうち 1 種類のみでした。これを見ると、化学的にまったく異なるグループの物質が、内分泌活性を有していることが分かります。

スクリーニング試験では、最初に *in vitro* でのスクリーニングを実施します。エストロゲン性を試験す

するためには、Ana Soto 氏 (Tufts University, Boston, US) から提供された MCF-7 乳癌細胞を使用しています。アンドロゲン/抗アンドロゲン性は、米国の Earl Gray 氏から提供された MDA-KB2 細胞を用いて測定しています。

ルシフェラーゼのレポーター遺伝子をもつ MCF-7 細胞は、エストロゲンまたはエストロゲン様の作用をもつ物質があると増殖します。MDA-kb2 細胞は、アンドロゲンに反応して発光します。

このデータでは、 17β エストラジオールを添加した後や、UV フィルター4-メチルベンジリデン・カンフルを添加した後に、細胞増殖のピークが生じていることが分かります。無論、それぞれの添加濃度は、かなり異なっています。エストロゲン性物質と同時に nM 濃度の抗エストロゲンを添加すると、細胞増殖は見られず、陰性対照 (物質を含まない培地のみ) も同様になります。

最大値の半分の増殖を引き起こす濃度 (EC50) を見ると、これまでに検討したすべての UV フィルターは、EC50 が μM の範囲でした。一方、 17β エストラジオールの EC50 は pM の範囲です。すなわちエストラジオールとエストロゲン性化学物質との間には、活性に 100 万倍の差があります。

抗アンドロゲン性の測定では、ヒトのアンドロゲン受容体を発現する MDA-kb2 細胞を使い、先に 0.5 または 0.1 nM のジヒドロテストステロンを加えてから、被検物質を加えます。図のように、y 軸に相対発光強度、x 軸に被検物質の濃度を取り、抗アンドロゲン性物質フルタミドの添加量を増加させて行くと、高濃度ではルシフェラーゼ活性の低下がみられます。UV フィルターベンゾフェノン-3 とホモサレートでも、同様の低下がみられます。したがって、これら 2 物質は、抗アンドロゲン性と考えられます。以上から、UV フィルターにみられるエストロゲン性作用と抗アンドロゲン性作用は EC50 値として発現し、他の環境物質と同程度の範囲内であると言えます。

今年の夏、我々は、3-ベンジリデン・カンフルという UV フィルターを検出しましたが、この物質は、MCF-7 細胞に対する作用が 4-メチルベンジリデンの 5 倍です。

次に、*in vivo* 試験について述べます。これには子宮増殖試験を実施しています。Long Evans ラットとヘアレスラットを用い、子宮重量の増加を測定するものです。

通常、どちらのラットでも生後 20~26 日の期間には、子宮重量の増加がみられず、それを過ぎてから、ホルモンの影響により、子宮重量が急激に増加します。生後 21~24 日または 20~23 日にエストロゲンや外因性エストロゲンを作用させると、子宮重量が早期に増加します。

最初に、UV フィルター4-MBC、OMC、Bp-3 に関する試験結果を示します。左が、エチニルエストラジオール投与後の未成熟な子宮の成長です。UV フィルターによる子宮重量増加がみられる濃度は、細胞培養での値に比してかなり高くなっています。分析可能な最低濃度も高く、EC50 値も非常に高くなります。

欧州の化粧品・非食品に関する科学委員会によって行われていたように、これらの EC50 値から慢性曝露のリスク評価を計算するのは不適當です。この試験は同定試験であって、リスク評価の計算を目的としたものではありません。

3-ベンジリデン・カンフルの子宮増殖作用のデータをみると、この物質の EC50 (44.3 mg/kg) は、4-メチルベンジリデン・カンフル (319 mg/kg) に比して、約 1/7 の低さです。

試験の実施例を示します。対照群の子宮と卵巣は、重量 22 mg です。37 mg/kg の 3-ベンジリデン・カンフルに 3 回曝露したものでは、処理によって重量が 45 mg に倍増し、多数の血管の進入が見られます。3-ベンジリデン・カンフルは、最低 4 mg/kg のレベルでも子宮重量に有意な影響を及ぼします。これは、私の知る限りでは、急性作用を起こすために必要な環境物質の量として、最も微量なものです。この物質は、キロ単位で購入でき、無造作に下水に放流されています。

経皮曝露による試験では、ヘアレスラットを使用し、ぬるま湯での温浴による曝露を行っています。法的に許可されている濃度の物質をオリーブ油に混ぜて使用します。ラットにはカラーを装着してラットが顔を掻いたり前足を舐めたりできないようにし、経口曝露の影響が生じないようにします。温浴後に動物を乾かし、きれいにカゴに戻します。

4-メチルベンジリデン・カンフルでの試験結果をみると、最高 5%までの濃度範囲では、溶媒中の濃度

に応じて子宮重量が増加します。日焼け止めに許可されている濃度は、4%です。5%を超える濃度では体重が低下し、10%では生存しません。この現象については、詳細はまだ不明です。また我々は、プロモデオキシウリジンの取り込みを用いて、子宮での分裂指数の測定も実施しています。

同定試験が陽性であれば、リスク評価に移ります。我々は、拡大1世代試験によるリスク評価を行っています。試験した中で最も活性の高かったUVフィルターは、4-メチルベンジリデン・カンフルでした。

10週にわたり、4-メチルベンジリデン・カンフルを含む飼料を与えてから交配し、仔について生後1日、生後14日、成熟期前後、若い成ラット、さらに一部は高齢成ラットの各時点で検査を行いました。

結果をみると、生後2日と14日の生存率は、高用量では著しく低下し、中用量でもいくぶん低下していました。最高用量の70 mg/kg（飼料中100 mg/kg）は、周産期毒性が高かったため除外しました。

興味深いことに、雌に対する作用の方が大きく出ました。雌の方が、明らかに強い作用を受けており、現在、出生時の性比に関して、詳しい観察を行っています。

まず、これが出生前の現象なのか出生後の現象なのか明らかにしたいと考えました。出生後の影響が大きくないことは、すでに確認しています。対照群の仔（出生前に曝露されていない）を、47 mg/kgで曝露した母ラットに授乳させるという養子実験を実施しました。出生後のみ曝露した仔は、すべて生存し、1頭のみがわずかな体重低下を示しました。

このことから、毒性学的には出生前の作用が決定的であると思われる。また、雌雄とも、出生時の胸腺重量に低下がみられました。このような4-MBCの周産期毒性については、まだ解明されていません。次に、内分泌攪乱活性との関連が強いと思われる、成長後の毒性について論じます。

我々は、発達毒性、成熟期と生殖器官の発達について検討しました。成熟期については、2001年夏と2002年春に、大規模な曝露試験を行った結果、成熟の遅れが有意に認められました。両者の結果はよく一致し、7 mg/kg（低用量）でも有意であり、季節とは無関係でした。また、生後14日と若い成ラットの精巣重量にも差がみられました。生後14日には精巣の相対重量と絶対重量が低下し、若い成ラットでは重量の増加がみられました。

雄の体重は変化しませんでした。1投与群のみで、わずかな差がみられました。精囊の重量は増加し、前立腺の重量は低下しました。

次に、遺伝子発現について述べます。安定状態にある動物で、エストロゲン依存性の遺伝子発現を検討しました。いくつかの投与レベルで、子宮と腹側前立腺の遺伝子発現に変化がみられました。分析には、シクロフィリンを参照遺伝子として、リアルタイムPCRを用いています。

プロゲステロン受容体、IGF-1受容体、ER α 、 β 、AR受容体のmRNAを検討しました。子宮では、各用量レベルでIGF-1受容体とプロゲステロン受容体の変化がみられました。腹側前立腺では、IGF-1とARへの作用がみられました。

脳についても検討しました。昨夕の発表データにも示されていましたが、胎児の精巣では、早期にテストステロンが産生されます。このホルモンが脳のニューロンに入り、芳香族化されてエストラジオールになり、それが中枢神経系ニューロンのエストロゲン受容体に結合します。その結果として生じる蛋白質またはmRNAが、脳を雌性化します。

視床下部腹内側核の脳組織を切り出しました。この領域は、雌の性行動と密接に関連しています。この部分を含む内側視索前野もまた、性的二形を示す脳領域です。対照群の母ラットから生まれた仔と、曝露された母ラットから生まれた仔では、エストロゲン受容体 α のmRNAが非常に異なっていました。雌と雄の対照群の間にも有意な差があり、雄は雌に比して、プロゲステロンおよびエストラジオール α 受容体のmRNA発現がはるかに低レベルでした。さらに、飼料中の4-MBC濃度の異なる群の間でも、ER α とプロゲステロン受容体の発現に、有意な変化がみられます。興味深いことに、曝露された雌では、エストラジオールおよびプロゲステロン受容体のmRNA発現が、対照群の雄に近い値となっています。

内側視索前野では、異なるパターンのmRNA発現がみられます。雄と雌のパターンには有意な差がなく、対照群と曝露群の差も小さいものです。プレプロエンケファリンには大きな差がみられませんが、視索前野のプロゲステロンおよびエストロゲン α 受容体のmRNAには差がみられます。すなわち、個々の脳領域は、それぞれの処置でエストロゲンに誘導されるmRNA発現パターンが異なると思われます。

安定状態にある成ラットの末梢器官では、エストロゲンに誘導される mRNA のパターンに、大きな変化がみられませんでした。そのため、性腺摘出により性ホルモンを除去してから 2 週間後にホルモン投与を行い、反応を調べました。

こちらに結果を示しています。性腺摘出から 2 週間後に 10 μ g または 50 μ g の 17 β エストラジオールを注射し、子宮のプロゲステロンおよび IGF-1 受容体 mRNA の発現を 6 時間にわたり測定しました。対照群（曝露なし）では、PR および IGF-1 受容体 mRNA が用量依存的に大幅に増加しましたが、一方 4-MBC に曝露されたラットでは、少しながら有意な用量依存的増加が見られました。これは、高用量の 4-MBC に曝露された動物ほど反応が少なく出ました。

前立腺腹葉の IGF-1 受容体 mRNA 発現は、子宮とは様相が異なっています。17 β エストラジオールを投与すると、対照群では IGF-1 受容体 mRNA 発現が抑制されましたが、高用量の 4-MBC に曝露された動物ほど、この抑制が少なくなりました。低用量の曝露でも、UV フィルターに曝露された動物は 17 β エストラジオールへの感受性が低下していると思われました。

以上で我々のデータはすべて紹介しましたが、最後に、魚類での 3-BC の影響に触れておきたいと思います。デンマークの Henrik Holbech らによる最初の発表では、雄のマスに 3-ベンジリデン・カンフルを注射すると、用量依存的にピテロゲニンが誘導されることが示されています。

このデータでは、種々の用量の 3-ベンジリデン・カンフルに曝露した後、17 β エストラジオールを投与した際のピテロゲニンの増加が示されています。この物質が環境に放出された場合、これらの動物に影響が生じることは、ほぼ確実だと思われまます。

以上に述べてきたように、我々は、UV フィルターの内分泌活性を確認しましたが、これまでに検討してきたのは、化粧品に含まれる UV フィルターのみです。これはおそらく、氷山の一角にすぎないと思われまます。すでにお話ししたように、工業製品には、もっと多くの UV フィルターが含まれています。我々の知らない製品の補助成分としても、多くが使用されていると思われまます。

日焼け止めに使用することが許可されている 30 種類の UV フィルターのうち、8 種類を検討した結果、6 種類が *in vitro* で陽性でした。8 種類のうち 4 種類は、*in vivo* でも陽性でした。

リスク評価においては、4-MBC は周産期における毒性が非常に強いことが認識されました。LOAEL（最小毒性量）は 7 mg/kg 体重であることが、これまでに確認されています。安定状態での末梢と脳における遺伝子発現レベルにも、この用量レベルで影響がみられ、発達期にこれらの物質に曝露された動物には、明らかなホルモン感受性の変化が生じています。

今後の展望としては、我々は、*in vivo* と *in vitro* での同定作業を継続し、また現時点では 7 mg/kg 体重という LOAEL しか確認されていませんが、これらの物質に関して NOAEL（無毒性量）も確定できるよう、リスク評価を拡大したいと考えています。低用量での試験を継続するとともに、新たな発達毒性試験において 3-ベンジリデン・カンフルの投与をすでに実施しています。ご静聴ありがとうございました。