

内分泌攪乱作用が疑われる物質の低用量における影響評価の試み

青山 博昭

財団法人残留農薬研究所

ご紹介ありがとうございます。私は残留農薬研究所の青山と申します。

今日は、内分泌攪乱作用が疑われるさまざまな物質の低用量域における影響をどうやって評価していくかということについて、簡単にお話しします。

まず、何よりも低用量影響はどういった概念で考えればよいのだろうかということ、簡単にお話しします。ここに簡単に模式図を書きましたが、これは一つのグラフだと思ってください。

横軸に物質の投与用量をとり、縦軸にそれに対する動物の反応をとりますと、例えばある種の毒物を動物に投与した場合、体重を測定していきますと、ある用量になるまでは特に変化は起こりませんが、あるところを超しますと、順に体重が下がってくるという反応が通常は見られます。あるいは例えば農薬の DDT のようなものを投与しますと、肝臓の重量などを見た場合には、やはりあるところまでは反応がありませんが、ある用量を超しますと順に肝臓の重量が重くなるといった反応が見られます。このような反応が見られる場合は、ここが通常「最大無影響量」といいますが、あるところを超えて反応が起こるまでの間に「閾値」（いきち）といわれる領域があり、そこを超した場合に反応が起こります。さらに、その反応は、一般的には「投与用量が多くなれば反応は強くなる」と理解されています。

ところが、数年前から、エストロゲン様の物質、特にジェチルスチルベステロールとかビスフェノール A のような物質を妊娠中のある時期に母親に投与して生まれてくる子どもの雄の前立腺の重量を見ますと、こういったものとは少し違う用量反応関係が観察されるとの報告が相次ぐようになりました。つまり、ここが無処置の動物としますと、非常に低い用量でいったん前立腺の重量が少し重くなって、その次の用量でほとんど反応しないような領域が出て、それよりもっと高い用量を投与すると逆に前立腺は小さくなると言うのです。

「低いところでは高くなって、より高い用量では低くなる」この部分がちょうど U の字をひっくり返したように見えますから、これを「逆 U 字現象」と呼びます。

最近の研究成果から、こういった非直線的な用量反応関係が出る場合がありうるのではないかということが指摘されはじめました。これは従来までのリスクアセスメントから考えると、少し問題です。

これはどういうことかということ、例えば先程の森先生のお話にも出てきましたが、我々の食事中にはフィトエストロゲンがかなりの量が含まれています。森先生のデータによりますと、お母さんが摂取したフィトエストロゲンは、僅かとは言え胎児に移行しているようです。そのほかに、飲み水などの中にも非常に濃度は低いながらもいろいろな化学物質が検出されます。そうすると、毒性試験で無影響量といわれている量よりも少ししか摂取しないから大丈夫だと思っていたのが、もしかすると僕たちの環境は大丈夫ではないのではないかと心配も現れてきたわけです。

ところが、逆に一方でよく考えてみますと、先程のような実験をしたときに、無処置、つまりコントロールと呼んでいる比較対照のための動物でも、普通の餌を食べるわけですから、すでにフィトエストロゲンにさらされていることに気づきます。また、普通の水道水を飲ませたのであれば、無処置動物といえどもごくわずかながら化学物質を摂取していることとなります。そうすると、いったいどういう場合にそういった反応（逆 U 字現象）が出るのだろうかというのが、非常にわからなくなってきました。

この辺のところをもう少し整理するために、ではもう一度きちんとしたデータを探ってみようという動きが世界中で起こりました。一部では追試験をやりましたが、先程のような低用量での影響は確認されない場合もありました。こういったものも、いくつかの論文となって報告されています。あるいは低用量影響が追認できたというデータも出てきましたが、相変わらず、どうしてそういう逆 U 字のようなことが起こるのだろうかというメカニズムはよくわかっていません。それで、このあたりをしっかりと調べるには今までやっているような従来型の実験方法では不十分ではないかという懸念も出てきましたので、私どもではまず試験法の検討から始めました。

これは、最も標準的なプロトコルに沿って行われている従来からの生殖毒性試験において、生まれてくる子どもをどうやって検査するかをマンガに描いたものです。ここにネクタイをしている方がお父さんです。こちらはお母さんです。ネズミというのは多産な動物で、1回に多いと20匹近く、ここでは13匹ぐらいですが、一度に子どもが生まれます。生まれた日には外表の検査等は全部実施しますが、哺育の大体4日になりますと、子どもが多すぎるとうまく育たない子どもが出てきてしまいますから、一定の数の動物を間引いてしまいます。

通常は雄と雌4匹ずつを残して、残りの動物は間引いて捨ててしまいます。もちろん、検査をした後に捨てます。その後、大体ラットでは哺育の21日に離乳しますが、この時点で雄1匹と雌1匹を残して、ほかの動物はここで処分してしまいます。そうしますと、こんなにたくさん生まれた子どもの中で、雄1匹、雌1匹の代表だけがあとになって生殖機能等の検査を受けることになるわけです。

例えばこの辺に赤く囲ったほんの1匹か2匹だけに異常が出た場合でも、途中で落とされてしまいますと、大人になってから一部の動物のみを調べたのでは、たまたま影響の出なかった子どもだけ調べているという可能性が出てしまいます。一方で、逆にここに赤丸をつけましたが、こういった実験動物には遺伝的にはいろいろと変異がある個体もいるわけですから、例えば遺伝的に精子の形成があまりうまく進まないという動物が混じってしまうこともあり得ます。この個体は、化学物質の投与によってそうなったのではなくて、もともと体質としてそういうものを持っていた訳ですが、この個体が検査用の動物として偶然に選ばれてしまいますと、今度は逆に化学物質の影響ではないのに精子の形成異常などが認められて、いかにも化学物質の投与によって起こってしまったという誤解を招くことがあります。我々は、こういったことがないような実験系を考えなければなりません。

この図に示すような実験方法を、我々はトランスジェネレーション・アッセイと呼んでいます。実験のコンセプトは、次のようなものです。動物を交配して、化学物質は妊娠期間と哺育期間を通じて母親のみに投与します。生まれてきた子どもは間引き等を一切しないで、すべて離乳させてしまいます。約半数の腹から生まれた子どもについては、離乳の時点ですべてを解剖して、一定の検査をします。一方、残る半分の腹から生まれた子どもは、すべて大人になるまで飼育して、その間の性成熟の過程や精子の検査等を実施します。さらに、遺伝的なトラブルを起こさないように遺伝的背景が均一な動物を使うことや、フィトエストロゲンを含まないなるべくノイズの少ないエサを使うことにより、低用量の影響を可能な限り正確につかまえようという実験をやってみたわけです。今回の実験では、参照物質として、合成エストロゲンであるエチニルエストラジオールを低用量で皮下投与してみました。

ここには生殖能力に関する主な検査項目を書きましたが、母親については例えば妊娠率、着床数、あるいは産児数を見ていきます。子どもについては、肛門生殖突起間距離や生殖器・副生殖器の重量、遺伝子発現、性成熟、性周期、あるいは精子能検査といったものを、すべての個体について1つずつ丁寧に見たわけです。

これは、肛門生殖突起間距離 (anogenital distance : AGD) を測っているところです。これは、ラットの、実は生まれた子どもではなくて、出産直前の胎児で測定している写真です。こちらが男の子、こちらは女の子で、ここに生殖突起があって、ここにお尻があって、この距離が雄では大体雌の2倍ぐらいですから、通常はこれを観察することによって雄・雌を確認していきます。そのときに距離を測って、変化をきっちり定量化してみようということをやったわけです。

ここからは、簡単に結果をお示しします。まずエチニルエストラジオールの母親に対する影響を見ます。ここに投与用量を書きましたが、0から一番上でも1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (マイクログラム/キログラム) というきわめて低用量です。ヒトが経口避妊薬として使うピルは実はこのエチニルエストラジオールが主成分ですが、ピルとしての用量が大体このあたり、0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ぐらいです。それから、モーニングアフター・ピルとして使うときは1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、3倍量ぐらいを使うと聞いています。この0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ぐらいをラットに投与しますと、妊娠は成立しましたが、この投与群では産児数が非常に小さくなってしまいました。正常なものではたいてい10匹前後生まれるのが、2.5匹ぐらいしか生まれません。

さらに、1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約3倍の投与量になりますと、妊娠が成立しなくなって、この投与群では子どもは1匹も得られませんでした。つまり、ラットの母親は、大体ヒトと同じ程度に反応した訳です。もちろん、0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ よりも低い用量では、こういった生殖能力には何ら影響はありませんでした。

生まれてきた子どもについて見ます。先程のスライドでお示したように、 $0.3\mu\text{g}/\text{kg}$ よりも上の用量では子どもがほとんど生まれませんし、生まれた子どもは匹数が少ないので母親が上手く育てないという事情もあって、データが得られませんでした。つまり、実際には 0.01 、 0.03 、 $0.1\mu\text{g}/\text{kg}$ という用量でしか子どもを調べられませんでした。この表では基本的に離乳時で調べた結果を書いています、この AGD だけは生まれたときに調べています。そうしますと、AGD については、一番下の投与用量である $0.01\mu\text{g}/\text{kg}$ からすべての投与群で、統計学的に有意な延長が見られました。これは、女の子の表現型が少し雄型に変わりつつあるとも解釈できる結果であると思います。しかし、前立腺や子宮の重量は、実は前のレポートの結果から前立腺の重量が上がるのではないかと予測していましたが、全く変化しませんでした。そのほかの臓器を見ても、重さが変わったものはありませんでした。

前立腺における遺伝子の発現を見ますと、いくつか調べたうちのエストロゲン・レセプターのベータ（エストロゲン受容体のベータ型）は、一番下の用量からきれいに発現が低下していました。また、アンドロゲン・レセプター（男性ホルモンレセプター）を見ますと、前立腺ではその発現が低下していました。一方、子宮においても IGF-1（エストロゲンに対する応答遺伝子）が明らかに増加しており、遺伝子発現の水準で調べますと、どうも動物は一番下の用量から反応しているらしいことがわかってきました。

これはその子どもが大人になってから調べたものですが、同じような用量で見えていきますと、まず臓器の重量で、副腎という臓器が少し重くなる傾向があり、一番下の用量から反応していました。一部の中間量投与群では統計学的な差が見られませんでした、傾向としてどの投与群でもほとんど同じような反応が見られます。この変化については、雄では最低用量から明らかですが、雌では一番上の $0.1\mu\text{g}/\text{kg}$ ぐらいで初めて明らかになります。前立腺と子宮は、相変わらず重さは変わりませんでした。

遺伝子の発現を見ますと、離乳のときに見たものでは、エストロゲン・レセプターのベータは前立腺で有意に低下していました。それから、前立腺ではアンドロゲン・レセプターも有意に低下したということがありました。しかし、大人になってから調べてみると、今度は逆に、前立腺ではそれらの遺伝子の発現が有意に増加していました。また、そのほかにも、エストロゲン・レセプターのアルファも少し増えていました。子宮においても、遺伝子によって増減の方向が違ったり、あるいは異なる遺伝子であったりしますが、遺伝子発現のレベルでは一番低い用量から反応が見られることが、ここでも確認できました。ただし、全体的に見ますと、離乳時と成熟後では反応の方向が逆である場合の方が多いようでした。

こういったことがらをまとめますと、今回僕たちが行った実験では、少なくとも母親に対するエストロゲンの影響は十分感度よく観察されたと判断できます。また、児動物については一番下の用量においても遺伝子の発現や AGD といった観察項目に変化が見られたことから、動物は非常に低用量のエストロゲンに反応することも確認できました。

しかし、最初にお示したような逆U字という現象は観察されないで、いずれも直線的な用量反応関係、あるいはいったん低用量で反応が起これば少々用量が上がっても同じ程度の反応しか起これないといった反応でした。遺伝子レベルの変化は、いったん増えたら増えっぱなし、あるいは減ったら減りっぱなしというのではなくて、可塑性のある変化でした。さらに、こういった遺伝子レベルで変化が見られた臓器であっても、重量に変化は認められません。ここではデータは出しませんが、大人になってから観察した性成熟や精子形成能力といった繁殖にかかわる指標にも、異常は何も認められませんでした。

以上の結果から、今回の実験系は、エストロゲン様作用を持つ化学物質の低用量の影響を評価するために非常に適した実験系であることが示唆されました。今後、先程から話題に上っているノニルフェノールやオクチルフェノールも含めて、エストロゲン様作用がある環境中の化学物質の検査にこういった手法で取組んでいこうと考えております。

もう1つ、今私が出している感想ですが、母動物の生殖機能に影響を及ぼさない程度の非常に低用量のエストロゲンを妊娠中の母親に曝露した場合、児動物は確かに曝露した低用量のエストロゲンに反応することが明らかになったと思います。しかし、その反応には可塑性があることから、そのような反応はおそらく生物学的な適応現象の一つと解釈するのが現時点では適当ではなかろうかと考えています。

最後になりましたが、今回の仕事は非常に大変な労力を要するものであり、私の研究所の私のラボ、生殖毒性学研究室に限らず、動物管理室や病理、あるいは生化学のラボの非常に多くの人たちの協力をもって成し遂

げられたものです。また、日本獣医畜産大学の鈴木先生には、方法論の検討あたりからずいぶんいろいろなご示唆をいただきました。さらに、化学物質の分析、あるいは化合物の手配等については、日本NUSの川嶋さんにずいぶんとお世話になりました。また、プロジェクト全体については、環境省の鷺見専門官にお世話になりました。この場を借りて、ご協力いただきました皆様に御礼を申し上げます。ご清聴ありがとうございます。