

ビスフェノールAの低用量作用に関する最近の研究所見

フレデリック S. フォン サール

米国 ミズーリ大学コロンビア校

ビスフェノール A は、最近、内分泌攪乱の問題を懸念する様々な学問分野の研究者らが研究対象として選択している主な内分泌攪乱化学物質の1つとなっています。これに関する論文は、毒物学の分野以外でも広範囲にわたる学術誌で出版されており、新たな知見が毎月発表されています。

「低用量」とは毒性試験で一般的に使用される用量よりも低い用量を指し、ヒトの曝露範囲内の用量でもあります。

米国プラスチック工業会は、リスクアセスメントの目的では、最大無作用量 (NOEL) を $50,000 \mu\text{g/kg/日}$ とすることを推奨しています。従って、 $50,000 \mu\text{g/kg/日}$ 未満の用量は「低用量」の範囲と見なされるということです。

この講演では次のトピックについてお話しします。

1. 内因性ホルモンは非常に低用量で作用を起こす
2. 男性と女性におけるビスフェノール A の低用量作用および DES と比較したビスフェノール A の作用
3. ビスフェノール A の低用量作用の機序の可能性
4. 動物飼料の成分は内分泌攪乱物質であり、内分泌攪乱物質に関する研究を実施するときには考慮する必要がある
5. リスクアセスメントに対する逆 U 字型の用量反応曲線の意味

エストラジオールのような内因性ホルモンが極めて低用量で胎仔組織に永続的作用を及ぼすことが研究により示されていることから、毒物学における「低用量」の問題が重要であることが明らかになりました。例えば、(母親への投与に起因して) CF-1 マウス胎仔の血清中の遊離 (生理活性を有する) エストラジオールが 0.1 pg/ml (0.1 ppt) 増加すると、その結果、前立腺の大きさと前立腺アンドロゲン受容体に永久的な増加が生じました。我々は、ビスフェノール A が血漿エストロゲン結合タンパクに結合せず、それが妊娠中に存在する高濃度のエストロゲンへの曝露から胎仔を保護していることを発見したときに、低用量のエストラジオールおよび DES などの他のエストロゲン様化学物質を用いた研究が、低用量のビスフェノール A に関する試験へと発展しました。

Gupta は、CD-1 マウスにおいて、 $50 \mu\text{g/kg/日}$ のビスフェノール A を妊娠中のマウスに投与したところ、前立腺の大きさとアンドロゲン受容体に永久的な増加をもたらした (また、ビスフェノール A は精巣上体の大きさを減少させた) と報告しています。これらの所見は、私がエストラジオールについて報告したものと事実上まったく同じでした。Gupta の所見は、私の研究室で得られたビスフェノール A に関する所見を再現するものでもありました。我々は、妊娠中のマウスに 2 および $20 \mu\text{g/kg/日}$ のビスフェノール A を投与し、雄出生仔の前立腺の永久的な増大、精巣上体の大きさの減少、精子の1日生産量の減少を報告しました。妊娠中のマウスにビスフェノール A を 2 および $20 \mu\text{g/kg/日}$ の用量で投与した際のこれらの作用は、妊娠中のマウスに 0.02 および $0.2 \mu\text{g/kg/日}$ の DES を投与した際の作用に類似していました。これらの所見は、胎仔の前立腺ではビスフェノール A が DES の約 100 分の 1 の効力であることを示しています。さらに、ビスフェノール A と DES が対照群と比較して同比率で前立腺の大きさを増加させ、前立腺膨大の刺激ではビスフェノール A と DES が類似した効力があることを明らかにしています。

エストラジオールと DES の用量反応曲線が逆 U 字を形成することは注意すべき重要な点です。前立腺の大きさの最大増加 (前立腺の大きさの最大増加は対照群と比較して約 40%の増加) が起こった後に用量をさらに増やすと前立腺の大きさは減少します。

米国化学工業毒性学研究所の Frank Welsch らは、妊娠中および授乳中の SD ラットを妊娠第 2 日から出生後第 21 日にわたり飲用水に混入したビスフェノール A (0 、 0.005 、 0.05 、 0.5 、 5.0 、または 50 mg/L) に曝露させました。Frank Welsch らは、妊娠中のラットが 0.001 から 10 mg/kg/日 の BPA 用量を摂取したと推定しました。出版された論文で、著者らは、包皮の分離、肛門性器間距離、体重、雄の出生仔の腹側

前立腺の臓器重量に対し BPA は全く影響を及ぼさなかったと結論しました。低用量問題を検討するために米国国立衛生研究所が選定した委員会は、ビスフェノール A の作用がまったくなかったとするこの結論の論拠には「欠陥があり」、「非論理的であり」、「誤解を招く」と述べています。この NIH 低用量検討委員会は、腹側前立腺の重量に対しビスフェノール A の 10、1000、10,000 μ g/kg/日は著しい影響があったと述べています。

US-EPA によって承認されているビスフェノール A の現行の LOAEL は 50 mg/kg/日であり、また、US-EPA がヒトが摂取して安全であると見なしている 1 日用量は 50 μ g/kg/日であるため、上述の所見は重要です。

ビスフェノール A および DES などの他のエストロゲンが前立腺に直接影響を及ぼしているかどうかを判断するため、Gupta は胎仔マウス前立腺を初代培養として実験したところ、50 pg/ml (50 ppt) の用量では前立腺の成長と腺形成およびアンドロゲン受容体の形成が促進されましたが、5 ppt の用量では促進作用は認められませんでした。50 ppt のビスフェノール A の作用は、0.5 ppt の DES の作用に類似していました。まとめると、これらの所見は、胎仔前立腺においてはビスフェノール A が DES の約 100 分の 1 の強さであるというさらなる証拠を示しています。

ヒト胎児血清の非抱合型ビスフェノール A の濃度は 0.1~10 ng/ml (0.2~9 ppb) の範囲であり、ヒト男性胎児における平均ビスフェノール A 濃度は 3.5 ppb と報告されているため、これらの所見は重要です。すなわち、マウスとラットの胎仔で報告されている影響は、ヒト胎児で影響が発見されている濃度よりも低い用量で生じています。

我々は、妊娠中のマウスに 20 μ g/kg/日を投与することにより、マウス胎仔をビスフェノール A に暴露させました。その結果、雄出生仔の成熟時の 1 日精子生産量に減少が生じました。

成熟した SD ラットに広範囲の用量のビスフェノール A を投与しました。20 μ g/kg/日以上用量では、ビスフェノール A は 1 日精子生産量を減少させました。しかし、20 μ g/kg/日を投与した場合の 1 日精子生産量の減少の程度は、200 mg/kg/日 (10,000 倍の用量) で観察された生産量抑制と差はありませんでした。

この所見は、胎仔期のみ DES に曝露した CF-1 マウスにおける 1 日の精子生産量への DES の作用に関する用量反応曲線に類似しています。この場合は母体投与量 0.01 μ g/kg/日で 1 日精子生産量に最大の減少が生じ、これは妊娠中の雌に 1 μ g/kg/日を投与した場合と同じでした。ビスフェノール A および他のエストロゲン様化学物質が 1 日精子生産量を阻害する際の最大量は、対照群の 1 日精子生産量の約 40%です。Sakaue が行った試験の重要な点は、ビスフェノール A が成体の精巣に対しても、胎仔期のみビスフェノール A に曝露した成体における影響と同じ影響を生じさせることです。

妊娠中の雌マウスに投与した非常に低用量 (2 および 20 μ g/kg/日) のビスフェノール A が出生仔の行動に及ぼす影響も報告されています。特に、ビスフェノール A の何れの用量でも、雄の出生仔が攻撃的な方法で他の雄と接触する時間の長さは著しく延長しました。低用量のビスフェノール A への発達期の曝露がラットの行動に及ぼす他の影響についても報告されています。

1 ppb という非常に低用量のビスフェノール A の影響が Oehlmann らによる淡水性および海水性マキガイの研究で報告されています。当初行われた一連の試験で用いられた最低用量 (1 ppb) では、ビスフェノール A は淡水性および海水性マキガイに生殖器の異常と卵母細胞生産の異常を生じさせました。海水性マキガイ *Nucella lapillus* を成熟期にのみ曝露させたところ、ここでも最低用量 (1 ppb) で雄に陰茎と前立腺の短縮と精子貯留量の減少が見られました。また、ビスフェノール A は 1 ppb の用量で淡水性マキガイの死亡率の増加をもたらしました。

ビスフェノール A への発達期曝露によりその後の成長率と思春期のタイミングに影響が及ぶことが報告されています。CF-1 マウスでは、妊娠中の雌にビスフェノール A の 2 μ g/kg/日を投与したところ、雌の出生仔は対照群よりも早く思春期が現れました。同様の所見は、CD 1 マウスに 20 μ g/kg/日を投与した Iguchi らによっても報告されています。しかし、Howdeshell の研究では、出生時に出生仔を代理母に託したところ、胎仔期にビスフェノール A に曝露した雄および雌の出生仔は離乳時の体重が対照群を上回っていました。逆に、Homma の研究では、出生仔をビスフェノール A を投与した母親に継続して育てさ

せたところ、ビスフェノール A に曝露した出生仔は離乳時の体重が対照群を下回っていました。ビスフェノール A を妊娠中の雌マウスに投与すると、保育行動の減少が生じる可能性があるという予測は、Palanza の研究で確認されました。しかし、Palanza の研究では、ビスフェノール A を原因とする保育行動の減少が、出生仔の体重の顕著な減少を生じさせるには至りませんでした。これらの研究における体重差の根本的理由については、さらに調査する必要がありますが、ビスフェノール A は、保育行動に対する影響において恐らく何らかの役割を果たしていると考えられます。

雌のラットおよびマウスの子宮は、雄の前立腺と比較して、ビスフェノール A に対する感受性が著しく低いことを示した研究がいくつかあります。例えば、我々はシラスチックカプセルに入れた DES とビスフェノール A を 5 日間にわたり生まれたばかりの雌の CD-1 マウスに投与しました。0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ の用量では、DES は子宮の成長を著しく促進しました。しかし、10,000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ (最大投与量) までの用量では、子宮重量に対するビスフェノール A の影響は見られませんでした。思春期前の CD-1 マウスで子宮重量の中等度の増加を観察するには、100 $\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ の用量を必要としました。これらの所見は、組織によってビスフェノール A に対する感受性に著しい差があることを示しています。一方、前立腺と子宮の DES に対する感受性は事実上同一でした。

いくつかの研究から得られた所見は、分子レベルでは、ビスフェノール A とエストラジオールにはエストロゲン受容体との相互作用に差があることを示唆しています。これは、エストロゲン受容体とコアクティベーターと称されるタンパク質との相互作用に差があることの根拠を示すものです。エストロゲン受容体は、化学物質と結合すると、コレギュレーターとの関連を介して遺伝子転写の速度を調節します。コアクティベーターとコリプレッサーの相対的な発現頻度の全体的なバランスは、ビスフェノール A のような化学物質の組織特異性の重要な決定要素であると思われます。従って、あるタイプの組織に影響を生じさせるために必要なビスフェノール A の用量を、別のタイプの組織に反応を誘発させるために必要な用量の予測に使用することはできません。

また、現在、エストラジオールの一部の影響が受容体と関連する細胞信号伝達系の活性化を通して起こり、その受容体は細胞核に配置されているのではなく細胞膜に関連していることを示す有力な証拠があります。これらの影響は非常に急速であり、十分に研究されている細胞核にある受容体を介して起こる影響に加えて起こりますが、起こるまでにより長い時間を要します。細胞信号伝達系の特性の 1 つは、増幅のレベルが非常に高いことで、その結果、非常に低濃度の化合物でも細胞機能の大きい変化を生じさせる場合があります。最近の研究では、ビスフェノール A は、エストラジオールと同様に、低濃度 (1 nM または 228 ppt) で非ゲノム (非細胞核) 受容体を介して細胞信号伝達系を活性化することが示されています。

プラスチックメーカーは、自分たちが後援した試験ではビスフェノール A にはまったく影響がないことが示されていると主張しています。我々は、これまでに実施された試験においてビスフェノール A への胎仔期曝露の結果に差が生じた根拠を調査しました。これらの試験では、妊娠中の CF-1 マウスにビスフェノール A を投与して、出生後の雄の出生仔を調べていました。興味深い点は、プラスチック業界の試験では、対照群の動物の前立腺が、同年齢の同一系統のマウスを使用して行ったフォンサール研究室の試験で報告された対照群の前立腺の重量よりも顕著に肥大していたことです。これらの研究において体重および前立腺重量に差が生じたことの根拠の 1 つと考えられるのは、プラスチック業界の試験では、フォンサール研究室の試験で使用した飼料とは異なる飼料が使用されたことでした。従って、我々は CD-1 マウスに関し、プラスチック業界が使用した飼料 (Purina 5002) とフォンサールの試験で使用した飼料 (妊娠中と授乳中は Purina 5008、離乳後の維持飼料は Purina 5001) への曝露の影響を比較しました。

我々の所見では、Purina 5002 飼料に曝露した成熟した雄の CD-1 マウスは、Purina 5008/5001 飼料に曝露した雄よりも著しく多くの腹部脂肪を蓄えていたことを示しています。

さらに、5002 飼料を摂取していた雄には、5008/5001 飼料を摂取していた雄の前立腺より有意に (約 40%) 重い前立腺が見られました。従って、5002 飼料では、雄が高濃度のエストロゲンに曝露するという結果になると言えます。しかしながら、5002 飼料は 5008/5001 飼料よりもフィトエストロゲンは低濃度です。

我々は母親と胎仔の血液のエストラジオール濃度を調べたところ、5002 飼料に曝露した母親および雄

と雌の両方の胎仔の方が 5008 飼料を摂取していたマウスよりもエストラジオール濃度を著しく上昇させていました。

現行のリスクアセスメントの方法は、用量反応曲線の形状が常に単調であるという仮定に基づいています。しかし、ホルモン、薬剤、およびホルモン機序を介して作用するその他の化学物質を扱う実験では、用量反応曲線が単調ではなく逆 U 字を形成することが非常に一般的です。このことは内分泌学で「2 相性」用量反応曲線と呼ばれています。一方、毒物学ではこの現象の認識が欠如しているように思われます。すなわち、毒物学的研究の多くは、影響が限定された「低用量の」範囲で起こるだけで、それよりも高い用量や低い用量で影響が見られないと、用量と反応の間には関係がなかったと結論しています。明らかに、すべての用量反応関係が非単調であるわけではありませんが、非単調な用量反応関係が内分泌学では一般に起こっているという事実は、環境内化学物質への曝露のリスクアセスメントのプロセスには取り入れられませんでした。そのため、リスクアセスメントでは、「安全な」曝露レベルは、化学物質を数種類の非常に高用量かつ数種類の用量で試験し、線形の外挿法モデルを使用して LOAEL または NOAEL の用量から推定しています。この場合、LOAEL または NOAEL を 3~10 倍の安全係数で割って基準用量 (RfD) を計算しています。高用量で試験を行ったときに、低用量で起こる有害作用が生じなかった場合は、この外挿法では、広範囲の用量を用いた試験をもとにして計算した値よりも何千倍も高い基準用量が計算される可能性があります。

ppb や ppt といった極めて低用量のビスフェノール A への曝露に起因する有害作用が非常に高用量では見られないことを示した研究のデータがあります。例えば、ヒト前立腺癌細胞は、230 ppt の用量では刺激を受けて培養基中で増殖しますが、23 ppb の用量では細胞増殖の作用は見られず、逆 U 字型の用量反応曲線が認められました。

妊娠中の雌の CD-1 マウスを 25 μ g/kg/日に曝露させると、30 日齢に乳腺管の長さの顕著な延長が見られますが、250 μ g/kg/日への出生前曝露は乳腺管の長さの顕著な短縮をもたらし、逆 U 字型の用量反応曲線が見られました。その後の成熟期においてはビスフェノール A の 25 および 250 μ g/kg/日の両方の用量で乳腺管の長さの延長が認められるため、このことは、250 μ g/kg/日の用量に曝露した雌では発生における遅延があったことを示唆しています。

5 および 25 ppb のビスフェノール A で淡水性マキガイが生産する胚の数の著しい増加が観察されましたが、100 ppb では観察されず、ここでも逆 U 字型の用量反応曲線が見られました。これらの所見は、様々なモデルシステムでビスフェノール A が他のホルモンの活性を有する化学物質と同様に逆 U 字型の用量反応曲線を呈する場合があることを示すものです。

淡水性マキガイにおけるビスフェノール A の無影響濃度が 8 ppt であるとする Oehlmann らの所見は、河川水におけるビスフェノール A の濃度がマキガイの無影響濃度よりも高いということを根拠にしており、野生生物の安全を確保するビスフェノール A の環境中濃度を達成するためにはこれらの所見を考慮すべきであるとの勧告につながりました。

要約すると、マキガイ、魚、カエル、鳥、および哺乳動物においてはビスフェノール A の低用量作用を示す広範囲にわたる研究所見があります。重要な点は、これらの影響が、成人期のみならず、胎児期や出生後の曝露で起こることです。ビスフェノール A の有害作用は、女性やヒト胎児の血中濃度の範囲内の用量で起こるのです。

質疑応答

森田：フォンサー教授、どうもありがとうございます。低用量作用、特に低用量作用の批評と低用量作用の機序に関する非常に重要な研究でした。コメントまたは質問を受け付けたいと思います。

ベッカー：ありがとうございます。今朝は非常に素晴らしいプレゼンテーションをありがとうございます。米国化学工業協会の Rick Becker です。

フォンサー博士、先週の IUPAC のミーティングにあなたが出席されなかったこと、あるいは、John Ashby がこの会議に参加できなかったことは残念だと思います。というのは、私自身もここにいらっしゃる他の皆さんも John に代わって彼の研究について述べるのができないからです。しかし、その研究のすべてについては、あなたの研究と同様、ピアレビューに公開されています。

科学的コミュニティにおいて、我々が証拠をもとに重み付けをして情報を見る場合に我々の間に差があることは非常に重要です。証拠をもとに重み付けをして物事を観察することについては、ある程度は意見の一致があると私は考えています。

1 つの疑問は、あなたがリスクアセスメントは暴露、背景暴露、血流中エストロゲンおよび環境中エストロゲンの既存の濃度の視点から全体的に見る必要があるとおっしゃったことです。

そこで、私の質問は、あなたはフィトエストロゲンへのヒトの曝露を考えたことはありますか、また、ヒトの食事の一部はフィトエストロゲンが豊富に含まれているという事実がある中で、ビスフェノール A や他のいわゆる環境エストロゲンは一体どのような位置付けになるのでしょうかという点です。これらの化学物質への曝露よりも 1 万倍もの高濃度でフィトエストロゲンに曝露していることを示した Safe 博士らの研究についてはご存知だと思います。

最後の疑問です。あなたがコメントされた内容についてですが、そのコメントは研究による裏付けはないと私は思います。マウスにおける肥大した前立腺が癌の発生を招くというのは、まだ見たことがありません。それが発表されたのを見たという記憶もありません。

フォンサー：私はそのようなことは言っていません。このことははっきりしていることなので、

明確にしておきたいと思います。なぜなら、我々はリスクのバイオマーカーについて話をしているからです。アンドロゲン受容体の増加やホルモン応答の増加は、あなたの血中の受容体が増加しても、ホルモンが増加しても、あなたの応答のレベルは高くなり、増殖のレベルも高くなります。そしてそのことにより、これは非常に明らかですが、乳癌や前立腺癌については、あなたをハイリスクのカテゴリーに分類することになります。

リスクと関係があるのはバイオマーカーです。我々が特定することができるのは原因となる経路ではありません。我々は、高い発現率で起こっているこの増殖イベントが、どのようにして腫瘍になる確率が高くなることにつながるのか分っていませんが、それが起こっていることはきちんと文書で発表されています。

そのことははっきりさせておきたいと思います。なぜなら、我々が使用しているマウスは、前立腺癌モデルではないからです。しかし、ヒトの前立腺癌については、もしあなた自身のアンドロゲン受容体が高濃度であれば、あなたはそのような個体についてもっと心配するでしょう。しかし、あなたは、さまざまな異なる問題を提示しておられる。

これらは、Cagen と、まさにその John Ashby のデータなのです。あなたは証拠の重みの問題を云々されていますが、そのことは私が話していることとは何の関係もありません。私は、データセットが生成された方法のメカニズムを理解することを言っているのです。私があなたに申し上げているのは、私は今ここで全く同じデータセットを生成することができるということです。では、彼らの文献における差を申し上げます。私は彼らのデータが正しくないと言っているのではありません。実際、私はそれを再現できると言っているのです。私はそのことを強調したいと思います。

異常に肥大した前立腺というこの所見を私が再現できる理由は、彼らは動物に 5002 を与えており、Ashby の研究室のケースでは、私は 5002 を入手しませんでした。動物は明らかに脂肪の量が多く、肥大した前立腺があったからです。それらは同じに見えます。

生物学者ならば、陽性対照と陰性対照が全く同一なアッセイに出会えば、汚染の発生を疑います。

それが陰性対照を加える理由だからです。その考え方に基づいて、我々は汚染源を探しました。そして、これは、あなたが尋ねられた質問の1つに関係しています。つまり、フィトエストロゲンに富んだ飼料が、非常に興味深いことに、最も低い内因性エストロジオールと関連していたことです。

あなたは、フィトエストロゲンがエストロゲン合成と血中のエストロゲン輸送を実際に抑制することを示した文献がかなりあることを知っておられるに違いないと私は確信しており、そしてこれはまさしく予測です。

ライフステージにおける暴露という観点から重要であると私が懸念していることとは、Steve Safe が取り上げた問題を超越するもので、私はこのことについて何回も話し合ってきました。つまり、あなたが出生後の雌から卵巣を摘出するか、あるいは思春期前にその雌にエストロゲンがない場合、飼料中のフィトエストロゲンがエストロゲン様作用を持つということです。

しかしエストロゲン濃度が非常に高い妊娠中には、抑制効果が生じます。また、内分泌攪乱化学物質問題との関わりを考える上では、これは本日の午後のディスカッションの一部として取り上げられることを期待しますが、赤ん坊は小さな大人ではないことです。また、妊娠はユニークかつ非常に異なった生理状態であることです。さらに、妊娠中におけるビスフェノール A の薬力学は、妊娠していないときとは全く異なることです。

同じことがフィトエストロゲンについても言えます。そして、成人や高齢集団におけるフィトエストロゲンに関する文献は、妊娠中の女性やその胎児にフィトエストロゲンがどのような影響を及ぼすかとは無関係です。それについては、かなりの文書があります。

私はフィトエストロゲンに非常に関心があります。なぜなら、これらの種類のデータ、またビスフェノール A などの外因性化学物質とフィトエストロゲンの相互作用の仕方に関心があるからです。我々は絶対的にその種の研究を必要としています。私は現在その研究を行っており、将来、その研究に関するデータが提示できるでしょう。私

はここに書くことはできませんが、現時点で推測していることが数多くあります。そして私が懸念していることの1つは、多分、実際に起こることは、我々が考えていることとまったく同じにはならないだろうということです。従って、あなたのすべての質問に答えるとすれば、私には分からないと答えることになります。

ベッカー：私もそう思います。内因性であるか、食物中のフィトエストロゲンからの外因性、または環境汚染からの外因性であるかどうかに関わらず、エストロゲン暴露のさまざまなタイプを広範囲にわたり観察する必要があるという点では意見の一致があると思います。私は、リスクアセスメントを行うためには、あなたは全体像を見る必要があると思います。従って、そこには意見の一致があると思います。

フォンサー：それがここで述べた私のメッセージの中心部分であると思います。そして、我々がこれに関しては同じ見解であることを非常にうれしく思います。もしそれらの因子を残らず考慮するのでなければ、非常に大きな誤解が生じ、結果を誤って理解してしまうことになるでしょう。

これは標準的手法を確立することの一部でもあります。我々は、モデル動物系、使用した飼料の種類、曝露のタイミング、曝露経路を十分に考慮する必要があります。それらは結果を劇的に変えることがあるため、非常に重要になります。

私は、誰かが正確でないデータを作り出しているのだと言っているわけではありません。我々は、このような実験をごくわずかに異なる方法で行ったときに、どのような違いが生じてくるかを機械的なレベルで徐々に理解してきました。生物学観点からは、そのことは常に非常に興味深いことです。

森田：どうもありがとうございます。申し訳ございませんが、終了時間になりました。質問はこのセッションのあとでお願いします。フォンサー教授、どうもありがとうございました。