



International Symposium on Environmental Endocrine Disrupters 2000

Saturday, December 16 - Monday, December 18, 2000

セッション 3
2000年12月17日(日)

Session 3
Sunday, December 17, 2000

試 験 法

Testing Methodology

内分泌攪乱化学物質の環境毒性学試験法と生態系リスク評価

トーマス H. ハッチンソン

アストラゼネカ社 ブリクスハム環境研究所

今回の講演では、内分泌攪乱化学物質に関する将来の環境試験国際ガイドラインの基盤となる優先すべき学術問題を扱い、特に、野外データに関する考察の必要性和、より大きな視野を持った生態系リスク評価の必要性について述べる。ある種の化学物質が哺乳類において内分泌攪乱現象を引き起こす場合のあることが明らかになってしばらく経つが、過去10年間で公表された論文では、野生生物における内分泌攪乱現象への注目が強まりつつある。その関心は、野生生物そのものに対してだけでなく、ヒトの健康問題の可能性を間接的に指し示すものとして寄せられている。

この種の討論においては水圏環境が重要であると言えるので、今回の講演では、野生の魚類個体群における内分泌攪乱現象についてと、その知見を将来のOECD魚類試験ガイドラインにどのように役立てるのが最も良いかについて手短かに概説する。米国環境保護庁とOECDからの案は、その両者とも見張り役の種として魚類を含めた水圏環境の最適なスクリーニング・試験戦略の確定を目指しているため、原則として支持されている。しかし、現在の知見と世界の専門家の意見によると、魚類については3段階からなるOECDの枠組み、すなわち、スクリーニング（第1段階）、部分的ライフサイクル試験（第2段階）、全ライフサイクル試験（第3段階）が、費用効果の高い内分泌攪乱化学物質の同定作業が可能であり、さまざまなリスク評価のシナリオに柔軟に対応して使用できるという点で、最良であると認識されている。このアプローチは、ニジマス稚魚スクリーニング試験（第1段階）、ファットヘッド・ミノール成魚繁殖試験（第2段階）、魚類全ライフサイクル試験（第3段階）を含むOECDの魚類試験ガイドライン候補におけるエストロゲンおよび抗エストロゲンの評価により例示されている。魚類の試験ガイドラインにおいては、アンドロゲン類や甲状腺作用物質を扱う必要のある点が、学術的に努力を要求する大きな問題として残されている。これは、内分泌攪乱化学物質のスクリーニングに実験動物を必要以上にかつ非倫理的に使用する可能性を避けるためにも、特に重要である。それでも、OECDが提唱しているエストロゲン類評価法が、その他のグループの内分泌攪乱化学物質に対しても有用なモデルとなっている。

ライフサイクル試験に水生無脊椎動物を用いることもかなり有望だが、同様の問題が付随する。すなわち、無脊椎動物による内分泌攪乱化学物質試験では、環境中と同じような曝露を行う必要があり、弱い活性の化学物質に感受性を有する必要がある。さらに、懸念される内分泌系メカニズムに特化したエンドポイントを含んでいる必要があり、発生や生殖への影響を防護するのに役立つデータが得られるものでなければならない。いずれにしても、水生動物における内分泌攪乱化学物質とその代謝産物への起こりうる曝露の特性を明らかにするさらなる努力を行い、どの試験法も合成化学物質および天然物質の生態系リスク評価の最良の基盤になるようにしなければならないことは、受け入れられるであろう。

内分泌攪乱化学物質の有害性評価に対するメダカ繁殖試験とフルライフサイクル試験の比較

横田 弘文

財団法人 化学物質評価研究機構

内分泌攪乱化学物質スクリーニングプログラムに対しての国際的な提案は、一連のスクリーニング法及び試験法を開発し、有効性を検証することが必要であることを主張している。この点について、内分泌攪乱化学物質に関するOECD魚類専門家会議は段階的な試験体系のもと、それぞれの段階 (tier) にくつかの*in vivo*試験を提案している。提案されている試験の中で、種の全生涯を通した試験 (フルライフサイクル試験) はtier 3における試験法として求められているが、これはこの試験が魚類の発生及び繁殖に関する内分泌攪乱化学物質の影響を評価するための確定的な有害性データを提供するためである。また、内分泌攪乱作用が疑われている多くの化学物質の有害性を迅速に同定し特徴付けるために、tier 2においてより短期の実践的な試験法 (成魚を用いた繁殖試験やパーシャルライフサイクル試験) の開発も必要であることが認識されている。提案される試験法は魚類に対する内分泌攪乱による影響を正確に検出するのに有効でなければならないため、高い感受性、選択性だけでなく生態毒学的に意義のある適切な影響指標を含める必要がある。我々はメダカを用いてフルライフサイクル試験及び繁殖試験法の開発を行っており、本シンポジウムではエストロゲン様物質の基準物質としてエチニルエストラジオール (EE₂) を用いて行った試験結果を紹介すると共に、両試験における各影響指標の感受性を比較する。

繁殖試験では、つがいのメダカ (濃度区当たり6ペア) をEE₂濃度32.6、63.9、116、261及び488 ng/L (平均測定濃度) の試験液に投入し、流水条件下で21日間暴露した。つがいのメダカの産卵数及び受精率はEE₂濃度の上昇と共に減少し、488 ng/L区における産卵数は対照区との間に統計学的な有意差が認められた。この繁殖に関する影響指標とは対照的に、暴露終了時におけるオス個体の肝臓におけるビテロジェニン産生は63.9 ng/L以上の濃度区で有意に引き起こされた。さらに、オス個体の生殖腺の両性状態 (精卵巣) もまた63.9 ng/L区以上で観察された。このことは暴露が性分化終了後に開始されたとしてもEE₂はオスメダカの生殖腺の発達に変化を及ぼし得ることを示している。概して、これらのデータは生理学的、組織学的な影響指標 (ビテロジェニン及び精卵巣の誘導) は繁殖能力に関するもの (産卵数及び受精率) より約8倍高感受性であることを示しており、メダカ繁殖試験におけるビテロジェニン測定と生殖腺組織学は環境エストロゲンに対して感受性、特異性のある影響指標であることが示唆された。しかしながら、本試験において高濃度にビテロジェニンが誘導し、かつ精巣中に精卵巣が出現していたオス個体が少なくとも21日間の暴露期間では必ずしも繁殖能力を損なわなかったことは、生態学的に関係する影響の有害性を評価する場合、どの影響指標を選択するかという点で極めて重要である。

フルライフサイクル試験は、受精後24時間以内の胚をEE₂濃度0.345、1.17、3.36、10.1及び30.6 ng/L (平均測定濃度) の試験液に投入し、流水条件下で100日間暴露した。その間、胚発生、ふ化、ふ化後の生存、成長、性分化及び繁殖を観察した。性分化及び繁殖を除いて、ふ化、ふ化後の生存及び成長に影響は観察されなかった。ふ化後60日令個体の二次性徴から判断した性比は30.6 ng/L区においてメスに偏

っていた。さらに、生殖腺の組織学的観察結果から、30.6 ng/L区では35%の個体が精卵巣を有していることが明らかとなった。30.6 ng/L区では完全に性比が偏っていたために、繁殖に関する影響は10.1 ng/L以下の濃度区についてふ化後71日目から100日目まで調査した。10.1 ng/L区における累積産卵数の平均は対照区のものと比較して有意に減少した。この濃度区での平均受精率も対照区の値の69%であったが、統計学的な有意差は認められなかった。このように、EE₂の暴露は性分化に対する影響濃度に比べてより低濃度で産卵数及び受精率の低下を引き起こした。繁殖検討が終了した時点で、オス個体の肝臓中ビテロジェニン濃度を調べたが、調査したすべての濃度区で誘導は観察されなかった。以上の結果、本試験はメダカの性分化及び繁殖に関するEE₂の最小作用濃度はそれぞれ30.6 ng/L及び10.1 ng/Lであることを明らかにした。従って、繁殖に関連した影響指標（産卵数及び受精率）はEE₂のメダカの全生涯に及ぼす毒性に対して最も高感受性であった。

メダカを用いた短期の繁殖試験は魚類の繁殖だけでなく、生殖腺の発達に関する化学物質のエストロゲン様作用による影響を確定する有用な試験法である。しかしながら、本試験法は環境エストロジェンのメダカに対する繁殖影響に対しては性分化時期も含めたより長期の暴露試験（フルライフサイクル試験）より低感受性であると考えられる。それゆえ、野生の魚類集団に対する環境エストロジェンの生態毒性学的影響を評価するためには、フルライフサイクル試験が必要不可欠で最終的なものと考えられる。

本研究は環境庁の助成を受けて実施した。

子宮肥大試験を中心としたエストロゲン様化学物質のスクリーニング

菅野 純

国立医薬品食品衛生研究所

1930年代にdiethylstilbestrolが合成されて以来、エストロゲン様合成化学物質が存在することが知られて久しい（ちなみに当時すでにbisphenol Aもエストロゲン様作用を有することが知られていた）。この様な物質群により内分泌かく乱現象が引き起こされる可能性はあるが、今までのところ、どのようなホルモン様作用が実際に我々にとって有害であるかがはっきりしていない。それにも関わらず、科学者の中にこの様な可能性に危惧を抱く者がいる大きな理由として次の2点があるように思われる。第一には、これらエストロゲン様化学物質は主にエストロゲン受容体を介して作用を現しており、この受容体はいろいろなリガンドを結合するリダグンダンシー（冗長性）を持っている点である。この「受容体を介した毒性」という概念は毒性学者にとっては比較的新しいものである。即ち、ここからたくさんの新しい側面、例えば、1) より低濃度域での作動、2) 今までと違った用量作用関係、3) 複雑なシグナルクロストークが見られ、4) 胎児・新生児・小児・思春期、成人、および老年の個体において細胞の増殖／分化／アポトーシスに直接あるいは間接的に影響を及ぼす、等の可能性が示唆される。第二に、通常の毒性試験、例えば多世代繁殖毒性試験では、強力なエストロジェンの、それも人に対して治療や避妊目的に用いられる濃度よりも高濃度においてすら陰性の結果を得る傾向があると云う点である。

試験管内 (*in vitro*) においては既に、少なからぬ数の化学物質がエストロゲン受容体への結合について検討されている。さらに、阻害物質 (antagonist) も受容体結合性を示すことから、応答試験が作動性物質 (agonist) との識別のために用いられる。おおよそ、植物性エストロジェンのゲニスタインなどは 17β -エストラジオールの 10^3 、ビスフェノールAは 10^4 の能力を持っていると計算される。

動物個体を用いた*in vivo*試験系が必要な理由としては、予期せぬシグナルクロストーク、代謝（活性化／非活性化）の影響、およびホルモン様作用と他の毒性作用の分別などを加味した有害性の確認が試験管内試験では不可能である点がまず挙げられる。無処置の実験動物を用いる通常の毒性試験法ではエストロゲン様作用に対する感度が概して悪いが、その理由は、個体の恒常性維持機構の一つである内分泌系などのフィードバック機構が働くためであると言えよう。

子宮肥大試験法は、エストロゲン受容体が発見されるよりもずっと以前に、エストロゲン作動性化学物質の検出の為にバイオアッセイとして開発されたものである。これは、エストロゲン感受性臓器を持ってはいるがフィードバック機構が存在しない個体を用いることで検出感度を高めたものであり、未成熟雌動物を用いる場合と、卵巣摘出を施した雌動物を用いる場合とがある。

内分泌かく乱化学物質のリスク評価の方策はまだ確立されていない。その理由はこの様な受容体を介した作用による有害性を同定する科学的背景が確立していないためである。同時に、内分泌かく乱化学物質の候補となりうる化学物質が五万種以上もあると云う指摘がある。そこで、有害性を発揮する内分泌かく乱化学物質の同定に必要な理論と方法を内分泌学や毒性学が確立する間に、将来的な検討を目的として化学物質に対して優先順位付けの作業を現存する手法で行うことは可能である。1) 電算機による受容体結合スクリーニング、2) 受容体結合試験、3) 応答試験などの試験管内試験、そして4) 動

物を用いた子宮肥大試験が、優先順位付けのための暫定的スクリーニング方法を構成する。更に言及すれば、子宮肥大試験の条件設定、例えば用量設定と投与経路選択、は電算機および試験管内試験の結果に基づいて行われることとなる。

いわゆる「低用量問題」が内分泌かく乱化学物質問題の鍵となるかも知れない。そして、スクリーニングとリスク評価手法もこれに直接的に巻き込まれるであろう。その際の手法の基礎となるのは作用機序に関する科学的知識である。そのような知識を得るために、どのような受容体が関与しどのような遺伝子の発現が変動するかが、胎児から老年の個体に至る各発達段階に対する有害影響を包括的に扱う手法の核となるトキシコゲノミクス (toxicogenomics) の一部として、系統的に検討されるようになるであろう。子宮肥大試験は現段階では最も感度の高く且つ安定した動物試験である。それでも、感度的に低用量問題に沿った試験法として生き残れるか否かは不明である。翻って、現時点ではトキシコゲノミクスにデータを送り込むモデル実験系としての役割が考えられるかもしれない。この意味においては、未熟雌動物を用いる系の方が、卵巣摘出系よりも多くの生物学的観測点を持っており、トキシコゲノミクスと組み合わせる事により、リスク評価の為の一つの試験法として生き残る可能性があるかも知れない。

内分泌活性化学物質の第2段階試験：現行の多世代試験の方法は適切か？

ポール マシュー デイビッド フォスター

化学工業毒性学研究所 (CIIT)

化学物質の持つ哺乳類の生殖に対する有害作用を調べるための現行のげっ歯類多世代試験は、きわめて複雑かつ多大な労力を要するものであるにも関わらず、発生に関して得られる情報は限られたものでしかない。この試験方法は、ホルモン様活性を持つ物質の検出感度を高めるために、数多くの改変が加えられてきた。そうした改変の多くは、出生後におこる性分化の指標などといった、ホルモン感受性のエンドポイントをさらに追加するものであった。内分泌活性化学物質 (EAC類) に対する第2段階試験は、第1段階のスクリーニングとアッセイで観察されたデータを再確認もしくは否認し、さらには、リスク評価に必要な用量反応関係の適切な情報を与えるなど、有害性を同定するための「確実な」情報を提供するものでなければならない。少なくともそうした試験は、ヒトにおいて懸念されている諸変化 (例えば、精子数減少、停留睾丸、尿道下裂などの男性生殖器奇形) に対応できるエンドポイント情報を提供するようものでなければならない。そのためには、曝露期間にげっ歯類における性分化の臨界期が含まれていることも重要であるが、それ以上に出生後の動物において内分泌系が関与する異常の発現を調べることが重要である。規定の試験の中でこうした基準を満たしているものは、現在のところ多世代生殖試験のみである。

現在、いくつかの偽陰性結果の例がある。これは特に抗アンドロゲン類 (リヌロン、ブチルベンジルフタル酸など) で見られる。これらの例では、従来の方法を用いた多世代試験 (および出生前/催奇形性試験) を正確に行っても内分泌活性は観察されないにも関わらず、同腹仔全個体を成熟時に検査する胎内曝露法 (*in utero* protocol) を行うと生殖器奇形 (およびその他の影響) が観察される。このような違いは、成熟時に少数の仔個体しか検査を行わなかった (典型的には、同腹仔あたり雌雄各1個体ずつ) ために、発生頻度の低い現象を見逃したからである。出生前試験において各同腹仔群のすべての個体について骨格と内臓の奇形に特化して調べるとより明確に現れる。残念ながらこの試験は、検査される動物が未熟なため肉眼的な変化を示すまでにいたらない、あるいは性分化全体を通して曝露されていない欠点がある。多世代試験は、偽陽性の結果 (前立腺重量増加など) を生じるかもしれない。特に、対照群におけるばらつきの程度が大きい指標において強く現れる。さらに同腹仔群あたり雌雄各1個体の動物しか検査しない場合には、結果に大きなバイアスがかかり、同腹仔全体の結果を反映しない場合がある。

EAC類の有害特性を明らかにするために必要な確実な情報を得るためには、多世代試験は、続発するすべての論理的な問題に併せて成熟時に検査する仔数を増やすという形で大幅に改良されるか、もしくは必要とされる情報が得られるような試験方法を新しく再構築しなければならない。