



International Symposium on Environmental Endocrine Disrupters 2000

Saturday, December 16 - Monday, December 18, 2000

セッション5
2000年12月18日(月)

Session 5
Monday, December 18, 2000

低用量問題

Low Dose Issue in the ED-Reaction

内分泌攪乱反応における低用量問題について

ロバート J. カブロック

米国 環境保護庁 (EPA)

健康への内分泌攪乱化学物質の影響の懸念の根拠となる研究には、汚染されたさまざまな生態系の野外調査、内分泌系関連疾患の状況と傾向の調査、実験動物種を用いた特定の内分泌攪乱化学物質の実験研究の3つの大きな分野がある。どの分野もそれぞれ強みと弱みがあり、定量的リスク評価に関してはいずれも大きな不確実性が残る。1つ目と2つ目の分野においては、曝露量評価に関して根本的な限界があるのが通常であり、そのために、ヒト集団内の特定の場所や時期にある疾患の発生が観察されても、感受性臨界期における環境内の特定の物質とその影響との因果関係を確定することが困難である。3つめの分野、すなわち統制下にある室内実験の場合には、特定の物質を特定の時期に適用し、曝露後に特定の転帰を観察するという特性を有している実験という方法そのものが、この限界をすでに克服している。しかしその代わりに室内実験に残る最大の不確実性の1つが、毒性試験で通常用いられる用量以下の用量におけるヒト集団のリスクの大きさの解明という点である。標準化された試験には感受性のもっとも高いエンドポイントを組み込むのか、相乗的・相加的反応を発揮する混合物を扱うのか、用量が環境内で遭遇するレベルに近づくにつれて用量反応関係が線形になるのか非線形になるのか、などの疑問が残されている。このセッションでは、低用量での作用の問題に関して最近行われた専門家による再検討ワークショップの結果を概観し、特定のEDCの数種が生殖器官の発達と機能に及ぼす影響を中心に、その実例をいくつか詳細に見ていくことにする。最後の講演では、内分泌攪乱の問題全体に対して、そうした所見と議論が与える影響について示す。

NTP/NIEHSの内分泌攪乱化学物質低用量作用に関する専門家再検討の概要

ロナルド L. メルニック

米国 国立環境保健科学研究所 (NIEHS)

国立環境保健科学研究所 (NIEHS) の生殖・発生毒性試験ガイドラインが内分泌攪乱化学物質に対しても適切かどうかを確定するために、米国環境保護庁 (EPA) は国立環境保健科学研究所の連邦毒性試験計画 (National Toxicology Program: NTP) に対して、内分泌攪乱化学物質で報告されている低用量での作用と用量反応関係を専門家が評価する公開検討会を組織・開催することを要請した。この会合における「低用量作用」とは、ヒト曝露量の範囲もしくは、EPAの標準的な生殖・発生毒性試験法の規範の中で一般的に用いられる用量よりも低い用量で引き起こされる生物学的変化のことである。検討委員会は、50を超える試験それぞれのデータが、実験動物における内分泌攪乱化学物質の低用量作用の存在を支持するものか否定するものかを検討した。こうした重要な環境健康問題に関して客観的な科学的観点を得るために、この検討においてはユニークな方法が選択された。検討委員会が独自に統計的再分析を行えるように、この分野で活動している研究グループの中心となる研究者が組織委員会からの求めに応じて、所定のパラメータに関する生データを自発的に提出したのである。また、これらのグループを代表する研究者達には、自分たちの所見について発表する公式の機会と、検討委員会と非公式に討論する機会が与えられた。こうした再検討による予備的な結論は以下の通りである：

- 低用量作用は、一部のエストロゲン様物質では明らかに現れていた。それ以外の試験では、低用量作用は明白ではなかった。ほとんどの場合は、陽性および陰性の所見はともに、それぞれの実験デザインの中では堅実で信頼に足るものであると見なされた。試験施設間で試験デザインに差異が認められ、それが実験結果における不一致の原因になっている可能性があった。実際に観察された低用量反応に関しては、それらの作用が及んだ場合の健康上の結果に対する全体像や長期像は不明確であった (例えば、それらの作用が、遅延して発現する疾患のリスク因子であるか否か、など)。
- アンドロゲン様化学物質の低用量作用は試験されていなかった。抗アンドロゲン様化学物質については、一部のエンドポイントの用量反応曲線が、試験された最低用量に対して線形であるようだった。しかし、検討対象となった試験は、今回の再検討において定義される低用量作用を評価するにはデザインされていなかった。
- 低用量作用の不明確さを払拭して特性をより詳しく明らかにするためには、薬理学的および遺伝学的な手法を採用して作用メカニズムを確定して用量反応関係の特性を明らかにすること、胎内期から成体期に至るまでの長期にわたる反応の特性を明らかにすること、長期間の健康転帰を評価すること、内因性のホルモンレベルの変動への影響を確定することを、検討委員会は勧告した。
- 実験結果に影響を与える可能性のある試験デザインと生物学的要因については特別に考慮する必要がある。試験では、内分泌ホルモン様物質への感受性が高い動物モデルを、特に陽性コントロールとして選択すべきである。
- 内分泌攪乱化学物質の用量反応曲線の形状は、単調や線形でなかったり (例えば、逆U字形など)、閾値を示さない可能性がある。用量反応曲線は、評価されるエンドポイントの種類、試験される化学物質の種類、投与方法、標的組織の生物学的特性などの多数の因子によって影響を受ける。

CD® (Sprague-Dawley) ラットにおけるビスフェノールA (BPA) の混餌投与による 3世代生殖毒性試験

ロシェル W. テイル¹、C. B. マイヤーズ¹、M. C. マール¹、T. Y. チャン¹、J. C. シーリ²、
D. R. プライン¹、M. M. ヴェセリカ¹、P. A. フェイル¹、R. L. ジョイナー³、J. H. プタラ⁴、
S. S. ダイモン³、R. N. シオツカ⁵、G. シュトロップ⁶、G. E. フェーンストラ⁷、
J. M. ベヒター⁸、L. R. ハリス⁹

¹米国 リサーチトライアングルインスティテュート、²米国 実験病理学研究所、

³米国 GEプラスチック、⁴米国 アリステック化学社、⁵米国 バイエル社、⁶ドイツ バイエル社、

⁷英国 シェルケミカル社、⁸米国 ダウケミカル社、⁹米国 プラスチック産業協会

BPAは、ポリカーボネートプラスチックやエポキシ樹脂の製造で主にモノマーとして用いられる量産化学薬品である。BPAは、強制経口および非経口で高用量を投与すると「エストロゲン様」作用を発現し、初期の研究（検証試験は行われていない）では低用量でも活性を示すことが報告されている。従って、BPA（純度99.5%以上）を多世代生殖毒性試験（米国EPA OPPTS 1998年テストガイドラインおよび医薬品の安全性試験の実施に関する基準に準拠）を行って評価した。3世代にわたり、各投与量および性別毎に30匹を割り当て、0、0.015、0.3、4.5、75、750、および7500 ppmの混餌濃度で自由に摂取させ、各世代に1回出産させ、F3世代の出生仔まで調査した。交配前（雌雄双方）、妊娠中、および授乳中の体重減少と体重増加、離乳時および成熟時の臓器重量の絶対的減少と相対的増加、尿細管の変性の発現増加として現れる成体の全身毒性は、750 ppm（ほぼ50 mg/kg/日に相当）および7500 ppm（500 mg/kg/日）ではすべての世代の成体ラットに見られ、慢性的な肝臓の炎症は、7500 ppmの投与量のF0、F1、およびF2雌に見られた（しかしF3には見られなかった）。生殖臓器の組織病理と機能は、どの世代の雌雄も影響を受けなかった。両側卵巢重量および出生後0日の総出生仔数と生産仔数は、7500 ppmでは減少し（ただし胎仔期における着床後の流産の増加は見られない）、すべての世代で実質的な母体毒性が見られた。親または出世仔の死亡率、毒性の臨床徴候、交配指数、生殖能指数、在胎期指数、卵巢内原始卵胞数、発情周期、性交前時間、在胎期間、生産仔の雌雄比と生存率、離乳前のF1、F2、またはF3雄の乳頭/乳輪の保持、F0、F1、F2、F3雄成体の精巣上体精子数、自動運動性、または形態、F0、F1、F2、およびF3雄成体精巣のホモジェナイゼーション抗性の精子細胞頭数、1日あたりの精子生産量（DSP）、またはDSP効率には、投与関連の影響は見られなかった。7500 ppmでは、F1、F2、F3の雌雄出生仔の思春期（膣の開通性と包皮の分離）の遅延が体重減少とともに見られ、体重減少は授乳中（出生後7日）に始まり、成熟後も継続した。出生後0日の肛門性器間距離は、F2とF3の雄およびF3のメスでは影響が見られず、0.015、0.3、4.5、および750 ppmではF2の雌で（0.03~0.05 mm）延長し、出生後0日の出生仔の体重への影響は伴っておらず、用量反応のパターンはなく、成長や生殖に後遺症は見られなかった。本試験のラットにおける0.015、0.3、4.5、または75 ppm（0.001、0.02、0.3、5 mg/kg/日に相当）の混餌によるBPA曝露では、成体または出生仔のパラメーターに一貫したまたは持続的な投与関連の影響は見られなかった。

結論：

- ・ 雌雄双方の成体の全身毒性に関するNOAELは75 ppm（ほぼ5 mg/kg/日に相当）であった。
- ・ 生殖毒性および出生後の毒性に関するNOAELは750 ppm（ほぼ50 mg/kg/日に相当）であった。
- ・ 投与関連の低用量反応はなかった。
- ・ 非単調用量反応を示す証拠はなかった。
- ・ 本試験で投与関連の低用量反応が見られなかったが、これは北海道の化合物安全研究所が最近完了したラットにおける2世代生殖試験の結果と一致している。同試験では各群および性別毎にCD[®]ラット25匹を割り当て、BPAの0、0.2、2、20、または200 μ g/kg/日を強制経口投与したところ、何れの投与量のパラメーターにも投与関連の影響は見られなかった。

本研究は、ワシントンDCのプラスチック産業協会の支援を受けた。

思春期前のラットにおける生殖機能の発達に対するノニルフェノールの *in vivo*での影響：用量反応に関する考察

ピン C. リー

ウイスコンシン医科大学

環境中で検出されるノニルフェノール類 (NP類) はエストロゲン様の特性を有する。我々は、思春期前のラットに対するNP類の*in vivo*での影響を調査した。未成熟な雌ラットへNP類を単回腹腔内投与したところ、子宮の成長の促進と、エストラジオール (E) と同様であるが弱い (1/1000~1/2000) 子宮ペルオキシダーゼ活性が誘導された。閾値量は1匹あたり最大1 mgである。動物あたり0.5 mgの投与量で子宮内ER (エストロゲン受容体) -mRNAの増加がRT-PCR法により検出された。動物あたり2 mgまで、ERmRNAの用量依存的増加が見られた。動物あたり4 mgの投与量では、ERmRNAの発現低下が見られ、ゲルシフト分析により、NP類、Eを投与したラットの子宮内核タンパク質はER-ERE (エストロゲン応答配列) 複合体が増加したことが示された。このことにより、NP類がEと類似した作用を示すことが示唆された。また、NP類を1~15日齢に腹腔内投与した雄の出生仔は、31日齢で測定した精巣重量および付属生殖器のサイズが低下していた。閾値量は0.8 mg/Kgから8 mg/Kgである。長期観察では、新生仔期にNP類に曝露した雄の受精能が減少したことが示された。

ヒト曝露レベルのビスフェノールAにおけるマウス発生の変異

フレデリック S. ヴォンサール

ミズーリ大学 コロンビア校

一般的な印象とは逆に、ビスフェノールAモノマーから製造されるプラスチック製品は不安定であり、洗浄・再利用を繰り返すたびに遊離するビスフェノールAの量が増えていくことが、最近の研究によって明らかになっている。ビスフェノールAは、ポリカーボネート製プラスチック、歯科用シーラント（密閉剤）、食品や飲料の缶の内面塗装樹脂など、数多く商業利用されているために、ヒトのビスフェノールA曝露が発生し得る。興味深いのは、ビスフェノールAは1930年代にDoddsによってエストロゲン様薬物として合成された点である。Doddsは続いてもうひとつのエストロゲン様薬物であるジエチルstilbestrol（DES）を合成した。高分子化学においてビスフェノールAが、プラスチックや樹脂を製造するのに用いられたのは、その数十年後のことであった。

脳や生殖器官などのエストロゲン反応性組織の発生途上におけるビスフェノールA曝露が、公衆衛生上の大きな問題になっている。胎児発生期間中には、エストロゲンによって遺伝子にいわば「刷り込み」が起こる。すなわち、発生中の「臨界期」のエストロゲン量によって組織の遺伝子の活性が決定されるのである。

今回の講演では、マウスの実験において、ヒト曝露レベルの範囲内である極低用量のビスフェノールAに母体を介して曝露した胎児の結果を中心に話をし、マウス胎児におけるビスフェノールA曝露の有害作用に対するリスク評価の意義についても考察する。

ビスフェノールAは、胎児に対しては強力なエストロゲン物質であることを我々は明らかにしたが、一般には「弱い」エストロゲン物質であると誤って記述されている。ビスフェノールAが胎児において強力であることにはいくつか理由がある。1) ビスフェノールAは、妊娠マウスにおいては蓄積するが、未妊娠雌成体においては蓄積が起こらない。妊娠雌個体においてこの生体蓄積があるために、胎児が曝露するビスフェノールA濃度は、未妊娠雌個体におけるビスフェノールA代謝試験に基づく予測値よりも、ずっと高くなる。2) 本来のエストロゲン類への曝露から胎児を保護している血中エストロゲン結合タンパク質が、ビスフェノールAの胎児組織への侵入は防げない。このために、エストロゲン受容体に結合してエストロゲン様反応を刺激するビスフェノールAの濃度は、このことを考慮に入れていない*in vitro*スクリーニングアッセイに基づく予測値よりも、ずっと高くなる。3) 胎児は成体に比べて、ビスフェノールAなどのエストロゲン様化学物質による障害を受けやすい。成体の器官は、DESなどの強力なエストロゲン様薬物が極高用量あっても、障害を受けない。それに対して胎児は、ビスフェノールAなどのエストロゲン様化学物質の極低用量に曝露するだけで、生殖器官の構造や機能に恒久的な変異が引き起こされる。

演者の研究室において行ったマウスを用いた研究は、別の研究者によっても独自に確認されているが、用いたビスフェノールA用量はヒト胎児の曝露レベル範囲のものであった。我々が用いたビスフェノールA用量は、過去に報告されたビスフェノールA最小毒性量（LOAEL）の25,000分の1であった。調べた用量のうち、有害作用を引き起こす最小の用量を、最小毒性量と呼ぶ。胎児期に、過去に報告された

LOAELの25,000分の1の用量のビスフェノールAに曝露すると、雌マウスの生後の成長速度が増大し、性成熟の速度が亢進する。

マウスおよびラットの胎仔は、環境内のビスフェノールA用量に相当する低用量に曝露した場合でも、生殖器官の構造と機能に変異する。例えば、ビスフェノールAが、前立腺の個数と大きさを恒久的に増加させ、前立腺機能を調節する前立腺アンドロゲン受容体の個数も増加させることが、演者の研究室だけでなく他の研究室においても示されている。アンドロゲン受容体が増加すると、生涯にわたり前立腺がテストステロンに対して過敏になり、高齢時に前立腺疾患になる傾向が高まると考えられるが、こうした影響が少なくとも中年期までは持続することを示す結果を我々は得ている。また、尿道の構造にも大きな変化が現れる。このことが、高齢時における排尿障害に関連している可能性がある。さらには、ビスフェノールAによって精巣における精子産生が低下する。

従来の毒性試験法では、上述のような有害作用を引き起こすビスフェノールAの用量では、何の作用も起きないとの誤った仮説が導かれていた。今日依然として用いられているリスク評価方法は典型的には、試験物質を致死量に近い3段階の極大用量を用い、比較的狭い用量範囲での作用を調べるものである。1980年代に実施された毒性試験において有害作用を起こすビスフェノールAの最小用量が調べられ、米国の国内毒性学プログラムによってLOAELが公表された。しかし、その際に採られた（そして現在も採られている）仮定というのは、調べた最小毒性量（LOAEL）を安全係数の1000で割った用量は「安全」と宣言しても良い、というものであった。ここで重要なのは、このように算出された「安全」量は、その値が本当に「安全」なのかどうかを我々が調べてみるまで、ただの一度も直接的に検証されたことがない、という事実である。算出されたビスフェノールAの「安全」量の作用を実際に調べてみると、この用量であっても有害作用を起こすことが、今では確かめられている。

ヒトのビスフェノールAの「安全」な最大許容1日摂取量に関して、現行のリスク評価法では誤った数値が算出されることを示した報告が、今では、米国、日本、ドイツから12本以上出されている。現在の研究結果から導かれる「安全」量は、現在ヒトが曝露しているビスフェノールA量よりもずっと低いものになるはずである。そして、その他の内分泌攪乱化学物質についても同じように、現行の「安全」な最大許容1日摂取量よりも低い用量で有害作用が引き起こされることが明らかになるものと思われる。高用量の内分泌攪乱化学物質の試験に基づいて算出された現行の「安全」量は、それが本当に「安全」であるかどうかを直接的に検証する必要があることを、私は主張する。さらに、内分泌攪乱化学物質に関するこれからの試験法には、ヒト曝露量の範囲の用量を含める必要がある。

ビスフェノールAのラットにおける2世代繁殖試験

江馬 眞¹、菅野 純²

¹国立医薬品食品衛生研究所大阪支所、²国立医薬品食品衛生研究所

低投与量のビスフェノールA (BPA) の生殖及び発生に対する影響を調べるために、ラットの2世代繁殖試験を行い、性成熟、身体及び機能の発達、性周期、肛門生殖突起間距離 (AGD)、精子数及び運動性等についても検討した。1群25匹の雌雄のCrj:CD (SD) IGSラットに0.2, 2, 20または200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ のBPAを強制経口投与した。投与は、雄F0の交配前10週、雌F0の交配前2週から開始し、交配中、妊娠中及び授乳中を通じて2世代にわたって行った。成熟F0, F1及びF2、離乳児F1及びF2の剖検を行った。実験終了時のF2は雄で7週齢、雌で14週齢であった。一般状態、体重及び摂餌量にはBPA投与の影響は観察されなかった。F1及びF2の児における正向反射、背地走性、空中正向反射、耳介開展、切歯萌出、眼瞼開裂、精巣下降、包皮分離及び陰開口、F1におけるオープンフィールド及びT型水迷路での行動にBPA投与による影響はみられなかった。性周期、交尾率、受胎率、着床数、妊娠期間、産児数、児の性比、児生存率その他の繁殖に関する指標にはいずれの世代にもBPA投与の影響は認められなかった。0.2、20及び200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の雄F1、20及び200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の雌F1及び雌雄のF2にAGDの有意の短縮、2及び20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の雌F1にAGDの有意の延長が観察された。しかしながら、AGDにおけるこれらの変化は、対照群の値の5%以内のわずかな変化であり、AGD及びAGDの補正值 (AGD/cube root of body weight) には持続的な変化は認められなかった。精巣上体の精子数及び精子運動性にBPAの投与による変化はみられなかった。剖検所見、組織重量及び病理組織学的所見にもBPA投与によると考えられる変化は認められなかった。これらの成績から、2世代にわたって経口投与した0.2から200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ のBPAは、ラットの生殖及び発生に対して投与に関連した有意の変化を惹起しないと考えられた。