

内分泌攪乱作用 - 複合影響問題

アンドレアス コルテンカンブ

英国 ロンドン大学

環境中や生物の組織中で発見される一部の内分泌攪乱化学物質は通常非常に低い濃度です。実験分析で影響を観察するには、はるかに高い濃度を投与する必要があります。この1つの因子がヒトと野生生物への内分泌攪乱と潜在的な健康リスクに関する議論を極めて複雑にしています。4種の一般的な殺虫剤の例は、この問題を際立たせるのに役立つと思います。様々な国のヒト血清中に発見される p,p'-DDE、 β -HCH、p,p'-DDT、および o,p'-DDT の濃度の範囲は、例えば、E スクリーンアッセイにおけるこれら化学物質の無作用量より数桁低い濃度です。環境中濃度と実験分析の作用量との間に見られるこの極めて大きな相違により、多くの研究者は、ヒトや野生生物における潜在的影響を説明するためにはこれら複数の化学物質の間の相乗作用を取り上げる必要があると考えるようになりました。

それに代わる立場は、天然のホルモンであるエストロジオールと比較すればエストロゲン様内分泌攪乱化学物質の効力は低いので、それら化学物質の有害作用が生じる可能性は極めて低いとする立場です。従って、内因性ホルモンの効力は強力であると想定しているため、内分泌攪乱化学物質が何らかの差を生じさせるには非常に高用量が必要となります。この考え方は、内分泌攪乱化学物質が潜在的に健康に有害作用を及ぼすという主張を却下するためにしばしば使用されます。

これは、ロンドンでの我々のグループがこれらの2つの問題に答えるために設計した実験のデータと詳細です。しかし、これについて進める前に、複合影響とそれらの評価方法に関連するいくつかの問題について簡単に述べておきたいと思います。

複合影響は、一般に、混合物に含まれる個々の構成成分の効力に関する知識を基に、発生すると予測される影響に応じて分類されます。混合物について観察した影響が予測した影響よりも大きい場合は、混合物全体の影響は相乗作用があると言うことができます。予測よりも小さければ、混合物全体の影響は拮抗的作用と言えます。また、予想通りであれば、その混合物は相加的に作用すると考えられます。混合物の分野における議論を長い間にわたり複雑にしていた問題の1つは、合理的かつ事実に基づいた相加性予測とはどのように定義できるのか、また、さらに重要な点は、それをどのように量的に計算できるのかという問題です。

相加性の計算には、影響の総和 (effect summation)、個別作用 (independent action)、濃度追加 (concentration addition) の3つの方法があります。これらの考え方は各々、特別な目的および実験条件に適合するように個別に開発されました。例えば、個別作用の考え方は抗癌剤の併用投与を評価するために頻繁に使用されますし、濃度追加は環境汚染物質の混合物に採用されています。これから、それぞれの考え方を順に概説し、その基礎となる薬理学的仮説を列挙します。

影響の総和では、混合物の個々の成分の影響が単純に合計されます。それは直感的に分かる使いやすいつい方法ですが、この考え方は線形の用量反応にのみ適用できる点がたびたび見落とされます。用量反応曲線がお馴染みの S 字型となるような場合は、影響の総和は信頼性に欠けます。この点については、あとで説明します。

個別作用は、名称が示す通り、混合物のすべての成分が、他とは無関係に作用すると想定しています。この考え方は、一般に、多様な作用機序または異なる作用点を持つ複数の化学物質で構成される混合物に適用されます。

濃度追加は、これらとは異なるシナリオを想定したものです。濃度追加は、混合物のすべての成分が、本質的に類似した方法で、同じ生物学的ターゲットと相互作用することを想定しています。この考え方で相加作用または無相互作用時の予測値を計算するためには、事前に明らかになっている同一の影響を生じさせる用量が合計されます。そのため、濃度相加作用または用量相加作用と称されます。

エストロゲン様内分泌攪乱化学物質の混合物に関する我々の研究の出発点は、個々の効力に関する情報をもとに複数成分の混合物の影響を正確に予測できるかどうかという疑問でした。個別作用と濃度追加の

一般的な適用範囲については激しく議論されていたため、我々は両方の考え方の能力を比較しました。評価が高く広範囲に利用されていることから、我々は影響の総和も加えました。

我々は、エストロゲン様化学物質の混合作用の予測可能性を調べるため、イーストエストロゲンスクリーン（イースト菌を用いたエストロゲンのスクリーニング法）をモデルとして選択しました。想像したとおり、複数成分の混合物を用いた研究では、再現性とばらつきの低さが求められるので、選択する分析法に高い要求が課せられました。イーストエストロゲンスクリーンは、これらの要求を満たすもので、信頼性が高く、再現性があります。

次の図1は我々が選んだ混合物成分に関する回帰モデルを示しています。ヒドロキシル化ポリ塩化ビフェニール、ビスフェノール A、ゲニステイン、ベンゾフェノン、レゾルシノールなどの広範囲のエストロゲン様化学物質が含まれています。左端に基準値としてエストラジオールの曲線を示しています。

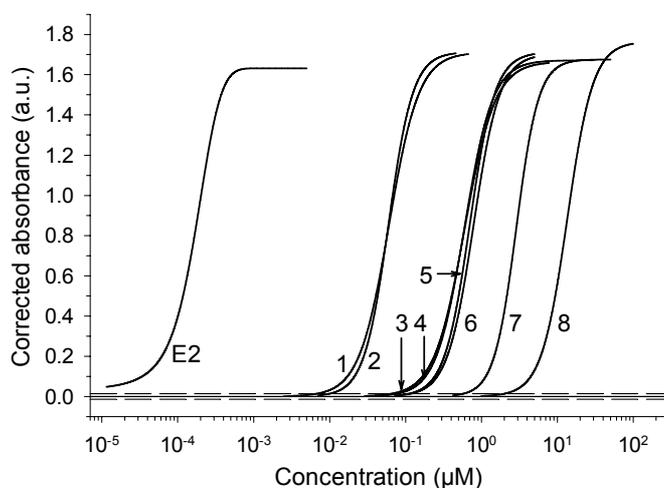


図 1: イーストエストロゲンスクリーンにおけるエストロゲン様化学物質 1~8 の回帰モデル。E2: 17 β エストラジオール。2002 年、Silva らのデータ。

図1に示した濃度反応データは、8種の化学物質をその効力按比例した混合比で混ぜた混合物に予測される影響を計算するために使用しました。我々は、影響の総和、個別作用、および濃度追加を使用して、この混合物の全体の用量反応曲線を計算しました（図2）。個別作用と影響の総和の曲線は、低用量の範囲では非常に類似していました。一方、濃度追加（赤い曲線）は、さらに低濃度における影響を予測しました。次に我々はこれらの予測値を実験的に検証しました。観察された混合物の影響（○印）は濃度追加と顕著な一致を示し、この一致は影響の範囲の全体にわたりに見られました。

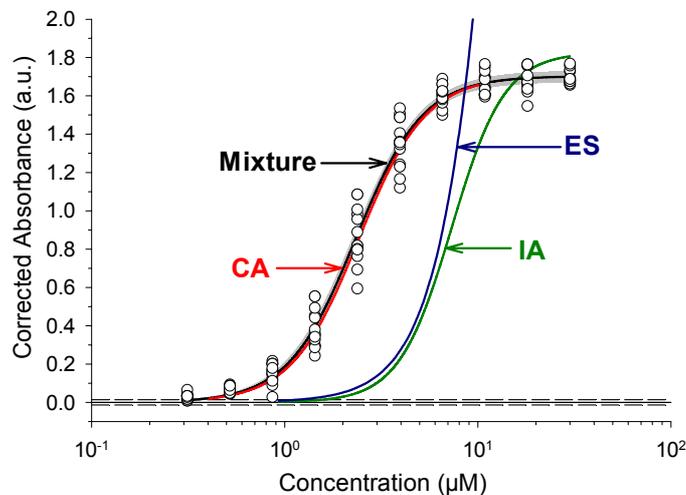


図 2 : 8 種のエストロゲン様化学物質の混合物の複合影響の予測と観察結果。図 1 に示される単一物質のデータに基づいて、個々の成分の効力に比例した混合比について予測を行った。CA:濃度追加による予測(赤)、IA:個別作用による予測(緑)、ES:影響の総和による予測(青)。2002年、Silva らのデータ。

これらの実験から得られたメッセージは、正しい予測モデルまたは評価モデルを使用した場合、個々の影響に関するデータをもとにして非常に複雑な混合物の影響を正確に予測できるということでした。影響の総和または個別作用を我々の予測モデルとして用いていたならば、我々は誤ってこれら 8 種の化学物質の混合作用が相乗的と結論していたでしょう。これは、観察した混合物の応答がこれらの曲線で予測される影響より高かったためです。混合物に含まれるすべての化学物質はエストロゲン受容体を活性化することにより類似した作用をしていたため、我々は、このケースでは混合物の影響は明らかに相加的で、濃度追加が適切なモデルであると結論づけました。

容易に理解できることですが、相乗的な複合影響を正しく証明できれば非常に劇的なことであり、このことについては、過去に内分泌攪乱化学物質の分野で多くの議論が交わされています。相乗作用は確実に懸念を高めることになるでしょう。しかし、個別に考えれば、相乗作用があるかどうかということの問題にするのは誤解を招くのではないかと思います。同様に重要であるのは、混合物のそれぞれの成分が影響を発現する閾値よりも低い濃度であったとしても、全体として複合した影響があるのではないかと問題だと思います。

ここでは個別作用と濃度追加の 2 つの考え方は、非常に異なった結果を予測しています。個別作用によれば、個々の成分のすべてが単独では全く作用しない場合は、全体的な混合作用はないものとなります。

逆に、濃度追加では、化学物質の数が十分に大きければ、すべての成分が限界濃度を下回っている場合でも、何らかの全体的な影響があると予測するでしょう。環境中の媒体に実際に存在する混合物についてこれら 2 つのシナリオが意味することは、恐らくは明白すぎるでしょう。

非常に低用量での複合影響の問題を扱う際に重要な点は、ゼロイフェクト（無影響）とは何かということです。個別の作用について数学的な式を考えるとすれば、100 種の化学物質の混合作用が実際にゼロとなるのは、すべての成分の個々の影響もゼロであるときのみであることは明白です。

実際、個々の影響がごくわずかに高くなれば、全体的影響は劇的になり得ます。つまり、100 種の物質のそれぞれが理論的な最大作用のわずか 1%を生じても、63%の複合影響になります。100 種の物質の各々が、ある作用の 0.1%を誘発させるだけであったとしても、全体的影響は依然として 9.5%もあり、0 とは程

遠い値です。

基本的に困難な面も生じます。なぜなら、統計学的有意性は非常に小さいが実際に存在する影響をバックグラウンドノイズと区別することは不可能であるため、ゼロイフェクトレベルを高い信頼性で測定することはできません。これらの理由のため、毒物学では、「観察される影響がまったくない用量 (NOEL、無作用量)」や「観察される影響がまったくない濃度 (NOEC、無影響濃度)」といった考え方を導入しています。NOELとNOECは、ゼロイフェクトレベルの近似値となるようになっていきます。NOELとNOECは、対照群で観察される影響と比べ統計学的有意差のある影響を生じない最大の試験用量または濃度と定義されます。混合物の試験では、NOELやNOECはどの程度の信頼性があるのでしょうか。

我々は、Eスクリーンアッセイで α,p' -DDT について推定した NOEC を我々のデータに合わせた回帰モデルを使用して NOEC について予測した影響と比較しました。回帰モデルは無影響濃度について 0.3% の影響を推定しました。この値は、 α,p' -DDT が 3.2% の最大増殖抑制作用を誘発するとすれば、9% であり、ゼロよりはるかに大きい値です。

ここに見られる問題は生態毒性に関する文献でも認識されています。現在では、NOEC はより高い値となることが分かっています。すなわち、試験した濃度の値が小さければ小さいほど、試験系の生物学的ばらつきが大きくなり、全体的なデータの品質は劣ります。

ゼロイフェクトレベルの有効な近似値とは程遠いため、「NOEC は、影響の発生が確認できないが確信をもって除外することもできない境界値を定義するもので、その境界値はゼロイフェクトレベルとはかなり異なる」と結論しなければなりません。NOEC の用途は混合物のそれぞれの成分が低用量である場合にその混合物が複合影響を及ぼすか否かという問題を扱う混合物実験を設計する場合に限定されると結論しなければなりません。

回帰モデルをベースにして推定した影響データ、いわゆるベンチマーク濃度が、NOEC に代わるものとして利用されるケースが増加しています。EC1 濃度、すなわち可能性が考えられる最大の影響の 1% を生じさせる濃度は、NOEC に代わる優れた基準と考えられています。私は EC1 が直接測定できないことを強調しておきたいと思います。多くの分析法では、最大応答の 10% の影響を測定することもできません。

さらに、我々は極微量の実験の設計は避ける必要がありました。我々のケースでは、混合作用が低すぎて測定できないような極めて低用量で数少ない化学物質を混合していたならば、これが起きていたでしょう。では、それぞれの化学物質の EC1 程度の濃度またはその濃度以下で混合作用を観察できるようにするには、何種類の化学物質を混合しなければならないでしょうか。

その答えは、混合物に含まれる個々の化学物質の用量反応曲線の勾配の険しさに少なからず依存します。ドイツの数学者、Boedeker と Drescher、はこの問題に対する答えを提唱しています。この二人は、勾配が緩ければ緩いほど多くの化学物質を混合しなければ複合影響を観察できないことを発見しました。イーストエストロゲンスクリーンにおいて複数のエストロゲン様化学物質の勾配が 1 と 2 の間である場合に、我々は 8 種の化学物質で構成される混合物を選択しました。

我々は次の方法で作業を進めました。8 種の化学物質の濃度応答の相関関係 (図 1 参照) を使用して、EC1 を推定しました。我々はこれを 2 で割った濃度、すなわち EC1 の 50% ですべての化学物質を混合しました。複合影響は観察可能でしょうか。

我々の実験結果 (図 3) は、この問いへの答えが確実にイエスであることを証明しています。この棒グラフの左側に描かれているのは、我々の混合物に含まれる 8 種の化学物質の各々について推定された応答です。それらは低すぎて測定できません。

ES と表記されている網掛け付きの棒は、我々がそれぞれの応答を単純に合計した場合に予測される応答を示しています。CA と表記されている斜線付きの棒は、濃度追加による予測です。黒色の棒 (MIX) は実験で観察された影響を示しており、濃度追加による予測とかなり一致しています。

影響の総和は観察された影響を非常に過小評価していることが注目すべき重要な点です。この場合も、影響の総和の考え方をういていたならば、複合影響は相乗的であると誤って結論してしまったでしょう。

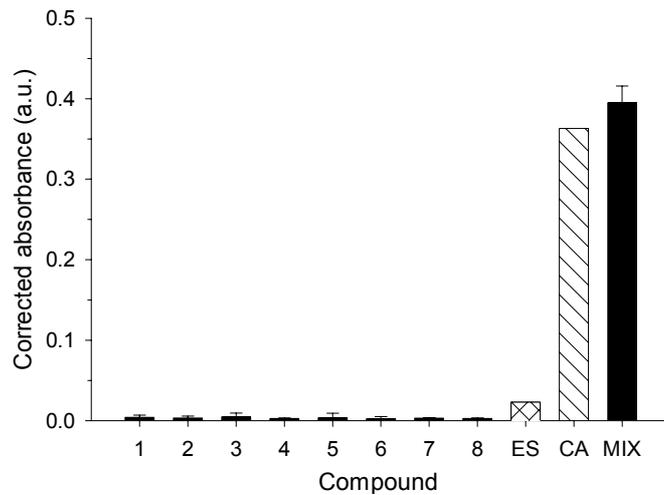


図 3 : 個々の混合物成分の低濃度における複合影響。2002年、Silva らのデータ。

この実験は恐らく監督機関にとっての悪夢を表したものです。この実験は、単一の化学物質のみに焦点を置いて複合影響をほとんど無視している現行のリスクアセスメント手法の落とし穴を示しています。我々は、単独では許容できる用量であっても複数の化学物質が組み合わせると、著しい複合影響が生じる可能性が非常に高いことを明らかにしています。

2つ目のポイントに目を向けてみましょう。弱いエストロゲン様を示す化学物質が強力なステロイドホルモンの作用を変調させることがあるのでしょうか。前に述べたとおり、この考え方はゼノエストロゲンへの曝露に起因する潜在的な問題を却下するためにしばしば使用されます。

ここでも、イーストエストロゲンスクリーンを選択してこの問題に取り組みました。我々は、混合物に含まれる化学物質の数を8から12に増やし、エストラジオールを含めました。

次に、11種の弱いエストロゲン様化学物質を個々の効力に応じた比率で混合し、単一の化学物質が全体的影響を独占しないようにしました。次に、このゼノエストロゲンのプール50,000に対しエストラジオール1の比率で両者を混合しました。我々は、濃度追加を使用して計算し、相加効果を想定した濃度応答曲線を推定しました。さらに、影響の総和も含めました。結果はこの混合物の複合作用が相加的であることを示しており、濃度追加を用いた予測と一致していました。

弱いゼノエストロゲン類がホルモンの作用に及ぼす影響を明らかにするため、我々は全混合物の5マイクロモルの濃度で混合物の各成分の影響と複合影響を表すことにしました。この濃度は、イーストエストロゲンスクリーンにおける最大作用の2分の1を生じさせました。図4の棒グラフは、左側に黒色の棒で示されているエストラジオールだけの濃度が約0.4の影響を与えたことを示しています。

この混合物の他の化学物質の濃度は低すぎて直接測定することはできませんが、エストラジオールと合わせると、エストラジオール単独でのホルモンへの影響をほぼ倍増させ(MIXと表記されている灰色の棒)、CAと表記されている斜線付きの棒で示された濃度追加による予測とほぼ一致しています。白い棒は影響の総和を示しています。

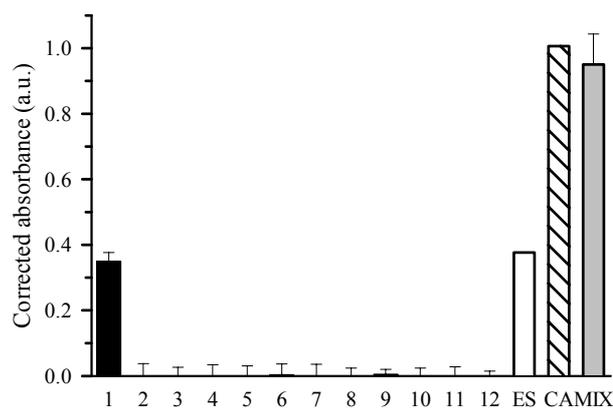


図 4: エストラジオールの作用に対する弱いゼノエストロゲン類の影響。2002 年、Rajapakse らのデータ。

我々の最初の結論は安心感のある結論です。困難であることが分かっているために、複合影響の評価を無視する傾向があると考えられますが、我々は複合影響の評価は可能であると言えます。極めて多数の成分を含んだ混合物であっても高い精度で予測することができます。

2 つ目の結論は不安になるような結論です。個々の化学物質が低濃度で存在している場合には、影響のない濃度であってもリスクが無いことを示していると解釈することはできません。類似した作用の化学物質が同時にいくつ存在するかによって、危険性が皆無という仮説は誤りになります。このことは、内分泌攪乱化学物質については、特に悪い影響を及ぼします。なぜなら、何種類の化学物質が環境やヒトに関与しているか確実には分かっていないからです。

第三に、人工のエストロゲン様化学物質の効力が弱いことが分かっているにもかかわらず、内因性ステロイドホルモンの作用に影響を及ぼす可能性を除外することはできません。十分な数の化学物質がまとまれば、ホルモン作用にかなりの変調を生じさせ、恐らく生理学的均衡を攪乱することになります。

研究目標を達成するために、我々は高スループットの *in vitro* アッセイに依存しました。この方法で再現性とコストに対処しました。我々の方法が効率的に *in vivo* アッセイに適用できるかどうかを検証する必要があります。 *in vivo* アッセイは、 *in vitro* アッセイよりも高いばらつきがあります。もう 1 つの課題は、この分析的な混合物試験が疫学的研究で有用かどうかを検討することです。

謝辞

英国生化学生物学研究評議会の支援を受けた Jo Payne は、E スクリーンアッセイを実施しました。Nissanka Rajapakse は、12 成分混合物実験を行いました。彼はロンドン大学薬学部の博士号奨学金に感謝の意を表しています。Elisabete Silva は 8 成分混合物の実験を行いました。彼女は、ポルトガル政府 FCT から奨学金の支援を受けました。我々は英国ブルネル大学教授 John Sumpter によるイースト細胞の研究から影響を受けました。多くの刺激的な討議の機会を提供されたドイツブレーメン大学の Rolf Altenburger、Martin Scholze、および Thomas Backhaus に感謝の意を表します。最後に、欧州連合の財政的支援 (EVK1-CT-2001-00100, QLK4-CT-2002-00603) に感謝いたします。

参考文献

Rajapakse N, Silva E, Kortenkamp A (2002)

Combining xenoestrogens at levels below individual No-observed-effect concentrations dramatically enhances steroid hormone action

ENVIRON HEALTH PERSP 110 (9): 917-921 SEP 2002

Silva E, Rajapakse N, Kortenkamp A (2002)

Something from "nothing" - Eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects

ENVIRON SCI TECHNOL 36 (8): 1751-1756 APR 15 2002

質疑応答

森田：コルテンキャンプ博士、どうもありがとうございました。マルチコンポーネント環境のホルモンにおける混合作用に関する非常に興味深く重要な研究でした。特にマルチコンポーネント混合物の非常に優れた予測はとても印象的です。質問またはコメントをお受けしたいと思います。はい、どうぞ。

質問：座長と同じく、私もあなたの素晴らしいプレゼンテーションを高く評価します。なぜなら、私は予測の相乗的パターンも相加作用であると推測していたからです。あなたのプレゼンテーションで私が戸惑った点は、**synergistic**（相乗的）という用語の使い方です。私の知識と理解では、**additive**（相加作用）の推定値を超えるものとして **synergistic** を使用しています。これについてご意見をお聞かせください。

コルテンキャンプ：我々が使用した相乗作用の定義は、混合物の専門文献で述べられているものと一致しています。単純に言えば、相乗作用とは、予測した影響を超える影響であると定義されます。専門用語に関しては、専門文献にも多くの混乱が見られます。**synergistic effects potentiation**（共力効果）、**supra-activity**（増強作用）、相乗作用などとも言いますが、我々はこのかなり簡単な定義でも行き詰まっています。

質問：つまり、すこし混同があるのですね。

コルテンキャンプ：はい。

ラム：BBL Sciences のジム・ラムです。非常に素晴らしいお話とプレゼンテーションでした。殺虫剤のベンチマーク用量と累積的なリスクアセスメントについて米国で行われている研究をご存じかどうか分かりませんが、このケースでは、コリンエステラーゼを阻害する殺虫剤について ED10 を使用しています。

個々の殺虫剤のケースで ED10 の低い信頼性レベルを利用していることには議論があります。この累積的リスクアセスメントのケースでは、あなたがリスクアセスメントについて本日お話しされたのと同じような方法で、中心傾向を使用し、そ

れらを合計しています。

あなたの EC1 の推定値について私が疑問に思ったことが 1 つあるのです。その値は中心傾向か、信頼限界下限値かということです。また、このように同じ作用機序を持つ異なる物質を合計するときに、どちらがより適切だと思いますか。

コルテンキャンプ：我々は少し異なる方法を用いました。我々は、我々が最も適合していると見た回帰モデル上で得た EC1 推定値を基にして、次にこれを読んで濃度軸方向へ伸ばしました。これにより、もちろん、最も適合している回帰モデルの信頼限界が何であるのかを考慮すれば、信頼区間を推定することもできます。我々が使用したものはこれです。

これは非常に厳しい基準ですが、大部分のケースでは、ご承知の通り、EC1 を直接測定することはできませんし、EC10 であってもいくつかのアッセイでは直接測定することはできませんので、我々は故意にこれを行いました。混合物の試験という環境では、この複雑な問題が必然的に前面に出て来ると考えられます。なぜなら、時には何も観察できないときがありますが、必ずしもそれがそこに存在しないことを意味しないからです。

ラム：その通りです。ありがとうございます。

森田：最後の質問になります。どうぞ。

関沢：国立保健科学研究所の関沢です。一部の国や国際機関では共通の代謝産物を有する化学物質のリスクを推定するためにグループ ADI 法を使用していることをご存じだと思います。しかし、この場合、特に内分泌攪乱化学物質に関しては、イーストスクリーンと同じように、単純な *in vitro* アッセイから相加作用データを入手できることには同意します。

しかし、フィードバックコントロールや他の影響があるときに、体全体について考えると、例えば、フォンサー博士が示されたように、フィトエストロゲンがあり、体重が異なるような場合は、相加作用や複合暴露について注意する必要があります。*in vitro* アッセイから全身で起きることを予測することはできません。以上が私のコメントです。

コルテンカンプ：全くその通りですが、あなたの意見に全面的には同意できません。これは実際には我々がしようとしていることではありません。ある分析法から別の分析法に変更することはできません。行わなければならないのは、再度、実験をすることです。

現在、我々は大規模なプロジェクトに取り組んでおり、そこでは我々のイーストを用いた方法が動物実験で効率的に使用できるかどうかを検証する予定です。混合作用の予測精度が動物実験でも優れているかどうかを検証したいと考えています。

第二に、あなたが *in vivo* アッセイに言及されたことを非常にありがたく思っています。*in vivo* においても若干の相乗作用を観察するだろうと思います。必ずそうなると言っているのではありません

んが、そうなることを除外できません。なぜなら、多くの既知の相乗作用の基礎は毒物動態レベルの相互作用であり、単純な *in vitro* アッセイでは測定したり、モデルを作成したりできないものだからです。

従って、その見地からは、*in vivo* は非常に重要です。しかし、結果については何の推測もできません。ボトムラインは常に相加作用です。しかし、強調しておきたい点は、内分泌攪乱化学物質の分野では誰もが相乗作用に注目していますが、相加作用を忘れてはならないということです。相加作用が、事実上は、非常に重要であるかもしれせん。

森田：どうもありがとうございました。