



化学物質の環境リスクに関する国際シンポジウム
International Symposium on the Environmental Risks of Chemicals

International Session 国際セッション

Abstracts pp.20-47

アブストラクト



Session 1 How should we view the effects of chemicals? - International approaches -

Activities of OECD and the Japanese Ministry of the Environment on Endocrine Disruption

Eisaku Toda

The Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD)

This presentation consists of two parts. First part addresses the role of the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) on endocrine disruption issues. OECD started a special activity on endocrine disruptors in 1996. In 2002, a conceptual framework for the testing and assessment of endocrine disrupting chemicals was established, which consists of five levels starting from the prioritization based on existing information up to *in vivo* tests providing data on endocrine disrupting effects. Current activities of the OECD focus on the development of test methods in line with this conceptual framework. The achievements and recent progress in the development of various test methods, promoted by member countries including Japan, US and European countries, will be presented. The second part of the presentation covers the achievements of the researches conducted by the Ministry of the Environment of Japan. The Ministry started its research in 1998 based on its Strategic Programme on Environmental Endocrine Disruptors (SPEED 98). The Ministry conducted fish and rodent tests on about 30 chemicals from the list of suspected endocrine disruptors, and obtained four positive results from four substances in fish tests in concentrations close to environmental levels. All the rodent tests were negative. In 2005, the Ministry established a new strategy on endocrine disruption research, and promotes basic research, effects assessment, exposure evaluation, observation of wildlife, risk assessment, management and communication. Past achievements, current status and future prospect will be presented.

セッション 1 化学物質の影響をどうとらえるか —国際的な取組—

化学物質の内分泌かく乱作用に関する環境省とOECDの取り組み

戸田 英作

OECDテストガイドライン作業部会

本講演は二つの部分よりなる。第一に、内分泌かく乱問題における経済協力開発機構（OECD）の役割に触れる。OECDは、1996年、内分泌かく乱に関する特別プログラムを開始した。2002年には、内分泌かく乱化学物質の試験及び評価に関し、既存情報による優先付けから、影響に関するデータを提供する生物試験に至る5つの段階よりなる概念的枠組みを確立した。OECDの現在の活動は、この概念的枠組みに沿って、さまざまな試験法を開発することに焦点を置いている。日本、米国、欧州諸国を含む加盟国により推進されている試験法開発の成果と近年の進歩について紹介する。第二の部分は、日本の環境省における研究活動について述べる。環境省は、1998年、内分泌かく乱に関する戦略プログラム（SPEED98）に沿って研究を開始した。内分泌かく乱作用が疑われた約30の物質について、魚類及び齧歯類を用いた試験を行い、そのうち4つの物質で、環境中に近い濃度において魚類への影響が見られた。齧歯類試験はすべて陰性であった。2005年には、環境省は内分泌かく乱作用に関する新たな対応方針を策定し、現在、これに沿って、基盤的研究、影響評価、ばく露調査、野生生物の観察、リスク評価・管理・コミュニケーションの取組を進めている。こうした過去の成果、現在の状況及び今後の見通しを概観する。



Endocrine Disruption - Developing Approaches and Future Directions in the EU and UK

Michael J. Roberts

UK Department for Environment, Food and Rural Affairs (Defra)

Endocrine disruption has long been a major policy and scientific issue in both the European Union and the UK. In 1999, following consultation with stakeholders from across the EU, the European Commission adopted the 'Community strategy for endocrine disrupters', with a focus on short, medium and long-term actions. These included the establishment of a priority list of substances for further evaluation and linked into the development of a more effective system to assess the short and long-term risks posed by industrial chemicals and to take action where necessary - referred to as the Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals (REACH). The UK has been at the cutting edge of research on endocrine disrupting chemicals, particularly with regard to freshwater and marine environments and the development of test methods, at national, European and, via fruitful collaboration with Japan, international levels. This presentation will review these approaches and their achievements and consider some possible future directions.

内分泌かく乱作用－EU及び英国における開発アプローチと将来の方向性

マイケル J. ロバーツ

英国環境・食糧・農村地域省

内分泌かく乱作用は欧州連合（EU）・英国の双方にとって長い間大きな政策的・科学的課題となっている。EU全体に渡る利害関係者との協議の後、欧州委員会は1999年、短・中・長期的対策に焦点を置いた「内分泌かく乱物質に対する欧州共同体戦略」を採択した。これには更なる評価を必要とする物質の優先リストの作成が含まれ、「化学物質登録評価認可制度（REACH）」と呼ばれる、工業化学物質による短期及び長期的リスクを評価して必要な場合対策を取るためのより効果的な体制の確立にも繋がっている。英国は特に淡水及び海洋環境に関し、また、国内・欧州レベル、さらには日本との有意義な協力関係によって国際的なレベルにおける試験方法開発などについて、内分泌かく乱物質の研究においては最先端の位置を保持している。本講演ではそれらのアプローチや達成事項を評価し、将来的に可能な方向性を探る。



U.S. Approaches, Achievements and Future Directions in Endocrine Disruptor Assessment

Leslie W. Touart

U. S. Environmental Protection Agency

The U. S. Environmental Protection Agency (EPA) is implementing an Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP). The EDSP was required by two important Congressional mandates, the Food Quality Protection Act (FQPA) and the Safe Drinking Water Act (SDWA). EPA has consulted with several advisory bodies in the development of the EDSP which consists of two distinct tiers: a screening tier (Tier 1) and a definitive testing tier (Tier 2). The recommended assays which compose these two tiers together with the status of their development and validation will be discussed. The Tier 1 screening assays are intended to be used as an integrated battery of assays. Concepts on the interpretation of this screening battery and future prospects in putative endocrine disruptor assessment will be presented.

内分泌かく乱物質評価における米国のアプローチ、成果と将来の方向性

レスリー W. トゥアート

米国環境保護庁

米環境保護局（EPA）は内分泌かく乱物質スクリーニングプログラム（EDSP）を実施している。EDSPは食品品質保護法（FQPA）及び飲料水安全法（SDWA）という、議会からの二つの重要な指令により要求されている。EPAはスクリーニング層（第1層）と確定試験層（第2層）という異なる二層からなるEDSPの確立にあたり、幾つかの諮問機関と協議を行った。これら2つの層を構成する推奨評価法と、それらの開発・検証の現状について議論する。第1層でのスクリーニング評価法は統合された一連の評価法として使用することが意図されている。このスクリーニングのための一連の評価法の解釈に関する概念と、内分泌かく乱物質評価において将来想定される展望を紹介する。

Current Status of Testing Methods for Endocrine Disrupting Chemicals

Masahiro Takeyoshi

Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan

The OECD conceptual framework consist of 5-categorized testing methods from Levels 1 to 5 was proposed in the 6th Task Force on Endocrine Disruptors Testing and Assessment (EDTA) of the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), which represent the recognized testing methods to be applied to endocrine disruptors. And wide ranges of testing methods, ranging from *in silico* analysis to definitive test methods, are included in this framework.

The development program of testing methods for endocrine disrupting chemicals in the Ministry of Economy, Trade and Industry (METI) began in 1998, and development work and accumulation of basic data have been advanced through cooperation with the Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW). This program is focusing on the receptor binding and reporter gene assay methods, which are *in vitro* methods targeting sex hormone receptors, and uterotrophic assay, Hershberger assay and the Enhanced OECD TG407 study. It has also worked on the development of new testing methods such as a quantitative structure activity relationship (QSAR) method for prioritizing chemicals to be tested in higher level tests according to their estimated binding activity to sex hormone receptors from vast existing chemical universe. And we have also been addressed the test methods targeted to the effect on thyroid hormone production, endocrine disruption through dioxin (Ah) receptor and steroidogenesis.

In addition to aforementioned screening tests, *in utero* and lactationary exposure test, which are recognized as a simple methods of multiple-generation and investigation for promising end points to evaluate effects on hyper-system comprising endocrine-nervous-immune systems are also being advanced. The outcomes of development program on endocrine disruptor testing methods in METI/MHLW covers all the categories of OECD conceptual framework. Furthermore, among the methods we have developed, the uterotrophic assay has passed the peer review for inclusion in OECD guidelines and the peer review process for the reporter gene assay is currently in progress by OECD. These test methods are expected to be approved as part of the OECD test guidelines in the near future.

化学物質の影響をどうとらえるか？

－試験法開発の現状－

武吉 正博

財団法人 化学物質評価研究機構

内分泌かく乱物質に関する試験法はOrganisation for Economic Co-operation and Development (OECD) の the 6th Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) において提唱されたOECD conceptual frameworkではLevel 1からLevel 5に至る5つの段階的試験法が示されており、*in silico* 解析から確定試験法に至る幅広い試験法が分類・提示されている。

経済産業省における内分泌かく乱作用の試験法開発は1998年に始まり、性ホルモン受容体を標的とする*in vitro* 試験法である受容体結合試験法及びレポーター遺伝子アッセイ法、*in vivo* 試験法としては子宮増殖アッセイ、ハーシュバーガーアッセイ及び改良28日間反復投与毒性試験等の試験法を中心に、厚生労働省との連携の基に開発並びに基礎的データの収集を行ってきた。また、無数の化学物質の中から、性ホルモン受容体に対する結合性を有する物質を予測し、優先的に試験すべき化学物質を選択するための三次元構造活性相関手法(QSAR) や甲状腺ホルモン作用物質関連の試験法、ダイオキシン (Ah) 受容体アゴニスト検出試験、またアロマターゼ・ステロイド生合成への阻害物質等の新試験法の開発にも取り組んできた。

これまでに述べたスクリーニング試験法の他、確定試験法の一つである多世代試験の簡易試験法としての妊娠期・授乳期投与試験法の開発や確定試験法の構築を目的とした内分泌系－神経系－免疫系から構成される高次系に対する影響評価のためのエンドポイント検索も進められており、我が国での内分泌かく乱試験法開発の成果はOECD conceptual frameworkの全てのCategoryの試験法を網羅するものとなっている。更に、これまでに我々が開発を進めてきた試験法のうち、子宮増殖試験はOECDガイドライン化のためのピアレビューを終了し、レポーター遺伝子アッセイは現在OECDにおいてピアレビューが進行中である。これらの試験法は近い将来OECDテストガイドラインとして承認されるものと思われる。

Session 2 How should we view the environmental risks to children? - Differences from adults -

Current State and Problem concerning Children's Environmental Health in Japan

Iwao Uchiyama

Kyoto University, Japan

Ever since the adoption of the "Miami Declaration" in the G8 Environment Ministers Meeting on children's environmental health held in 1997, research and investigation approaches have been taken in Japan on the collection of information on children's environmental health, and the uniqueness and weakness of children with Ministry of the Environment taking the initiative. To date, studies have been conducted on environments for children's activities and their behavioral patterns, changes in tidal volume depending on children's activity level, soil intake, food intake and characteristics of the food groups, exposure media for environmental chemicals and so on to organize the information necessary for the quantitative evaluation of exposure unique to children. In addition, the post-natal effects of low-concentration exposure to methylmercury during fetal stages, a comprehensive study on health effects by air pollution, and an epidemiological study on the health effects of local air pollution along streets, etc. have also been implemented and a certain level of outcomes are expected to be acquired in future.

With such timing, a systematic discussion was held on the current circumstances and problems in children's environmental health and opinions were summarized in the direction of policy to be promoted in future, triggering the announcement of a "Report for Commission on Children's Environmental Health" (Ministry of the Environment, chairperson: Hiroshi Satoh, Professor, Graduate School of Tohoku University) in June this year. In the report, the importance of qualitative and quantitative evaluation of children's weakness factors was highlighted and it was also considered important to elicit the understanding of the citizens by providing information on children's environment and health appropriately to citizens when making policies and decisions based on scientific findings. It also suggested future measures and the direction of research promotion as follows:

- (1) The need to extract problems from the viewpoint of protecting children's health
- (2) Approach for the establishment of research infrastructure
 - (a) Substantiation of research funds and the introduction of competitive funds,
 - (b) Formation of the group of research sites,
 - (c) Collection of scientific findings and the grasping of international research trends,
 - (d) Human resource development
- (3) Promotion of priority research projects
 - (a) Data establishment for the evaluation of exposure of children to chemicals, etc. in the environment,
 - (b) Development of health effect evaluation methods on environmental chemicals with focus on the sensitivity of children,
 - (c) Promotion of epidemiological studies on the relevance between the environment surrounding children and health,
 - (d) Development of biomarkers in exposure evaluation and health effect evaluation and promotion of the use of a sample banking system,
 - (e) Research on how medical and welfare services should be provided in relation to children's environmental health
- (4) Promotion of environmental risk evaluation on chemicals, etc. with focus on exposure modes and weaknesses unique to children
- (5) Promotion of risk communication
- (6) Promotion of cooperation among ministries and international cooperation

It is expected that measures related to children's environmental health will be further promoted in Japan in future.

セッション 2 子どもの環境リスクをどう捉えるか —大人との違い—

子どもの環境保健に関するわが国の現状と課題

内山 巖雄

京都大学大学院

1997年に開催された子どもの環境保健に関する先進8カ国の環境大臣会合において「マイアミ宣言」が採択されて以来、わが国でも環境省を中心に子どもの環境保健に関する情報収集、子どもの特殊性、脆弱性に関する調査研究の取り組みが進められてきた。これまでに、小児に特有のばく露の定量的評価に必要な情報を整理するため、小児の活動環境や行動パターン、子どもの活動量による換気量の変化や土壌摂取量、食物摂取量とその食品群の特徴、環境中の化学物質等に対するばく露媒体に関する調査研究などが行われている。またメチル水銀の胎児期低濃度ばく露による出生後の影響、大気汚染による健康影響に関する総合的研究、道路沿道などの局地的大気汚染の健康影響に関する疫学調査などが行われており、今後一定の成果が得られることが期待されている。

このような時に、こどもの環境保健に関する現状と課題を体系的に議論し、今後の推進すべき施策の方向性についての意見のとりまとめが行われ、本年6月に「小児の環境保健に関する懇談会報告書」（環境省、座長 佐藤 洋 東北大学大学院教授）が公表された。報告書の中では、小児の脆弱性の要因の定性的、定量的評価の重要性を指摘した上で、科学的知見に基づく政策決定や意志決定を行うに当たっては、小児の環境と健康に関する情報を適切に国民に伝え、理解を得ることも重要であるとしている。さらに今後の対応策と研究推進の方向性についての提言として

- (1) 小児の健康保護の観点からの課題の抽出の必要性
- (2) 研究基盤の整備に向けた取り組み
 - ① 研究的資金の充実と競争的資金の導入、
 - ② 研究拠点群の形成、
 - ③ 科学的知見の収集および国際的研究動向の把握、
 - ④ 人材育成
- (3) 重点プロジェクト研究の推進
 - ① 小児の環境中の化学物質等に対するばく露評価のためのデータ整備、
 - ② 小児の感受性に着目した環境中の化学物質等の健康影響評価手法の開発、
 - ③ 小児を取り巻く環境と健康との関連性に関する疫学調査の推進、
 - ④ ばく露評価、健康影響評価におけるバイオマーカーの開発および試料バンキングシステムの利用促進、
 - ⑤ 小児環境保健に関連する医療・福祉等のサービス提供のあり方に関する研究
- (4) 小児特有のばく露や脆弱性に着目した化学物質等の環境リスク評価の推進
- (5) リスクコミュニケーションの推進
- (6) 省庁間連携、国際協力の推進

が述べられており、今後わが国の小児の環境保健に関する対応が一層促進されるものと期待している。

Exposure to Endocrine Disrupting Chemicals and its Adverse Effects on the Next Generation: Research Approaches and Future Issues

- Report based on the outcomes of "the Hokkaido Study of Environment and Children's Health, (Malformations, Development & Allergy)"

Reiko Kishi

Hokkaido University Graduate School of Medicine, Japan

Endocrine disrupting chemicals are reported to have large effects on the next generation including teratogenesis and neurobehavioral development in experimental animals. As for effects on human health, (1) congenital anomalies especially in the urogenital system, (2) disorders in neurobehavioral development, (3) deterioration in thyroid functions, (4) immune and allergic disorders, are targeted. However, globally speaking, there have been few epidemiological studies that examine cause-effect relationships.

We have implemented "the Hokkaido Study of Environment and Child Health (Malformations, Development & Allergy)" as a prospective cohort study on effects of exposing children to endocrine disrupting chemicals for several years. One of the cohorts is a large-scale epidemiological study to evaluate the relationship between exposure during the organogenesis stage in 12th - 13th week of pregnancy and congenital anomalies such as hypospadias and hidden testicles. The other is a study to trace neurobehavioral development in detail after birth by inviting participation from mothers in middle to late pregnancy (23 - 35 weeks). In either case, the focus was placed on the effects in the general public with background level (i.e. low concentration). Data were obtained on various environmental factors during the fetal stages, and risk was assessed using accurate exposure measurements and follow-up studies. Predisposing factors of individual susceptibility were also studied from the view point of preventive medicine to identify high-risk groups.

At this point, results indicate: 1) it cannot be denied that environmental factors of exposure to PCB and dioxins before birth may have negative effects on congenital anomalies such as hidden testicles and hypospadias and neurobehavioral development during infancy and childhood; 2) it is possible that fluorine PFOs, agricultural chemicals and mercury may have effects on physical development, neural development and behaviors at birth or later even in trace amounts; and 3) it is also possible that nutritional condition, for example, adequate intake of folic acid during pregnancy, smoking, breast feeding, and a nurturing home environment may modify or antagonize the adverse effects of chemicals. In the future, it is necessary that we follow the children's growth for long-term, longitudinal observation while examining: 1) mechanisms for expressing effects on the next generation; 2) roles of various factors including nutritional condition and home environment; 3) other composite environmental factors such as smoking, mercury, and agricultural chemicals; and 4) predisposing factors of individual genetic susceptibility of mother and child.

内分泌かく乱物質による次世代影響研究の進め方と今後の課題

— 「小児の環境と健康に関する北海道研究 (The Hokkaido Study of Environment and Children's Health, (Malformations, Development, & Allergy))」の成果を踏まえて

岸 玲子

北海道大学大学院

内分泌かく乱化学物質は、催奇形性と神経行動発達等への次世代影響が大きいことが実験動物で報告されている。人への影響としては (1) 特に泌尿生殖器系の先天異常、(2) 神経行動発達の障害、(3) 甲状腺機能の低下、(4) 免疫・アレルギー性疾患等が着目されるが世界的に見ても因果関係に迫りうるしっかりした疫学研究は未だ少ない。

我々は数年前から内分泌かく乱化学物質曝露による小児への影響について、「環境と子どもの健康 (先天異常・発達・アレルギー) に関する北海道研究」(The Hokkaido Study of Environment and Child Health (Malformations, Development, & Allergy)) を前向きコホート研究として実施している。コホートの一つは妊娠12-13週の器官形成期の曝露と尿道下裂、停留精巣などの先天異常との関係を評価する大規模な疫学研究、もう一つは妊娠中後期23-35週に参加をよびかけ生後の詳細な神経行動発達を追跡する研究である。いずれも一般人の低濃度バックグラウンドレベルでの影響に焦点をあて、胎児期の種々の環境要因についてのデータを得て一定期間追跡のあとそれぞれのアウトカムについて正確な曝露測定に基づいてリスク評価を行い、合わせて個体の感受性素因についても予防医学的な見地からハイリスク群の検討を行うのが研究の特徴である。

これまでの研究の結果として、1) 出生前のPCB・ダイオキシン類曝露など環境要因は停留精巣・尿道下裂などの先天異常や乳児期および幼児期の神経行動発達へ負の影響を及ぼすことが否定できない、2) そのほかフッ素系PFOSや農薬、あるいは水銀なども微量でも出生時あるいはその後の身体発育や神経発達、行動へ影響を及ぼす可能性が示唆される、3) しかし妊娠中の葉酸など栄養状態や喫煙、母乳哺育、家庭環境のよさが影響を修飾・拮抗する可能性があることが示唆されておる。今後は1) 次世代影響発現のメカニズム解明、2) 栄養状態や家庭環境を含め諸要因の役割、3) 喫煙や水銀、農薬などの他の複合的な環境要因、および4) 母と児の遺伝的な感受性素因の検討を行いながら、子どもの成長を追ってより長期間の縦断的な観察を行うことが必須である。



WHO Programme on Healthy Environment for Children

Hisashi Ogawa

World Health Organization (WHO)

Children are particularly vulnerable to environmental hazards because they are constantly growing, and consume more food, air and water than adults do in proportion to their weights. Their immune, reproductive, digestive and central nervous systems are still developing and they spend their time closer to the ground where dust and chemicals accumulate. Exposure to environmental health risks at early stages of development can lead to irreversible long-term, often lifelong mental and physical damage.

Priority environmental risks that must be tackled, particularly in developing countries include unsafe water, lack of hygiene and poor sanitation, indoor air pollution, vector-borne diseases, chemical risks, and unintentional injuries. These risk factors cause a bulk of environmentally-related deaths, diseases and disabilities among children and undermine their development.

The global initiative on Healthy Environments for Children, launched at the World Summit on Sustainable Development in Johannesburg, South Africa in 2002, has brought together governments, non-government organizations and international organizations to form an alliance, called the Healthy Environments for Children Alliance or HECA to galvanize world-wide actions on some of the major environmentally-related risks to children's health. The actions would be developed and implemented at the settings where children live, learn and play by providing knowledge, increasing political will, mobilizing resources, and catalyzing coordination.

WHOの小児環境保健プログラム

小川 尚

WHO西太平洋地域事務局

子供達は成長過程にあり、体重の割りに食料、空気、及び水の消費量が大人より大きくなるため、環境リスク要因の影響を特に受けやすい。またその免疫系、生殖系、消化系、ならびに中枢神経系の機能がいまだ発達段階にあり、粉塵や化学物質が蓄積しやすい地面により近い低い位置で多くの時間を過ごすこととも相俟って、発達段階のより早期に環境による健康リスクに暴露されることが極めて懸念され、その結果、長期的で非可逆的または時には一生にわたり続くことにもつながる精神的ならびに身体的損害に至ることもある。

特に発展途上国で対処すべき優先度の高い環境リスクとしては、飲料水の安全性、保健衛生の欠如と粗末な下水設備、屋内空気の汚染、動物によって媒介される病気、化学物質によるリスク、ならびに事故による傷害などが含まれ、これらのリスク要因は、多くの子供達における劣悪な環境に由来する死亡、疾病、及び障害を引き起こすことにつながり、彼らの成長の土台を揺るがすものである。

因みに、2002年に南アメリカのヨハネスブルグにおいて開催された「持続可能な開発に関する世界首脳会議」において建議された世界的イニチアティブである「小児環境保健」では、子供の健康に対する主要な環境関連リスクについての世界横断的な対処を活性化させるために、各国政府、NGO、及び国際機関が「小児環境保健同盟（HECA）」と呼ばれる協力関係を結んでいる。そしてこの活動は、子供達が実際に居住し、学習し、且つ遊ぶ環境に対して、知識を提供し、政治的意思を鼓舞し、人的資源を動員し、そしてそれらの協調性を融合することにより策定され実行されることになる。



Session 3 What do we know about chemicals so far?

- Today's basic research on environmental disruption effects -

What we know about the many mechanisms of action of endocrine disruption: a short review

John A. McLachlan

Tulane and Xavier Universities, U.S.A.

Many chemicals in the environment can mimic or block the hormones of the vertebrate endocrine system. In some cases these chemicals are pharmaceutical products designed and taken as hormones. In other cases, common environmental pollutants function as vertebrate hormones or anti hormones. The predominant activity seen among environmental chemicals is that of the female sex hormone, estrogen; this fact may derive from the evolution of signaling molecules found in plants, fungi and animals. Initially, mechanistic studies of environmental hormones focused on the interaction of the chemical with the appropriate nuclear receptor. For example, an environmental estrogen would be expected to bind to and activate the estrogen receptor in the nucleus of a target cell. We now know that there are two estrogen receptors in the nucleus of vertebrate cells - estrogen receptor alpha and beta. These two receptors have different affinities for different estrogenic compounds with estrogen receptor beta having a greater affinity for some estrogen-like chemicals found in dietary plants (the so-called phytoestrogens). More recently, membrane receptors and cell activation pathways have been reported for estrogens; in some cases environmental estrogens activate the membrane systems more vigorously than predicted from nuclear receptor studies. In addition to intracellular receptors for hormones, other emerging targets for such activities include aromatase, the enzyme responsible for converting androgen (testosterone) to estrogen (estradiol). For example, atrazine, a chemical associated with developmental feminization of frogs, was not found to be estrogenic per se, but altered the level of aromatase so that the frog produced more estrogen at a critical period of development. Conversely, developmental masculinization of fish in response to hypoxia is apparently mediated through reduction of aromatization resulting in a higher ratio of testosterone to estrogen in the developing fish. These results raise new mechanisms of action that will have to influence screening procedures for environmental hormones in much the same way studies with the environmental anti-androgen, vinclozolin did earlier. Many examples of endocrine disruption such as sex reversal in reptiles following treatment with organochlorines, second generation effects in rats treated during pregnancy with methoxychlor, developmental imprinting of prostate disease with estrogens in rats, and increased cancers in the first generation and effects on fertility in the second generation in humans exposed prenatally to diethylstilbestrol (DES) demonstrate that estrogenic chemicals can alter developmental programs resulting in long term persistent effects in gene expression and organ function. One apparent mechanism that is emerging from these studies is the ability of estrogenic chemicals to imprint genes through the process of epigenetic change (persistently altered gene expression in the absence of gene mutation). In other words, hormonally active environmental compounds may actually alter the process of cell differentiation in a way that persists through several generations. Finally, results demonstrating disruption of environmental signals between different species such as plants and nitrogen fixing soil bacteria raise a new vista for global signal disruption that is only now coming into view.

セッション 3 これまでに化学物質について何がわかったか —内分泌かく乱作用に関する基礎的な研究の今—

総説：内分泌かく乱作用の数多いメカニズムについて何がわかっているか

ジョン A. マクラ克蘭

チューレン大学

環境に存在する化学物質の多くは、脊椎動物の内分泌系のホルモンを模倣ないしは阻害をすることができる。これら化学物質の一部は、ホルモンとして摂取するために作られた医薬品である。しかし他の場合であっても、一般的な環境汚染物質が脊椎動物におけるホルモンや抗ホルモン剤として機能することがある。このような環境物質に見られる最も主要な作用は、女性ホルモンであるエストロゲン作用であり、これは、植物、菌類、ならびに動物に見られるシグナル伝達分子の進化に由来するものであると思われる。当初、環境ホルモンの作用メカニズムの研究の多くが、核内受容体と化学物質との相互作用に焦点を当てるものであった。例えば、環境エストロゲンであれば標的細胞の核にあるエストロゲン受容体に結合し活性化すると予測されるようなものである。しかし現在では、脊椎動物の細胞核にはエストロゲン受容体 α ・ β と呼ばれる2種類のエストロゲン受容体があることが分かっている。これら2種類の受容体は異なるエストロゲン類似化合物に対して異なる親和性を持ち、エストロゲン受容体 β は食用植物に含まれるエストロゲン様化学物質の一部（いわゆる植物性エストロゲン）に対してより大きな親和性を有していることが知られるようになってきている。さらに最近の研究では、エストロゲンの膜受容体や細胞活性化経路も研究されるようになり、環境エストロゲンによる膜系の活性化は、核内受容体研究で予測されるよりもずっと大きいものであるという報告もある。また、ホルモンの核内受容体に加え、これら作用の新しい標的として、アンドロゲン（テストステロン）をエストロゲン（エストラジオール）に変換する芳香化酵素であるアロマターゼがあげられている。例えば、カエルの発生における雌性化に関連する化学物質であるアトラジンは、それ自体にはエストロゲン作用は無いとされるものの、アロマターゼの濃度を変化させることによってカエルの発生の重要な時期にエストロゲンを過剰に生産させる作用がある。逆に、発生中の魚類では、低酸素条件に対する反応としておこる雄性化は、芳香化の減少によるものであり、発生段階にある魚類でテストステロンのエストロゲンに対する比率が高まる結果によることが分かっている。これらの結果は、環境中の抗アンドロゲン物質であるビシクロゾリンに関する研究の件と同様に、環境ホルモンのスクリーニング手法に影響する、新しい作用メカニズムを提起している。そして、発生中の爬虫類で有機塩素剤処理後に起こる性転換、妊娠中のメトキシクロル処理によるラット第二世代への影響、発達段階のラットにおけるエストロゲンによる前立腺疾患の刷り込み、ならびに、胎児期にジエチルstilbestrol（DES）に曝露された人間の第一世代におけるガン発生率の増加と第二世代における生殖能力への影響などの内分泌かく乱作用の多くの例が、エストロゲン類似化学物質によって発達の生体プログラムが変更され、遺伝子発現や臓器機能に長期的で永続的な影響が残ることを示している。これらの研究により顕著に判明しつつあるメカニズムとして、エピジェネティック（後成的）な変化（遺伝子突然変異の無いまま永続的に発生する遺伝子発現の変化）というプロセスによるエストロゲン化学物質による遺伝子刷り込み作用がある。つまり、ホルモン作用を有する環境物質は、細胞分化の過程に変更を加えて数世代の間持続する影響を与える可能性があるということである。最後に、植物と窒素固定土壌細菌のような異種間における環境シグナルのかく乱を示す研究結果により、地球規模のシグナルかく乱についての新しい展望も開きつつあるところである。

Additive Effects of Mixtures of Antiandrogens on the Male Rat Reproductive Tract

Cynthia Rider^{1,2}, Jonathan Furr², Vickie Wilson², L. Earl Gray Jr²

¹NCSU, Raleigh, NC, USA, ²USEPA, ORD, NHEERL, RTD, Research Triangle Park, NC, USA.

People are typically exposed to mixtures of chemicals. Accordingly, the United States Environmental Protection Agency was charged under the Food Quality Protection Act of 1996 to consider the cumulative effects of similar chemicals in their risk assessments. We are conducting research into the joint effects of antiandrogenic chemicals. The main objectives of this study were to: (1) determine whether dissimilar antiandrogenic compounds display additive effects when present in combination and (2) to assess the ability of modelling approaches to accurately predict these mixture effects based on data from single chemical exposures. Pregnant rats were exposed to a combination of seven antiandrogens and male offspring assessed for effects on androgen sensitive endpoints including: anogenital distance (AGD), infant areolae/nipple retention, sex accessory tissue weights, and reproductive tract malformations. The selected compounds (vinclozolin, procymidone, prochloraz, linuron, and three phthalates; BBP, DBP, and DEHP) interfere with androgen signalling at multiple levels, from inhibition of androgen synthesis to androgen receptor antagonism. The high dose of the mixture was based on the relative potencies of individual chemicals with respect to inducing malformations (15 mg/kg/d vinclozolin, 15 mg/kg/d procymidone, 35 mg/kg/d prochloraz, 20 mg/kg/d linuron, and 150 mg/kg/d each of BBP, DBP and DEHP). The remaining treatment groups were dosed with dilutions equalling 75%, 50%, and 25% of the high dose. We found that the effects of the mixtures were additive for all measured endpoints. Observed data were compared to predicted data generated with various modelling approaches based on concepts of dose addition, response addition, or integrated addition. The dose addition model provided the best fit to observed data, while the response addition model consistently under-predicted mixture effects. In summary, our results indicate that mixtures of antiandrogens that act at different levels of a common signalling pathway display additive effects. Funding was provided by the NCSU/EPA Cooperative Training Program CT826512010. Disclaimer: This is an abstract of a proposed presentation and does not necessarily reflect USEPA policy.

抗男性ホルモン物質の複合による雄ラット生殖器官に対する相加的作用

シンシア V. ライダー

米国国立健康環境影響研究所

ヒトは通常、多くの化学物質に複合暴露されている。このため、米環境保護局は1996年の食品品質保護法により、リスク評価において類似した化学物質の累積的影響を考慮することが必要となった。現在我々は、抗男性ホルモン作用を示す化学物質による複合影響の研究を行っている。この研究の主な目的は (1) 混合された存在下で非類似型の抗男性ホルモン物質が相加作用を示すかどうか判断すること、(2) これら混合物による影響を単一化学物質暴露データに基づいて正確に予測するモデリングアプローチの可能性を評価することである。妊娠中のラットを7種類の抗男性ホルモン物質混合物に暴露し、雄の子について肛門性器間距離、幼児期の乳輪・乳頭保持率、生殖腺附属組織重量、生殖器官奇形などを含むアンドロゲン感受性エンドポイントへの影響を評価した。選択した物質（ビクロゾリン、プロシミドン、プロクロラズ、リニューロンとBBP、DBP及びDEHPの3種のフタル酸塩）は、アンドロゲン合成の阻害からアンドロゲン受容体の拮抗作用までに至る各種段階においてアンドロゲンによる情報伝達を阻害する。混合物の高用量は各物質の奇形を誘発する相対的効力（ビクロゾリン15mg/kg/d、プロシミドン15mg/kg/d、プロクロラズ35mg/kg/d、リニューロン20mg/kg/d、BBP、DBP、DEHPについて各150mg/kg/d）を基準として決定した。残る処理群には高用量の75%、50%、及び25%の希釈物を投与した。混合物の影響は測定したエンドポイント全てについて相加的であることが判明した。観測データは用量相加、反応相加、または統合的相加の考えに基づいて、各種モデリングアプローチにより得られた予測データと比較した。観測データに最も近かったのは用量相加モデルであり、反応相加モデルでは常に複合作用を下回る予測となった。要約すると、同じ信号経路における異なる段階に作用する抗男性ホルモン物質の複合は相加的作用を示すことが結果として示された。この研究資金はNCSU/EPA協力的教育プログラムCT826512010により提供された。免責事項：これは発表論文の要約であり、USEPAの政策を必ずしも反映するものではない。

Epigenetic Basis for Increased Prostate Cancer Susceptibility Due to Developmental Exposure to Estradiol or Bisphenol A

Gail S. Prins¹, Wan-Yee Tang², Jessica Belmonte¹, Shuk-Mei Ho²

¹Department of Urology, University of Illinois at Chicago

²Department of Environmental Health, University of Cincinnati

Previous studies have shown that neonatal exposure to estradiol at high doses induces prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) in a rodent model; however, low dose exposure to estradiol or BPA has not been associated with prostatic pathology. In the present study, we asked whether neonatal low-dose estradiol or an environmentally relevant dose of BPA might alter the sensitivity of the prostate to hormonal carcinogenesis induced by prolonged exposure to testosterone plus estradiol (T+E) in adulthood. Sprague-Dawley rats were treated with high-dose estradiol benzoate (EB; 25 mg), low-dose EB (0.001 mg), BPA (0.1 mg) or oil on neonatal days 1, 3 and 5. On day 90, the animals were given T+E implants or empty capsules for 16 weeks. Prostates were examined histologically on Day 200 (7 months) in a blinded fashion and scored for PIN lesions. Rats treated neonatally to high-dose EB with or without adult T+E had a high PIN incidence and score and revealed an estrogenized phenotype. While low-dose EB exposure alone mildly increased the PIN incidence/score, neonatal BPA alone had no pathologic alteration in the aged prostate. However, rats exposed neonatally to BPA followed by T+E in adulthood showed a significantly higher PIN incidence and score compared to control rats. Importantly, neonatal BPA/adult T+E prostates were indistinguishable from neonatal high-dose EB prostates. Thus the present findings suggest that low-dose estrogens may predispose to PIN with aging and that an environmentally relevant dose of BPA may increase the susceptibility of the prostate gland to carcinogenesis following additional adult exposures.

To determine whether neonatal exposures to estradiol or BPA may be mediated through epigenetic mechanisms, we screened these prostate tissues for global DNA methylation changes using methylation-sensitive restriction fingerprinting (MSRF). Over 30 gene candidates were cloned that showed consistent methylation changes on Days 10, 90 and/or 200 without or with adult T+E treatment. Phosphodiesterase type 4, variant 4 (PDE4D4) was identified as a novel imprinted gene due to consistent and early hypomethylation of its 5' flanking region following EB or BPA exposure. RACE and bisulfite genomic sequencing identified a 5' CpG island that exhibited differential methylation patterns following neonatal estrogenic exposures. Methylation-sensitive PCR confirmed hypermethylation at this site in control prostates with aging and hypomethylation following neonatal exposure to high-EB, low-EB or BPA. Real-time RT-PCR confirmed an inverse relationship between methylation at this site and gene expression. Importantly, differential methylation and gene expression between the control and neonatal estrogen-treated prostates was distinguishable at Day 90, prior to adult hormone exposure and associated pathologic changes. Thus PDE4D4 may serve as a useful molecular marker of susceptibility to prostate carcinogenesis. We postulate that PDE4D4 dysregulation via hypomethylation at its 5' regulatory region by early EB/BPA exposure may induce persistent gene expression changes that contribute to prostate cancer. (funded by NIEHS- ES12281)

エストラジオールまたはビスフェノールAの発達期暴露による 前立腺ガン感受性増加のエピジェネティック基盤

ゲイル S. プリンズ

イリノイ大学

従来の研究により、齧歯類モデルでは新生児期のエストラジオールの高用量暴露で前立腺上皮内腫瘍（PIN）が誘発されることが判明しているが、低用量のエストラジオールまたはBPA暴露は前立腺病変とは関連付けられていない。本研究では新生児期における低用量エストラジオールまたは環境レベルのBPA用量により、成熟期のテストステロン+エストラジオール（T+E）の長期暴露により誘発されるホルモン性発ガンに対する前立腺の感受性に変化が起きるかどうかを調べた。SD系ラットに高用量エストラジオールベンゾエート（EB；25 mg）、低用量EB（0.001 mg）、BPA（0.1 mg）または溶媒を、生後1, 3及び5日目に投与した。90日目から16週間T+Eカプセルまたは空のカプセルを移植した。200日目（7ヶ月）で前立腺組織を盲検してPIN病変の進行度を点数化した。新生児期に高用量EBに暴露されたラットは成熟期のT+Eの存否にかかわらずPIN発病率及び進行度が高く、エストロゲン暴露に典型的な表現型を示した。低用量EB暴露のみでもPIN発病率・進行度は僅かに上昇したが、新生児期のBPA投与のみでは前立腺に病的変化を引き起こさなかった。しかし、新生児期にBPAの暴露を受け成熟期にT+Eを投与されたラットは対照群に比較して有意に高いPIN発病率と進行度を示した。重要なのは新生児期にBPA暴露を受けT+Eを成熟期に投与された前立腺と、新生児期に高用量EB暴露された前立腺とは区別が不可能であったことである。本研究結果から、低用量エストロゲンにより老化によるPINに対する感受性が高まること、また環境レベルのBPA用量によっても前立腺の成熟期における更なる暴露により発ガンへの感受性が高まることが示唆される。

エストラジオールまたはBPAへの新生児期における暴露がエピジェネティックなメカニズムにより仲介されるかどうか判断するため、メチル化感受性制御フィンガープリント法（MSRF）により全体的なDNAメチル化について前立腺組織をスクリーニングした。T+E処理に関係なく10, 90及び/または200日目にメチル化の変化を示した30以上の候補遺伝子をクロニングした。EBまたはBPA暴露により、5'隣接領域で一貫して早期の低メチル化を示す、ホスホジエステラーゼ4型、変異4型（PDE4D4）が新しくインプリンティング遺伝子として特定した。RACE及びbisulfiteゲノム配列決定法により、新生児期のエストロゲン暴露後メチル化パターンに変化を示した5' CpGアイランドを特定した。メチル化感受性PCRで、このアイランドは老化した対照群ラットのの前立腺で高メチル化を示すが、高用量EB、低用量EBまたはBPAの新生児期暴露で低メチル化を示すことを確認した。リアルタイムRT-PCRにより、この地点におけるメチル化と遺伝子発現との間に逆相関があることを確認した。重要なことは、成熟期のホルモン暴露とそれに関連する病変の前である90日目において、対照群と新生児期エストロゲン暴露前立腺の間でメチル化の差と遺伝子発現の差が区別可能であったことである。このため、PDE4D4は前立腺発ガンに対する感受性の有用な分子マーカーとしての機能を果たす可能性がある。早期のEB/BPA暴露による5'制御区域の低メチル化を介したPDE4D4異常調節は前立腺ガンに寄与する持続性の遺伝子発現変化を誘発する可能性があるかと推定される。（資金援助はNIEHS-ES12281による）

Function of AhR in the Ovary

Ken-ichirou Morohashi

National Institutes of Natural Sciences, National Institute for Basic Biology, Japan

Dioxins are known to cause carcinogenesis, immune suppression, female hormone-like activities, *etc.* In many cases, these activities have been confirmed to be mediated by dioxin receptors (AhR), based on the analysis of AhR gene disrupted mice. It is interesting that the AhR gene is conserved in a variety of animal species, even though these activities are disadvantageous to the existence of the organisms. Therefore, it has been considered that AhR has unknown but important biological functions. We studied the phenotypes of AhR gene disrupted mice in detail and found that the reproductive ability of the female mice was affected drastically. More detailed examination of the affected reproductive ability revealed that it occurs from oogenesis to ovulation. Subsequently, we examined target genes of AhR in the ovary and found that aromatase gene, which is essential for female sex-hormone production, is controlled by AhR. Namely, the expression of aromatase gene is not increased in the proper timing of the ovarian estrus cycle in AhR gene disrupted mice, and thus the production of female hormones is insufficient. Meanwhile, this result also indicated that AhR ligand molecules, such as dioxins, may activate female hormone production through ectopic upregulation of aromatase gene. While AhR was considered so far as a transcription factor involved in metabolism of foreign substances, this study revealed the intrinsic biological function of the factor. This result elucidated for the first time the mechanism how dioxin exerts female hormone-like activity and how it functions as an endocrine disruptor.

ダイオキシンの内分泌攪乱作用メカニズム

諸橋 憲一郎

基礎生物学研究所

ダイオキシン類は発ガン、免疫抑制、女性ホルモン様作用などを引き起こすことが知られている。多くの場合、これらの作用はダイオキシンレセプター (AhR) を介することが、AhR遺伝子破壊マウスの解析から確認されている。これらの作用は生物の存在に対し不利益をもたらすにもかかわらず、AhR遺伝子が生物種を超えて保存されていることは興味深い。このことはAhRが生体にとって未だ解明されていない重要な機能を担っていると考えられてきた。我々はAhR遺伝子破壊マウスの表現系を詳細に検討し、特に雌の遺伝子破壊マウスの生殖能力が著しく低下していることを見いだした。この雌マウスの生殖能力の低下を詳細に検討した結果、生殖能力の低下が卵形成から排卵に至る過程の異常によることを明らかにした。次いでAhRの卵巣における標的遺伝子を検討したところ、女性ホルモンの産生に必須のアロマターゼ遺伝子がAhRによって制御されていることが明らかにした。すなわち、AhR遺伝子破壊マウスの卵巣では性周期の適切な時期にアロマターゼ遺伝子の発現が上昇しないため、女性ホルモン産生が不十分だったのである。一方、この結果はダイオキシンなどのAhRのリガンド分子はアロマターゼ遺伝子の発現上昇を介し、女性ホルモン産生を亢進することを示すものであった。従来、AhRは外来異物の代謝を調節する転写因子として理解されてきたが、本研究によってAhRの生体における本来の機能が明らかになった。さらにこの結果はダイオキシンがいかなるメカニズムのもとに女性ホルモン様活性を示すのか、すなわち内分泌攪乱物質として機能するのかを明らかにしたものである。