

研究要旨：

環境中には内分泌かく乱物質であると疑われている化学物質が、数多く存在するといわれているが、その情報源に関する信頼性はほとんど確かめられていない状況にあると思われる。本年度は、内分泌かく乱作用を検出する各 in vitro および in vivo 試験法の有用性と欠点の整理及び、近年話題となっている物質のうち bisphenol A について、最新の文献等の情報を加えて内分泌かく乱作用に関する毒性評価を行った。

A. 研究目的

環境中には内分泌かく乱物質であると疑われている化学物質が、数多く存在するといわれているが、その情報源に関する信頼性はほとんど確かめられていない状況にあると思われる。その理由として、近年数多くの内分泌かく乱物質であることを示唆する報告がされているが、その実験方法はそれぞれの報告者によって様々な手法を用いたものであり、これらの様々な報告例を、しかも多種類の内分泌様作用に対する結果をもとに、内分泌かく乱物質という大きな定義枠の中で、総合的に評価あるいは分類することが現時点で困難なものであることがあげられる。さらに、内分泌かく乱物質であることを証明するための実験方法やその必要あるいは十分条件等に、研究者間でのコンセンサスが得られていないことは、問題を更に複雑なものにしている。しかし、評価の前段階に当たるコンセンサスの問題については、現在 OECD や IPCS などの国際機関や日米 EU 等のそれぞれの国の行政機関で、評価手法の統一のプロジェクトが進められており、近い将来には具体的な方策が打ち立てられると思われる。しかし、個々

の物質に対する評価はその後になり、環境中に数多く存在するといわれている物質に対する安全性の評価には更に時間が必要であると考えられる。

より科学的・客観的に個々の物質に対する内分泌かく乱作用を評価するには、上記プロジェクトが終了するのを待たなければならないが、現時点で大量に生産され、且つ、日常生活のうえで暴露される機会が多い化学物質については、緊急に評価することが必要であると考えられる。本研究ではこの目的のもと、近年、内分泌かく乱作用が問題となった化学物質のうち、特にプラスチックや樹脂の原料として使用されている物質を取り上げ、さらに、研究の緊急性観点から、ヒトへの健康影響に関わる情報に焦点を当て、各化学物質の内分泌かく乱作用に関する情報の信憑性を調査し、それらの物質の内分泌かく乱作用について評価することを目的とする。

B. 研究方法

一般的に、化学物質の安全性を評価するには、単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、発がん性試験、生殖・発生毒性試験、変異原

性試験などの試験結果を用いて行うことになるが、内分泌かく乱作用については、必ずしもこれらの試験ですべてを検出できないと考えられる。そこで、内分泌かく乱作用を検出する様々な in vitro および in vivo 試験法が開発されてきている。また、これらの試験以外に作用メカニズムを解析した研究結果は、数多くの内分泌かく乱作用を疑われる物質を評価するうえで重要な位置を占めると考えられる。

まず最初に、内分泌かく乱作用を評価する上で、各試験法で得られる情報の限界を認識しておく必要がある。そこで本年度は、(I) 内分泌かく乱作用を検出する各 in vitro および in vivo 試験法の有用性と欠点を整理する。また、(II) 近年、話題となっている物質のうち今年度は、bisphenol A について、最新の文献等の情報を加え、情報整理を行うこととする。次年度は、フタル酸エステル類とアルキルフェノール類について、同様の情報整理を行い、最終年度では、これら 2 年間に行った物質のヒトに対する総合的な安全性評価を行うことを目標とする。この分野における研究の進歩は著しいものがあり、最終年度では更なる情報の追加と新たな試験方法を取り入れた総合判断が必要になるものと思われる。

C. 研究結果および考察

(I) 内分泌かく乱作用を検出する各 in vitro および in vivo 試験法の概要

生体内のホルモンは、細胞に存在するホルモン受容体を介してホルモン作用を発現することが、知られているが、内分泌かく乱作用を持つ物質もホルモン受容体を介して、増強あるいは抑制、あるいはその両方のホルモン様作用を引き起こして、内分泌系にかく乱作

用を引き起こすものと考えられている。さらに、内分泌かく乱作用の定義としては、生体内のホルモンの合成・代謝に影響を及ぼした結果、引き起こされる障害も含まれることになるが、微量な量で作用が発現する受容体を介した影響により注目が集まっている。この観点において、近年、エストロゲン作用などの性ホルモン受容体を介した作用の検出法が数多く開発されてきており、in vitro アッセイ系と in vivo アッセイ系に大きく分けられる。

I-a) in vitro アッセイ系

in vitro アッセイ系には、受容体結合試験と酵母および培養細胞を用いた試験がある。

受容体結合試験は、ホルモン受容体を細胞から、あるいは遺伝子工学的手法で調整し、その受容体と検索対象化学物質との親和性を検出する方法である。ホルモン作用を引き起こすにはまず、受容体への結合が必要であること前提に考えられた方法であり、理論的に系が単純であるため、数多くの化学物質をこなし、比較するには有用な系である。しかし、結合した後の作用様式は見えていないため、アゴニストであるかアンタゴニストであるかは区別できない。

次に、酵母を用いた試験であるが、これは、ホルモン受容体遺伝子とその受容体を結合する領域を上流に持って発現が制御される遺伝子（レポーター遺伝子）を同時に導入した酵母に、化学物質を暴露し、誘導されるタンパク質や酵素活性を指標に、ホルモン様作用を検出する方法である。この方法は、前述した受容体結合試験に比べ、アゴニスト作用とアンタゴニスト作用が区別できる点で有用であるが、受容体による発現様式が単純なもので

あると同時に、遺伝子の発現調節が酵母内で行われるため、必ずしも、哺乳類やヒトのような高等動物の細胞内でも同様なことが起きていることを保証するものではない。また、近年、ホルモン受容体を含めた核内レセプターは相互にクロストークすることにより発現調節を行うことや、受容体以外の co-factor が発現調節に重要な役割を担っていることが明らかにされてきており、単純にアゴニスト作用とアンタゴニスト作用を区別することはできなくなっている。しかし、次に述べる培養細胞を用いた試験に比較すれば、細胞の取り扱い等が簡便であり、やはり、数多くの物質を検索するには有用な系であると考えられる。

培養細胞を用いた試験には大きく分けて 2 種類ある。一つは、前の酵母を用いた試験同様に、受容体遺伝子とレポーター遺伝子を細胞に導入し、化学物質に対するレポーター遺伝子産物を検出する方法である。この方法は、酵母とは違い高等動物由来の細胞を用いることにより、生体に近い反応が期待できるが、使用した細胞に内在する他の核内レセプターや co-factor による影響を無視できず、使用する細胞により異なった結果が得られることが想定される。もう一つは、ホルモンの依存して増殖するか、あるいは特定のタンパクを発現する性質を持つ細胞を使用して、ホルモン様作用を検出する方法である。この方法は、外来性の遺伝子を導入する方法に比べれば、さらに生体内での反応に近い作用を検出できると考えられる。しかし、これは、生体内での数あるホルモン作用の一部を検出しているに過ぎず、検索段階で偽陰性の物質をなくするためには、作用様式ごとの細胞を用意する必要があると考えられる。また、これまで述べ

た他の in vitro 試験法での前提条件である “すべてのホルモン作用は受容体を介したものである” という条件とは、完全には一致せず、現象的には生体に近いものであるが、作用機序を特定することが困難である考えられる。

以上が in vitro アッセイ系の概略であるが、すべての方法において、in vitro アッセイは、in vivo に比べ短期間に多くの物質を検討することはできるが、化学物質の代謝、体内分布などの要素を含んでいないことは、考慮しておく必要がある。

I - b) in vivo アッセイ系

in vivo アッセイ系には、子宮への影響に関する試験、雄性生殖器官への影響に関する試験、生殖・発生毒性試験などがある。

子宮への影響に関する試験 (Uterotrophic アッセイ) では、離乳直後の雌動物あるいは卵巣を摘出した成熟雌動物に投与し、子宮重量の増加などを指標にエストロゲン作用を見るものである。

雄性生殖器官への影響に関する試験 (Hershberger アッセイ) では、去勢した幼若動物に化学物質を投与し、前立腺、精囊などの副生殖器官の重量を測定してアンドロゲン作用を検出する。

また、生殖・発生毒性試験では、生殖・発生に対する化学物質の作用を検出するが、従来の方法によるエンドポイントだけでは不十分で、生殖器官の病理組織、精子数や運動能、血中ホルモンレベルなどの検査が必要であると考えられる。

しかし、in vivo アッセイ系で気を付けなければいけないことに、投与用量と投与・観察時期の問題がある。投与用量に関しては、現在まだ議論されている問題であるが、低用

量で発現する毒性が高用量では発現しないと言う可能性についてである。その真偽はともかく、In vivo 試験であるという特性上、in vitro 試験のように多段階の用量設定を行うことは困難であり、試験計画を立てる前に物質の特性を調べた上で用量設定を行わないと、思わぬ作用を見過ごす可能性があると考えられる。また、投与・観察時期に関しては、上に述べた試験は特に、胎児あるいは新生児期、および成体においてもホルモン状態が著しく変化している時期における内分泌かく乱作用を検出することを目的としている。そのため、生体内で通常、一過性におきているホルモン作用に対する影響を vivo のレベルで検出しなければならないので、投与・観察時期は極めて重要である。場合によっては、この物質の作用機序に基づき、投与や観察時期を変えなければならないことがおきるかもしれない。

in vivo アッセイでは、生体に対する影響を代謝も含めてトータルで検索することはできるが、in vitro に比べて多くの時間と手間を必要とする。したがって、in vitro によるスクリーニングの後に in vivo アッセイを行うというような効率を考えたアプローチを行わないと数多くの内分泌かく乱作用の疑われる物質を評価することは困難であろう。現在、米国の EPA では、in vitro アッセイ系を中心とした簡易スクリーニング (HTPS) により、約 15,000 もの高生産量化学物質の中から 1 次スクリーニングを行い、今後の試験に供する物質の選定を行おうと計画している。また、OECD においては、内分泌かく乱作用を念頭に置き、既存のガイドラインの改定や新規試験法ガイドラインの策定を計画すると共に、評価方法の国際的なハーモナイゼーションを推進している。現在は、各種スクリ

ーニング試験の妥当性を加盟国間で分担して検証中である。

(II) Bisphenol A の内分泌かく乱情報の評価

Bisphenol A はポリカーボネート、エポキシおよびポリスチレン樹脂の原料として用いられており、高温処置で容易に溶出される。この bisphenol A の内分泌かく乱作用が疑われるの最初の報告は約 60 年も前にさかのぼり、子宮摘出ラットに対する持続性発情期 (persistent estrus) の誘発が発端である (Dodds and Lawson, 1936)。また、同様に、用いられる同族体の diphenyl alkane として bisphenol F、bisphenol AF などがあり、これらについても、内分泌かく乱作用が疑われている。そこで、まず bisphenol A の安全性を評価する前に、最近の文献を中心に、in vitro 試験と in vivo 試験に分けて情報を整理してみた。

II-a) in vitro 試験

in vitro で行われた最初の実験報告は、酵母の培養液中に存在するヒト乳がん由来の細胞 (MCF-7) のプロゲステロン受容体を誘導する物質の検索過程において、培養容器のポリカーボネートから溶出する bisphenol A が同定され、さらに、エストロゲン受容体と結合部位を競合することが示された (Krishnan et al., 1993)。このプロゲステロン受容体の誘導活性は、エストラジオールの約 5000 分の 1 であり、10~25nM (約 2.3~5.7 ng/ml) の濃度で誘導することが示された。また、エストロゲン受容体との結合親和性の強さはエストラジオールの 2000 分の 1、さらに、25 nM では、MCF-7 の細胞増

殖率を増加することが認められた。また、最近の報告でも同様の濃度で MCF-7 の増殖活性増強とプロゲステロン受容体誘導能があることが確かめられている (Perez et al., 1998)。また、酵母にエストロゲン受容体遺伝子と共にエストロゲン受容体依存的に発現するレポーター遺伝子を組み込んで、エストロゲン活性の測定を行った報告では、bisphenol A は、 10^{-7} M から活性が発現し、 10^{-5} M で最大の活性が認められ、その相対的な強さは、エストラジオールの 15,000 分の 1 であることが示された (Gaido et al., 1997)。また、ヒト肝がん由来の HepG2 細胞に受容体とレポーター遺伝子を導入した報告では、bisphenol A は酵母のときと同様の濃度でエストロゲン作用を示したが、この細胞の場合には、エストラジオールとの相対的な活性の強さは 26 分の 1 にも達していた。しかし、この報告では、5nM のエストラジオールの受容体を競合阻害するの約 1 万倍の量の bisphenol A が必要であることが示され、同時に行った In vivo 試験や受容体の変異体を用いた実験により、bisphenol A が単に弱いエストロゲン作用を模倣するわけではなく、知られたエストロゲンアゴニストとは違うメカニズムでエストロゲン受容体と相互作用している可能性が示唆された (Gould et al., 1998)。

II - b) in vivo 試験

まず、一般毒性に関しては、米国の EPA の IRIS(Integrated Risk Information System)プログラムにおいて 1993 年に評価がなされており、NTP(National Toxicology Program) (1982)の報告に基づき、ラットへの 103 週間の混餌投与試験における 1000

ppm (50 mg/kg/day に相当) 群での体重増加抑制を LOAEL と位置づけた。同じ報告の中で、マウスに対しては 5000 ppm 群での体重抑制の他に、1000 ppm 以上で肝臓に多核巨細胞の増加が認められているが、この作用は adverse なものとみなされず、1000 ppm (130 mg/kg/day に相当) は、NOAEL と判定された。従って、ラットにおける LOAEL 値をもとに、種差と個体差および LOAEL であること考慮した不確実係数にそれぞれ 10 を適用し、総合的な不確実係数 1000 で割った値:50 μ g/kg/day をヒトの経口摂取に対する RfD(Reference Dose) として設定している。

発がん性に対する検索もこれらの試験で行われており、ラットにおいて、対照群に比較して白血病と間質細胞腫の増加が、マウスにおいて白血病とリンパ腫の合計の増加が観察されている。しかし、白血病およびリンパ腫に関しては、ラットの雄において用量依存性の傾向検定でのみ有意差が認められただけで、これ以外の増加に対して行われた検定では、統計学的有意差は認められていない。また、間質細胞腫も対照群に対しては低用量と高用量群に対して有意な統計学的増加が観察されているが、この病変は使用されたラットの系統 (F344) で通常高頻度で認められる病変であり、bisphenol A の投与によるものとは判定できないと考えられている。以上のことから、NTP(1982)の報告書では、この試験では bisphenol A の発がん性を証拠づける知見はないとしている。一方、EPA の IRIS プログラム上では発がん性に関する評価はまだ終了していない。

また、NTP(1982)では 90 日間の亜慢性試験もラットとマウスに対して行われており、

濃度設定は異なるが、上記の慢性試験と同様の結果を得ている。さらに、イヌに対する 90 日間試験 (EPA, 1984) では、最高用量 (9000 ppm) 群での肝臓重量の増加のみが認められている。また、古川ら (1994) によりマウスへの混餌投与による 13 週間の亜慢性毒性試験が行われているが、肝毒性を根拠に NOAEL は 0.5% (1~1.3 g/kg/day) であった。このとき 2%以上で精巣と卵巣の重量低下が観察されている。

生殖・発生毒性に関しては、NTP の一連の試験の中で器官形成期のラット (160~640 mg/kg) およびマウス (500~1250 mg/kg) に経口投与した実験で、母動物に対する体重増加抑制や致死率の増加 (マウス) が認められたものの、催奇形性は認められなかった (Morrissey et al., 1987)。また、同様の母動物に対する影響が、より高用量 (600~1000 mg/kg) をラットの器官形成期に経口投与した試験で認められたが、NTP の結果と同様に催奇形性は認められなかった (高仲ら、1991)。さらに、2 世代にわたるマウスの連続混餌投与による繁殖試験では、2 世代目の 0.25%群 (約 300 mg/kg/day に相当) で、副睪丸および精嚢重量の減少が認められた (Reel et al., 1985, 1997)。

一方、bisphenol A のエストロゲン作用の最初の報告は、子宮摘出ラットに全部で 100 mg を 1 日 2 回、3 日間皮下投与 (170 mg/kg/day に相当) したときに持続性発情期が引き起こされたというものである (Dodds and Lawson, 1936)。このエストロゲン様作用に関連し、近年相次いで uterotrophic アッセイによる報告がなされ、未成熟雌マウスを用いた系では、0.05~5 mg/mouse (3~330 mg/kg/day) で 3 日

間皮下投与した結果、uterotrophic 作用は検出できなかった (Coldham et al., 1997)。しかし、未成熟雌ラットを用いた系では、400~800 mg/kg/day の用量で 3 日間皮下および経口投与した結果、子宮重量の増加が確認された。膈開口は、600 mg/kg/day 以上の高用量でのみ認められた (Ashby and Tinwell, 1998)。また、未成熟雌ラットを用いた別の実験では、5~150 mg/kg/day の用量で 3 日間経口投与した結果、子宮重量の増加は 150 mg/kg でも認められなかったが、エストロゲン作用の別の指標である peroxidase 活性とプロゲステロン受容体発現量の誘導が 5 mg/kg/day から認められていた。しかし、エストラジオールと併用投与においてはエストラジオールによる子宮重量増加には影響を与えないが、peroxidase 活性とプロゲステロン受容体発現量の誘導に対しては抑制作用を示すことが観察された (Gould et al., 1998)。

また、子宮への影響とは別に、前述の Reel ら (1985) の雄性生殖期への影響の報告も内分泌かく乱作用として位置付けらる。特に、近年 vom Saal ら (1998) の報告によれば、マウスの器官形成期に 20 μ g/kg/day という、これまで行われてきた mg/kg オーダの実験に比べてかなり低い量を投与した実験で、次世代で精子数の減少が報告された。用量依存性は明らかではないが、このことが、以下に述べる in vitro での低用量でのエストロゲン作用の報告と同調して、低用量域でのみホルモンかく乱作用を発現し、高用量域では発現しないと言う「低用量仮説 (Low-Dose Hypothesis)」を生み出した。しかし、これに対して、最近、bisphenol A 関連工業界などの団体が共同でスポンサーとなり、vom

Saal ら(1998)のグループの追試験を行ったが、再現性は確認されなかつと発表した(Cagenn et al., 1998)。この実験結果はまだ、学会発表の段階で、正式な文書はまだ公表されていないが、投与量は、vom Saal ら(1998)の2 および 20 $\mu\text{g/kg/day}$ に対し、0.2 から 200 $\mu\text{g/kg/day}$ と範囲を前後に1桁増やしたうえで、1群あたりの動物数を4倍、検査項目も追加して行った結果、前立腺や精巣にまったく異常を認めなかったというものであった。この論争に対しては、雄性生殖期への bisphenol A の影響が、エストロゲン受容体を介するものであるかも含めて、特に、作用メカニズムに関して、更なる研究が必要であると考えられる。したがって、現時点で、これらの実験結果の不一致を説明し、bisphenol A の影響であるかどうかを評価することは不可能であると思われる。

以上の結果をもとに、bisphenol A の安全性を評価するわけであるが、in vivo 試験の結果から、問題の vom Saal ら(1998)の報告を除けば、やはり IRIS プログラムで評価されたとおり、50 mg/kg/day が LOAEL と考えられる。しかし、これとは別に、内分泌かく乱作用を評価する観点から、Gould ら(1998)の報告を取り上げる必要があると考えられる。この実験では、最高用量の 150 mg/kg/day の用量でも子宮重量には影響は認められていないが、5 mg/kg/day の用量からエストロゲン作用の指標である peroxidase 活性とプロゲステロン受容体の誘導が認められており、この作用を内分泌かく乱物質としての adverse な影響であるかどうかの判定については、更なる研究が必要であると考えられる。内分泌かく乱作用に対する安全性を確保するためには、この値を

LOAEL とする必要があるかもしれない。これらの影響における作用機序は比較的明らかであると予想されるので、この場合の動物種差に対する不確実係数については、生体内代謝および動態を考慮した係数を取り入れることが可能であり、更なる情報の蓄積により、より客観的なヒトに対する許容量を算定できるものと考えられる。これ以降の評価に関しては、最終年度に検討する予定である。

また、vom Saal ら(1998)の報告で示された2~20 $\mu\text{g/kg/day}$ という用量は、NOAEL または LOAEL としてはその他の報告より1000倍以上も低い値で、この値から、ヒトへの許容値を通常の評価法で算定すると、 ng/kg/day レベルとなる。詳細な暴露データは、現在いろいろな機関で測定中あるいは、部分的に公表されている状況であるが、数 ppb より高い値としては、100ppb 近くの濃度が食料品や環境水中(高尾ら、1998)から検出されたことに加え、ヒト臍帯中においても数 $\mu\text{g/kg tissue}$ の検出例も報告されており(高田ら、1998)、 ng/kg/day レベルの許容値では、すでに現実のヒトでの暴露量の方が上回っている可能性がある。現時点では、vom Saal ら(1998)の報告を無視するわけにはいかいと考えられ、前述した作用メカニズムの問題も含めて早急に解決すべき必要があると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Van den Berg, M., Birnbaum, L., Bosveld, A.T.C., Brunstrom, B., Cook, P., Feeley, M., Giesy, J.P., Hanberg, A., Hasegawa, R., Kennedy, S.W., Kubiak, T., Larsen, J.C., van Leeuwen, F.X.R., Liem, A.K.D.,

Nolt, C., Peterson, R.E., Poellinger, L., Safe, S., Schrenk, D., Tillitt, D., Tysklind, M., Younes, M., Warn, F. and Zacharewski, T. Toxic Equivalency Factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for Humans and Wildlife (1998), Environ. Health Perspect. 106: 775-792.

広瀬明彦, 長谷川隆一, 黒川雄二, ダイオキシン類の生体毒性 (1998) J. Toxicol. Sci. 23: 93-106.