

見たリスク評価における不確実性の事例研究

(1) 分担 西川 秋佳

論文名

Lee, PC, Disruption of male reproductive tract development by administration of the xenoestrogen, nonylphenol, to male newborn rats. *Endocrine* 9: 105-111, 1998.

論文の要旨

雄ラットの新生児に nonylphenol (NP) を投与した結果、精巢、精巢上体、精嚢腺および前立腺腹葉の大きさが減少し、潜伏辜丸の発生頻度が増加した。31日齢で調べた結果、潜伏辜丸の頻度は溶媒対照群で0%であったのに対して、投与群では60.7%であった。NPの影響は用量依存性にみられた。これらの影響は、一日当たり0.8 mg/kg以上の15日間にわたるNPの投与の場合にのみ認められた。新生時期の雄性生殖器の発生過程において、NPによって障害を受けやすい重要な時期が存在した。すなわち、変化はNPが13日齢よりも前に投与された場合に観察され、13日齢以降の投与では観察されなかった。エストロジェンレセプターに特異的なアンタゴニストであるICI182,780の同時投与が精巢および雄副生殖器におけるNPの影響を阻止したことから、NPはエストロジェンレセプターを

介して雄性生殖組織に作用することが判明した。新生時期にNPを投与した雄ラットは、若い受胎可能な雌を妊娠させる能力を大幅に減少させた。我々の成績は、新生児雄ラットへのNPの曝露が生殖器の発生を潜在的に障害し、結果として生殖活動に影響することを示唆する。

この論文におけるデータの不確実性要因

1. いくつかの実験が組み合わされているが、動物数が明確にされていないものがある。明記されている場合でも動物数は多くない。
2. 新生児期投与の場合に共通して問題となることの一つに母体間のばらつきがあるが、それをどのように調整したか明らかでない。
3. 要旨に記載されている潜伏辜丸の頻度が本文と若干異なる。
4. 新生児曝露であるから、乳汁を通しての経口摂取が想定されるが、投与経路として腹腔内投与が用いられている。
5. メカニズムとして、エストロジェンレセプターを介する可能性が示唆されたが、考察にも触れられているように他の成長因子およびそのレセプターを介する機序をこの実験からは除外できない。

(2) 分担 三森 国敏

論文名

Chapin R.E. et al.: The effects of 4-nonylphenol in rats: A multigeneration reproduction study. Toxicological Sciences 52: 80~91 (1999)

緒言

界面活性剤として広く使用されている alkylphenol ethoxylates の約 80% を占める nonylphenol ethoxylate (NPE) は、使用後に排液処理の段階で加水分解され、nonylphenol (NP) になる。NP が河川に流出すると汚泥中に移行し、川底で濃縮していく。NP は in vitro 試験でエストロゲン依存性の MCF-7 細胞の増殖を刺激したり、培養したマスの肝細胞でビテロゲニン産生を刺激するなどの弱いエストロゲン作用を示すことが報告されている。しかし、これに関する哺乳動物での長期投与試験成績はほとんど報告されていない。

方法

エストロゲン作用物質は、胎仔の発達および生後発育期間中に曝露されることにより

最も強力に作用することが知られていることから、今回、NP を SD ラットに 4 世代にわたり 200、650、2000ppm の濃度で混餌投与し、生殖器発達および生殖能への影響についてその種類および程度を検討した。

結果

NP の実質投与量は、低 (200ppm)、中 (650ppm) および高用量 (2000ppm) でそれぞれ 9~35、30~100 および 100~350 mg/kg/日の範囲にあった。曝露量は若いラットの方が多かった。剖検は成熟ラット (F₀、F₁、F₂) および生後 21 日齢ラット (F₁、F₂、F₃) について行った。最も高齢の F₃ ラットは生後 55~58 日齢で屠殺した。表 1 に実験結果の概要が示されている。体重増加が全世代の 650 または 2000ppm 群で 8~10% 抑制された。性周期の延長が F₁、F₂ 世代の 2000ppm 群で認められたが、F₃ 世代には異常はみられなかった。膣開口の早期化が F₁、F₂、F₃ 世代において認められ、650ppm 群で約 2 日および 2000ppm 群で約 6 日短縮した。F₁ 雌で生後 21 日目の子宮重量が 650ppm 群 (14%) および 2000ppm 群 (50%) で増加

したが、その他の世代では増加しなかった。精巣下降、肛門生殖器突起間距離および包皮開裂については、一貫した変化は認められなかった。出生児の数、体重および生存性、母体パラメーターあるいは他の生殖機能についても異常は認められなかった。F₂母体の卵巣相対重量が650および2000ppm群で12%減少したが、その他の世代では変化は認められなかった。F₂母体の卵胞数に異常はみられなかった。F₀、F₁雄でビデオ測定（CASA）による精子運動性などの精子指数に異常は認められなかったが、F₂雄では精巣上体の精子密度が650および2000ppm群でそれぞれ8および13%減少した。さらに、F₂雄では精巣の精子細胞数が2000ppm群で13%減少したが、精巣および精巣上体重量に変化は認められなかった。胃および十二指腸粘膜において肉眼的および組織学的にびらんは認められなかった。腎相対重量がF₀、F₁、F₂雄の650および

2000ppm群で増加し、組織学的に髄質部の尿細管拡張、嚢胞形成、皮髄境界部の鉍質沈着が雄の全世代の全投薬群で認められた。

考察

NPは腎毒性を随伴して650ppm以上で生殖器に限定した影響を誘発すると結論される。F₂動物での精子形成への影響は、統計学的あるいは生物学的ノイズによるものか、あるいは現時点では不明な薬物動態または毒性学的体内動態のいずれかによるものと考えられる。今回の精子データについては、再現性が確認されるまで慎重に評価されるべきである。生殖器に対するNPの無毒性量は200ppmと推定される。

不確実性要因の指摘

1) F₂雄ラット650および2000ppm群における精巣上体精子密度の減少が投与に起因するものか否か結論できない。

論文名

Peters J. M. et al.: Amelioration of TCDD-induced teratogenesis in aryl hydrocarbon receptor (AhR)-null mice. *Toxicol. Sci.* 47: 86-92 (1999)

緒言

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin

(TCDD) は P450 や第二相酵素などの薬物代謝酵素をコードする遺伝子の転写活性化を引き起こすことが知られており、これらの遺伝子発現が aryl hydrocarbon receptor (AhR) への TCDD の結合によって誘発されるとの報告がある。

発生における AhR の役割はいまだ明らかではないが、AhR は胚発生の初期に必要なことを示唆する証拠がある。すなわち着床前のマウス胚は 8 細胞期から胚盤胞期まで AhR の mRNA を発現し、アンチセンスオリゴヌクレオチドが分化や増殖を抑制する。また、AhR を欠損したマウスを用いた研究においては、胎仔の生存率に影響が認められなかったとの報告もあるが、逆に生存率が低下するとの報告もある。

一方、TCDD は胎仔期に投与した場合、発生毒性および催奇形性を示す。TCDD に暴露されたマウスに発現する奇形は口蓋裂や水腎症などの尿路の異常であるが、これらが AhR を介した変化によって発現するか否かは明らかでない。今回、野生型マウスおよび AhR-null マウスを用いて、胎仔期における AhR の役割を検討するとともに、TCDD による催奇形性に AhR が関与するか否かを検討した。

方法

C57BL/6N および Sv/129 の交配で得た AhR (+/-) マウスを兄妹交配して第 4 代の野生型 (+/+) および AhR-null (-/-) マウスを用いた。野生型の雌雄同士および AhR-null の雌雄同士をそれぞれ交配し、妊娠 10 日目に母動物にコーン油 (対照群) またはコーン油に溶解した TCDD 25 µg/kg を経口投与した。投与量は 5 mL/kg とした。この投与量により C57BL/6N マウスにおいて水腎症および口蓋裂が高頻度に誘発されることが知られている。妊娠 18 日目に解剖し、生存胎仔数、死亡胎仔数および吸収胚数を記録した。生存胎仔について体重を測定し、内臓検査および骨格検査を行った。

結果

TCDD 投与 AhR-null マウスの妊娠 0-18 日の間の母動物体重の増加量が低かった。しかし、子宮を除いた体重増加量は TCDD 投与野生型マウスと同等であることから、母体に対する毒性ではなく発生毒性が示唆された。TCDD に暴露された AhR-null マウスにおいて、吸収胚率が増加した (表 2)。ただし、平均生存胎仔数は、TCDD 投与 AhR-null マウスにおいて TCDD 投与野生型マウスに比べて低かったものの統計学的に有意ではなかった。対照群の AhR-null マウスでは、対照群の野生型マウスに比べて大きいタイプの interfrontal bone が少なかった。なお、interfrontal bone とは、多くのマウスの系統にはみられないが、今回用いたマウスでは種々の大きさのものを合わせると 80% 以上の高頻度で認められる所見である。TCDD 投与野生型マウスでは、TCDD 投与 AhR-null マウスに比べて、尿管および腎盂の拡張の程度が強くなり、水腎

症、尿管の歪曲、腎盂の拡張、腎臓の小型化および口蓋裂の発生率が高かった(表3)。

考察

対照群の AhR-null マウスでは対照群の野生型マウスに比べて、大きい interfrontal bone の頻度が少なかったのみで、他の項目に差が認められなかったことから、AhR 欠損は発生に影響を与えなかったと考えられた。他の遺伝子が補足的に働いた可能性がある。

TCDD 投与 AhR-null マウスにおいて、TCDD 投与野生型マウスに比べて、催奇形性がわずかしか認められなかったことから、TCDD の催奇形性には AhR が関与するものと考えられた。発生途上の口蓋および尿路の上皮細胞における TGF α 、TGF β および EGF の発現を TCDD が減少させたとの報告があることから、TCDD 誘発口蓋裂および尿路発生の異常には成長因子の発現の変動が関与すると考えられる。TGF β 3-null マウスにおいて発生した口蓋は、正常マウスの胎仔期に TCDD を投与した場合の口蓋と、組織学的に同様であったとの報告から、口蓋形成に AhR および TGF β を経る signalling pathway が関与すると考えられる。TCDD 投与 AhR-null マウスにおいて吸収胚率が増加したことにより、口蓋および尿路の異常が部分的にマスクされた可能性があるものの、胎仔期における死亡率がそれほど高くないことから同マウスにおけるこれらの異常の減少は明らかであると考えられる。

TCDD 投与 AhR-null マウスにおいて口蓋裂が少ないながらも発生したことは、AhR を必要としないメカニズムもまた

TCDD の催奇形性に関与する可能性を示唆するものであった。ただし、他の AhR-null マウスを用いた実験において TCDD は口蓋裂発生に影響を及ぼさなかったとの報告もある。この結果の違いは、用いた動物の遺伝的な差異や AhR 遺伝子のターゲティング方法の違いによる可能性もあるが明らかではない。

TCDD 投与 AhR-null マウスで TCDD 投与野生型マウスに比べて吸収胚率が高かったことから、TCDD のこの作用には AhR を必要としないメカニズムが関与する可能性が示唆される。なお、野生型マウスにおいては TCDD 投与によって吸収胚率が増加しなかったことから、AhR 欠損によってこの作用が増強されると考えられる。さらに、TCDD 投与 AhR-null マウスの平均胎仔体重が低かったことから、これも AhR を必要としない反応と考えられた。

不確実性要因の指摘

- 1) AhR が成長因子の発現を制御するか否かが今回の実験では直接確認されていないことから、TCDD の催奇形性に対する AhR 関与の詳細なメカニズムが明らかでない。
- 2) TCDD 投与 AhR-null マウスにおいて少ないながらも口蓋裂が発現したことから、TCDD の催奇形性に AhR を必要としないメカニズムも関与する可能性があるが、これを明らかにするためにはさらに研究が必要である。
- 3) TCDD 投与 AhR-null マウスで増加した吸収胚率の発現にも、AhR を必要としない作用が推察されるが、そのメカニズムが明らかではない。

(4) 分担 今井 清

論文名

Male Reproductive System Ontogeny: Effects of Perinatal Exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin

Richard E. Peterson, Robert W. Moore, Thomas A. Mabley, Donald L. Bjerke and Robert W. Goy, J. Clean Technol., Environ. Toxicol., & Occup. Med., 7(No. 1), 89-105 (1998)

実験プロトール

投与回数: 妊娠第 15 日から出産までは下記の用量の TCDD を母体に投与し、胎児へ経胎盤的に暴露し、引き続いて出産後哺乳第 1 日から 21 日まで同用量の TCDD 投与した母体の乳汁を介して新生児期に暴露・投与経路及び投与量: 0.064, 0.16, 0.40, あるいは 1.0 μ g/kg 経口投与
観察項目: 雄生殖器の発達と性行動
および生殖能力の察

実験結果

- 1) TCDD 投与により F1 の肛門生殖器間距離、血漿中 testosterone, 5 α -dihydro-testosterone, LH, 精囊重量、前立腺重量の減少、精巣下降の遅延が認められた(Table I)。
- 2) TCDD 投与により F1 の精巣重量、精巣上体、精巣上体当たりの精子数、1 日当たりの精子産生量、精細管の直径の減少が認められた (Table II)。
- 3) 騎乗潜伏期間、陰茎挿入潜伏期間、射精潜伏期間、騎乗回数、陰茎挿入回数、

交尾再開期間の増加と雌性性行動の特徴である腰部屈曲行動の増加、progesterone 投与による LH 分泌の増加、交尾率の減少が認められた (Table III)。

人に対する影響についての考察

- 1) ラットでは、受精に必要な精子数の 10 倍量の精子が産生・放出されているが、人では受精に必要な精子数と正常な成人男子の精子産生量が接近しているため、TCDD により僅かに精子数が減少しても生殖機能に対する影響は大である。
- 2) 人の場合、性行動に関する男女差は、社会的要因に左右されるところが大であるが、胎児期でのアンドロゲン作用は性の発達分化に影響があり、homosexual な男性は視床下部の構造が女性化しているとの報告もある。ラットの実験では、胎児期の後半から新生時期の前半に雄ラットにエストロゲンを投与すると視床下部の性分化に関連した神経核が雌化することが明らかにされていることから、周産期の TCDD に暴露されると性分化に影響を及ぼす可能性を有している。

人に対する評価の不確実性に関する問題点

- 1) TCDD の胎児あるいは乳汁を介した新生児への移行は、母体内への移行率に比較すると低率である (参考文献: Table 1 は胎児への移行率、Table 2 は乳汁を介した新生児への移行率) にもかかわらず、成体に対する無毒性量以下の量を母体に投与しても、雄生殖機

能に影響を及ぼすことから、胎児あるいは新生児では、TCDD に対してより高い感受性を示すことが示唆される。しかし、この報告では、TCDD の無毒性量が求められておらず、人の胎児あるいは新生児における TCDD の toxicokinetics に関する研究報告が充分でないことから、人の胎児あるいは新生児への、TCDD の影響を量的に評価することは、現時点では不可能である。

- 2) この報告では、ラット雄の胎児あるいは新生児の生殖系への影響を、すべて Ah-receptor を介した作用であろうと考察しているが、人への外挿を行うためには現時点で評価に値する毒性の発現機序に関する研究が不足していると思われる。
- 3) 人とラットでは、周産期における臓器・組織の発達過程が必ずしも同調していないので、ラットで得られた実験成績を、そのまま人に外挿可能か否か検討が必要である。