

平成 10 年度 分担研究報告書

メトキシクロールとビスフェノール A の実験動物に対する

低用量暴露における毒性発現に関する不確実性についての研究

分担研究者 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 三森 国敏

研究要旨

ディエチルスチルベストロール (DES)、メトキシクロールとビスフェノール A の実験動物に対する低用量暴露における次世代への毒性発現に関する不確実性について情報収集した。その結果、DES の経胎盤投与による次世代マウスへの影響については、 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 投与で次世代に悪影響を及ぼすが、それより下の用量では発現しないことから、DES のような強いエストロゲン作用を有する物質においても閾値の存在が示唆された。methoxychlor の経胎盤投与による次世代ラットへの影響については、投与群すべての次世代動物に生殖器に毒性が発現しており、最低用量の $25 \text{ mg}/\text{kg}$ より下のどの用量まで次世代への影響が発現するかについてはデータがなく、この毒性についての NOAEL は明らかにされていない。Bisphenol A の経胎盤投与による次世代マウスへの影響については、vom Saal らの実験において次世代への影響が非常に低い投与量においても発現すると報告されたが、それについては再現性がないことが確認された。

A. 研究目的

レセプターを介した内分泌攪乱化学物質 (EDC) のエストロゲン作用により毒性が発現した例としては、合成エストロゲンである ethinylestradiol (EE) や diethylstilbestrol (DES) の報告が今までになされている。これらの物質は、エストロゲンのレセプターと結びつき、増殖シグナルを送り、乳腺腫瘍の増加、子宮ガン、異常発生、あるいは次世代に対する胎児生殖器への有害作用などを起こすことが、既に報告されている。通常の生体内に存在する内因性のエストロゲンは性ホルモン結合グロブリンと結合し不活化されるが、合成エストロゲンとエストロゲン作用を有する環境化学物質はそれと結合しないことから、これらの合成エストロゲンは不活化されないため、これらを妊娠動

物に投与すると、胎盤を経由して胎児に影響が発現する。しかし、弱いエストロゲン作用を有する環境化学物質によるこの作用の閾値については、現在あまり明らかにされていない。今年度は、DES、メトキシクロールとビスフェノール A の実験動物に対する低用量暴露における毒性発現に関する不確実性について情報収集した。

B. 研究方法

DES、メトキシクロールとビスフェノール A の実験動物に対する低用量暴露における毒性発現に関する文献を収集し、次世代影響についての影響とその発現閾値について検討した。

C. 研究結果

diethylstilbestrol (DES)経胎盤投与による次世代マウスへの影響：

DES は昔、ヒトの流産防止剤として米国で頻繁に使われており、その使用により、次世代への悪影響が誘発されたことから、現在ヒトにおいては使用されていない。この合成女性ホルモンが次世代マウスにどのような影響を及ぼすかという研究が、1981年 McLachlan らによって行われた。DES を 0.01, 1, 2.5, 5, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で妊娠 9 ~ 16 日のマウスに皮下投与し、生まれてきた子供を大人まで飼育した結果、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の雄では精子の異常、精子数の減少、陰嚢、精巣腫瘍、不妊などが発現したと報告されている。雌においても卵巣腫瘍、膣の腺癌、子宮の腫瘍などが、次世代が成熟した時点で発現したとの記載がある。しかし、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下では、このような、変化は一切発現していなかったと報告されている。

methoxychlor (有機塩素系殺虫剤) の経胎盤投与による次世代ラットへの影響：

農薬の有機塩素系殺虫剤、methoxychlor を経胎盤投与した場合の次世代ラットへの影響は、1989 年に Gray らによって報告されている。methoxychlor を妊娠 15 日目のラットに、体重 1 kg に対し 0, 25, 100, 200 mg/kg の用量で 1 回経口投与し、その生まれてきた子供を養育し、成熟させると、最低用量である 25mg/kg 以上を与えたラットから生まれた子供では、成長の遅延、精巣の小型化、精子数の減少、下垂体重量の減少などが発現し、この実験結果では、NOAEL は算定できない結果が報告されている。しかし、これについては、最大無作用量は 5 mg/kg であるという別の実験があり、その実験結果から一応 ADI が算定されている。

Bisphenol A の経胎盤投与による次世代マウスへの影響：

Bisphenol A の 90 日の反復投与毒性試験として、投与量を 2,000ppm ~ 40,000ppm としたマウスの混餌投与実験が報告されている。2 % (20,000ppm) 群では、肝細胞の障害あるいは骨線維症のようなエストロゲンに關与する毒性変化が発現し、2 %以上の投与群においても同じような変化が誘発されたと報告されている。発がん性試験のデータとして、ラットで 1,000ppm と 2,000ppm、マウスでは 1,000ppm と、5,000ppm の濃度で混餌投与した実験がなされており、ラットやマウスに 1,000ppm 以上を投与しても発がん性はみられないことが報告されている。繁殖毒性試験については、用量を 100 ppm ~ 9,000ppm と設定した実験があり、胎児毒性はマウスの 9,000ppm 群にのみ発現したという実験結果から、繁殖毒性はなく、無毒性量 (NOAEL) は 1,000ppm と判定されている。

しかし、1998 年に vom Saal らは、妊娠 11 ~ 17 日目のマウスにビスフェノール A の 1,000ppm のさらに、1 万分の一ないし 10 万分の一の用量である 0.02 あるいは 0.002ppm を投与したところ、0.02ppm において精子形成が低減したと報告している(vom Saal et al. 1998)。これは、今までの 1,000ppm より低い用量では毒性は発現しないと考えられていたが、この 1 万分の一の用量においても次世代に影響が発現することを示すものであり、今までの常識を覆すものとして注目を

あびた。しかし、この 0.02ppm より上の用量で、同じ様な変化が生ずるかどうかについては実験されていないため、この変化が再現性のあるものか否かについての追加実験がなされた。その実験では、投与用量として、0.02 あるいは 0.002ppm 以外に 0.2ppm と 0.0002ppm が追加され、vom Saal らと同様の実験プロトコールで実験を行ったところ、精子の生産量に群間で差はなく、vom Saal らの成績は再現性がないとの発表がつい最近なされた (Endocrine/Estrogen

Letter)。

D. 考察

EDCs の反応様式には、必ずしも直線的な用量反応関係が見られないことが報告されている。たとえば、胎生 13 日に 0, 0.002, 0.02, 0.2, 2, 20, ないし 200 ng/g 体重の DES を雄マウスに投与し、生後 8 ヶ月まで飼育したところ、200 ng/g 群では対照群に比し前立腺重量は有意に減少したが、0.2 ng/g 群では逆に有意に増加したとの成績が報告され (vom Saal ら、1997)、EDCs においては、いわゆる逆 U 字型反応曲線をとることが指摘されている。このことを見出した vom Saal は、0, 2, ないし 20ng/g 体重のビスフェノール A を妊娠 11 から 17 日のマウスに投与し、生後 6 ヶ月まで飼育した雄マウスにおいて 20ng/g 群において精子産生数が減少するような高用量での逆転現象を観察している (vom Saal ら、1998)。こうした現象の背景には、受容体のインターナリゼーションのような一連の受容体原性反応や、各種受容体に対する同一化学物質の重複した反応が生ずることにより、高用量反応から低用量反応への予測が困難になっているとの推察がなされている。これは、従来の毒性反応が直線性であるとの概念を覆すものであり、vom Saal らの実験で得られた逆 U 字パターンの用量反応関係の真偽については現在のところ明らかにされていない。

DES は生理的に女性が持っているエストロゲンの 2 ~ 3 倍強い作用を持っていることが分かっている。DES の経胎盤投与による次世代マウスへの影響については、100 μ g/kg 投与で次世代に悪影響を及ぼすが、それより下の用量では発現しないことから、DES のような強いエストロゲン作用を有する物質においても閾値の存在が示唆される。これは、弱いエストロゲン作用を有する環境内分泌攪乱化学物質においてその有害作用に閾値がないとする考え方とは全く

正反対の結果であり、その真偽については今後の研究が強く望まれる。

methoxychlor の経胎盤投与による次世代ラットへの影響については、投与群すべての次世代動物に生殖器に毒性が発現しており、最低用量の 25 mg/kg より下のどの用量まで次世代への影響が発現するかについては現在のところ不明である。その閾値を求めるためのさらに低用量の追加実験が必要である。

Bisphenol A の経胎盤投与による次世代マウスへの影響については、vom Saal らの実験において次世代への影響が非常に低い投与量においても発現すると報告されたが、それについては再現性がないことが確認され、これは、弱いエストロゲン作用を有する環境内分泌攪乱化学物質においてその有害作用に閾値がないとする考え方をさらに反駁するものと考えられる。

E. 結論

以上のように、低用量暴露では次世代に明確な作用は及ぼさないものと今まで考えられてきたが、その推論を覆す実験データもあり、EDC の低用量暴露で毒性変化が誘発されるか否かについては、今後種々の内分泌攪乱作用がある化学物質を用いた追加実験が必要である。近年エストロゲン作用を検出するための *in vitro* 試験が開発されているが、国際的なガイドラインとしては制定されていない。この *in vitro* 試験を用いると微量投与でもエストロゲン作用が検出されるが、従来の *in vivo* 試験では毒性を検出できないというギャップがあることは事実であり、このギャップを埋めていく研究が今後不可欠である。

引用文献：

Endocrine/Estrogen Letter: Study finds no effects

from exposure to low doses of bisphenol A. Vol. 4, No. 20, pp. 1-5. 1998.

Gray LE et al.: A dose-response analysis of methoxychlor-induced alterations of reproductive development and function in the rat. Fundam. Appl. Toxicol. 12: 92-108. 1989.

McLachlan JA: Rodent models for perinatal exposure to diethylstilbestrol and their relation to human disease in the male. In: Developmental Effects of Diethylstilbestrol in Pregnancy. Ed. by Herbst AL and Bern HA. Thieme-Stratton, New York, 1981.

vom Saal F.S. et al.: Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 2056-2061. 1997.

vom Saal F.S. et al.: A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. Toxicol. Ind. Health 14: 239-260. 1998.

F. 研究発表

1. 論文発表

三森国敏. 内分泌攪乱作用物質の毒性

日本農薬学会誌 24: 93-94. 1999

2. 学会発表

三森国敏. 内分泌攪乱作用物質の毒性

内分泌攪乱物質と農薬に関するシンポジウム

1998