

畜水産食品中残留ホルモンの ヒト健康に及ぼす影響に関する研究

主任研究者 林 裕造 (北里大学)

平成11年度厚生科学研究費補助金
厚生科学特別研究事業の事業実績報告書

- | | | |
|-------|--------|------------------|
| 分担研究者 | 菅野 純 | (国立医薬品食品衛生研究所) |
| // | 藤森 観之助 | (国立医薬品食品衛生研究所) |
| // | 三森 国敏 | (国立医薬品食品衛生研究所) |
| // | 渡邊 昌 | (東京農業大学) |
| 協力研究者 | 伊藤 明弘 | (広島大学原爆放射能医学研究所) |
| // | 佐藤 章夫 | (山梨医科大学) |
| // | 鈴木 隆 | (国立医薬品食品衛生研究所) |
| // | 寺本 昭二 | ((財)残留農薬研究所) |
| // | 林 真 | (国立医薬品食品衛生研究所) |
| // | 宮崎 奉之 | (東京都立衛生研究所) |
| // | 若林 敬二 | (国立がんセンター) |
| // | 渡辺 民朗 | (岩手県立大学) |



厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）
総括研究報告書

畜水産食品中残留ホルモンのヒト健康に及ぼす影響に関する研究

林 裕造 北里大学客員教授

研究要旨

科学的知見と論文を基礎に家畜の肥育促進を目的とするエストラジオール-17βの使用を慎重に検討し、結論的に、この問題についてのCODEX委員会の結論に準じて、家畜における適正使用規範に従って使用するという原則が厳守されるという条件で、家畜へのエストラジオール-17βの使用はヒトに対する健康リスクを増加する要因にはならないという立場を取る方が妥当と結論を得た。

分担研究者

三森 国敏
(国立医薬品食品衛生研究所病理部)
菅野 純
(国立医薬品食品衛生研究所毒性部)
渡辺 昌
(東京農業大学)
藤森 観之助
(国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学)

A. 研究目的

エストラジオール等の天然型性ホルモン剤は、50年来、米国及びオーストラリアにおいて牛などの家畜に肥育促進の目的で使用されている。1981年にFAO/WHO合同食品添加物専門家委員会(JECFA)は第25回会合において食肉生産でのホルモン剤使用について論議し、食肉生産の目的に沿って適切な使用が行われている限り、食肉の摂取を通じて体内に取り込まれるエストラジオール-17βによる健康への懸念はないと報告している。この結論は適切な規範に従ってエストラジオール-17βを投与した家畜の肉の摂取によって取り込まれるエストラジオール-17βの量が人体内において生産されるエストラジオール-17βの量に比べてはるかに低いという知見に基づいている。

次いでJECFAは1988年の第32回会合において肥育促進に用いられる3種のステロイド剤、エストラジオール-17β、プロゲステロン及びテストステロンについて安全性評価を実施し、これらのステロイド剤はいずれも家畜における適

正使用規範(Good Animal Husbandary Practice)に従って用いられる限り、家畜に投与されたものが食肉を通じて人体に対する健康影響はないと判断された。この判断に加えて、肥育促進の目的で投与されたこれらホルモン剤の家畜体内における残留レベルを測定することが困難なことに配慮して、JECFA委員会ではエストラジオール-17β、プロゲステロン及びテストステロンにADIとMRLを設定する必要性はないとの結論を下した。

第32回のJECFA会合では、更に、異種性成長促進物質(Xenobiotic growth promoters)としてトレンボロンアセテート(TBA)とゼラノールについての評価を実施し、TBAに0-0.01μg/kg体重/dayの暫定ADI、ゼラノールに0-0.5μg/kg体重/dayのADIを設定している。一方、ヨーロッパ各国では従来より家畜の肥育促進にホルモン剤は使用されていなかったが、1989年1月にECはホルモン活性をもつ薬剤を肥育促進の目的で家畜に投与することを禁止した。その結果、エストラジオール-17β、プロゲステロン、テストステロン、TBA、ゼラノール、メレンゲステロールは家畜に投与することも、更にはそれらの薬剤を投与された家畜の肉を第三国から輸入することも禁止された。

禁止の理由は、ECが衛生上の規制措置として肥育促進の目的に使用したホルモン剤の食肉中あるいは食肉製品の残留による人の健康に及ぼすリスクの許容範囲を0もしくは0加算としたためである。

1995年1月に衛生植物検疫措置の適用に関する協定(SPS協定)及び世界貿

易機関 (WTO) の関連協定が発効の段階になり、ECによる禁止措置はEU・米国間における深刻な貿易問題となった。

国際的には、食品の国際規格を設定しているFAO/WHO合同食品企画委員会 (CODEX委員会) は1996年にJECFA勧告に沿って家畜の肥育促進を目的としたホルモン剤の使用を認め、天然型ホルモン (エストラジオール-17β、プロゲステロン、テストステロン) についてはADI及びMRLを設定不要とした。

JECFAは1999年2月の第52回会合において新しい科学的情報に基づいて、エストラジオール-17β、プロゲステロン及びテストステロンについて再評価を行ない、これらホルモンの畜産食品中に含まれる量が著しく低いことから、これらの食品の摂取による人の健康リスクはほとんどない事を再確認した。その際、ADIは人での臨床用量をもとに設定され (エストラジオール-17β: 0.05 μg/kg体重/day、プロゲステロン: 30 μg/kg体重/day、テストステロン: 2 μg/kg体重/day)、食肉中の残留は多い例でもADIの数%程度にとどまり、安全域が広いことから、家畜への投与が適切使用規範に準じて実施されるという条件でMRLは設定不要とされた。

JECFAの再評価と並行してEUでは公衆衛生問題に関する獣医学対策科学委員会 (SCVPH) が1999年4月に会議を開催し、エストラジオール-17β、プロゲステロン等6種のホルモン剤の安全性について発がん性、遺伝毒性、生殖発生毒性、神経毒性、免疫毒性等の観点から検討し、結論として、これらホルモン剤を使用した家畜の食肉には安全性に問題があり、ADIは設定できないと述べ、特にエストラジオール-17βについては発がんリスクが示唆されたとしている。

SCVPHの報告書は国際的に大きな関心を招いたが、特にカナダでは農林水産大臣がSCVPHの見解とその報告に引用されているデータの解釈についての調査を家畜製品委員会 (VPC) の分科会に依頼した。

VPC分科会はSCVPHの報告書を慎重に調査し、この報告書が問題を広汎に扱ってはいるものの、すべての分野について十分な包括的議論を進めている訳ではなく、特定の選ばれた事項について結論を導びいている点を指摘している。VPC分科会は、更に、ホルモン剤を投与した家畜の食肉の摂取によるリスクが従来考

えられていたよりも高いというSCVPHの結論を支持する科学的根拠はないと述べている。

家畜の肥育促進を目的とするホルモン剤使用についての議論は、CODEX委員会等において更に続けられると予想されるが、一方、この問題が科学的立場での議論の対象ではないとする意見もある。

我が国ではこの問題についてCODEX委員会に準じた対応がとられているが、同時に、牛肉中の天然ホルモンの残留実態調査が厚生科学研究により進められており、平成10年度の厚生科学研究の報告では国産牛肉60検体、輸入牛肉 (米国産、オーストラリア産) 40検体についての天然ホルモンの残留値はいずれも生理変動範囲におさまっているとされている。

従って、我が国における国産及び輸入牛肉中の天然ホルモンによる健康影響については現実的な問題はないと思われるが、米国等からの畜産食品の輸入量が多い現状を考えると、我が国が独自に畜産食品を介するホルモン摂取によるヒト健康への影響を科学的に評価することは、畜産食品の安全性を確保し、且つ、消費者の不安を解消するための必要な対応とみなされる。

B. 研究方法

本研究は家畜の肥育促進を目的としたホルモン剤の使用に関するCODEX委員会とEU科学委員会による議論についてその論点を整理し、議論の根拠となっている科学的知見を再検討して畜産食品中に残留するホルモン剤の摂取によるヒト健康への影響を評価する目的で実施された。研究方法は以下の通りである。

1) 家畜の肥育促進を目的とするホルモン剤として、現在、エストラジオール-17β、プロゲステロン、テストステロン、TBA、ゼラノール及びメレンゲステロールが使用されているが、本研究ではそれらの中で既存の知見が最も多く、且つヒトへの健康影響について特に重視されているエストラジオール-17βを調査対象とした。

2) エストラジオール-17βによるヒト健康への影響については、発がん性、生殖・発生毒性及び遺伝毒性が重視されているため、本研究ではこれら三事項及び毒性発現の背景となっている作用メカニズムならびに体内動態に関する科学的知見を中心に調査を進めた。

3) CODEX委員会とEU科学委員会の間で議論の対象となっているエストラジ

オール-17βの暴露評価に関連して、エストラジオール-17βの家畜食品中の残留量及びその測定法について調査した。

4) 上記事項についての研究・調査は分担研究者ならびに協力研究者がそれぞれの専門性に沿って個別的に実施し、その後、各成果を基礎に全員で本研究の主題である“畜産食品中残留ホルモンのヒト健康に及ぼす影響”について総括的討議を行った。

なお、本研究の全体討論の中で、主題とは多少離れるが、リスクアセスメントの最終段階において考慮すべき問題点として、日本人の食生活あるいは食習慣の特徴ならびに発がんの多要因影響が話題となり、その論点を本報告書の参考資料に添付した。

C. 研究結果

1) エストラジオール-17βの発がん性：エストラジオール-17βの発がん性については、医療目的の使用に伴う乳がん、子宮内膜がん、卵巣がんのリスクの上昇等、ヒトの疫学的データから十分な証拠があり、動物実験においても長期間投与による発がん性陽性の十分な証拠があるとみなされており、この点については国際的な合意が得られている。

一方、エストラジオール-17βの発がんメカニズムについては、代謝物であるカテコールに遺伝子障害性があるとの報告から、E U科学委員会はエストラジオール-17βにはヒトに対して遺伝子障害性を介する発がん性の懸念があるとの見解を述べ、CODEX委員会の結論と対立している。JECFA(1999)では、1987年以降の文献及びヒトでの疫学的知見に基づいて、エストラジオール-17βは遺伝子毒性の可能性はあるが、ヒト及び実験動物でみられている内分泌関連器官での発がん性はホルモン受容体を介した非遺伝子障害性のメカニズムによるものであるとの結論が提出されている。なお、食肉残留ホルモン濃度の条件でヒトに発がんがみられたとする報告はない。

2) エストラジオール-17βの生殖・発生毒性：エストラジオール-17βの生殖毒性はラットを用いた大規模な一代生殖試験によって検討されている。この試験では、エストラジオール-17βを0、0.05、2.5、10及び50ppmの濃度で飼料に混入しP世代の雌雄ラットに7週齢から開始して10週間投与した後、に交配し、その後F1児を離乳するま

での間妊娠及び哺乳期間を通じてエストラジオール-17βを投与し、F1世代のラットにも親動物と同じ濃度のエストラジオール-17βが離乳後11週間投与されている。その結果、10ppm(0.527～0.691mg/kg/日)以上の用量でP世代の雌雄の動物に摂餌量と食餌効率の低下に伴う体重増加抑制、貧血などの一般毒性的影響と共に明らかな生殖毒性が認められている。一方、最低用量の0.05ppm(0.003mg/kg/日、300ng/kg/日)では、P世代雌のプロゲステロン濃度と雄のテストステロン濃度に対照群と比較して低値がみられているが、下垂体ホルモンには変化がなく、F1世代については、測定したすべてのホルモン濃度が対照群と同じレベルの値を示している。従って、この用量が血中ホルモン濃度の変化を指標した際の無影響量と考えられる。なお、この用量ではP世代の雌雄動物に一般毒性的影響はみられず、生殖能力にも異常はみられていない。

エストラジオール-17βの催奇形性に関する知見として、ラットの一代生殖試験の2.5ppm投与群において、出生時低体重が認められているが、子宮内胚死亡はみられず、奇形の発現や雄の生殖器系の異常(尿道下裂、停滞精巣)もなく、雄の肛門生殖突起間距離も対照群とほぼ同じ値を示している。

以上のデータから、エストラジオール-17βはラットにおいて、性ホルモンと下垂体ホルモンの血中濃度を明らかに変化させる用量で一般毒性影響と共に生殖毒性影響を引き起こすが、血中ホルモン濃度をほとんど変化させない用量では一般毒性的影響はみられず、明らかな生殖毒性を示さないと結論される。

3) エストラジオール-17βの遺伝毒性：多くの試験がなされているが、現状の知見では明確な結論が得られていない面が残されている。In vitro試験系では、微生物を用いる復帰変異試験及び培養細胞を用いるSCE試験はすべて陰性である。ほ乳類培養細胞を用いる遺伝子突然変異試験についても、ほとんどの結果は陰性で、一部の陽性結果を示す報告に関しても判定に疑問が残されている。染色体の数的異常誘発性及び細胞形質転換作用については陽性の結果が得られている。一方、in vivo試験系では、細胞遺伝学的指標に関して判定に疑問を残しつつも陽性とする報告もあるが、げっ歯類を用いる小核試験のように方法的に確立した試験では陰性であった。

今後優先して検討されるべき課題とし

てラジオール-17βの遺伝毒性に関して、極めて低い濃度での *in vitro* 遺伝子突然変異誘発性及び *in vivo* における染色体の数的異常誘発性がある。

4) エストラジオール-17βによるDNA障害：ほ乳類培養細胞を用いた不定期DNA合成試験において、代謝活性化系の非存在下で弱陽性結果の報告があるが、陰性の報告もあるので総合的にみてエストラジオール-17βには強いDNA障害性はないと考えられる。一方、エストラジオール-17β (E2) は代謝活性を受けてE2-2, 3-キノン及びE2-3, 4-キノンに転換され、これから生ずるカテコールキノンがDNAと反応して付加体を形成するとの知見がある。

その他、エストラジオール-17βを大量に投与した雄ハムスターの腎組織において、8-ヒドロキシデオキシゲアノシン (8-OH-dG) の生成量が増加したとの報告がある。

5) 食肉中の残留ホルモン濃度に関する知見：牛から生産される食肉中の天然型ホルモン濃度は牛の品種、年齢、部位、性及び性周期等の要因により変動する。測定法/分析法も人為的な変動要因に数えられる。

(1) 牛組織中のエストラジオール-17β及びエストロン濃度：32回 (1988) 及び52回 (1999) JECFAでの報告を中心にホルモン剤を使用しない牛についての組織内ホルモン濃度を調査した結果、エストラジオール-17β及びエストロンの濃度はいずれも雌雄、去勢、未去勢、妊娠、未妊娠等の条件により著しく変動する事実が確認された。

(2) 国内産及び輸入牛肉中のエストラジオール-17βの濃度：国内産牛肉と外国産牛肉 (米国及びオーストラリア) についてエストラジオール-17βの濃度を測定した所、濃度範囲については両者間に差はみられなかったが (国内産：1>~12.8pg/g、外国産：1>~10.0pg/g)、平均値についてみると外国産 (米国：3.33±2.83pg/g) は国内産 (1.15±1.87pg/g) に比べて3倍の値を示した。米国及びオーストラリアでは、肥育目的にホルモン剤が使用されており、我が国では、ホルモン剤の使用実態はないが、一方、測定試料の採取に当たり、国内産については種、性等が考慮されているが、外国産については試料の情報が得られていない。従って測定値についての両者間の差異をホルモン剤使用の有無に帰するには無理がある。なお、今回の測定

値とJECFA及びFDAの報告での値との間には特に大きな相違はないと判断される。

(3) ホルモン分析法の現状：牛組織中のエストラジオール-17βの測定法として、従来よりラジオイムノアッセイ (RIA) が用いられてきた。RIAは年々改良が加えられ、感度も向上し、現時点ではRIAによる測定例が最も多い。一方、近年、内分泌かく乱化学物質の抽出法の研究に伴って、酵母を用いた血漿中のエストラジオール-17β測定法 (RCBA, Recombinant Yeast Cell Bioassay) が開発された。RCBAはRIAに比べて100倍高い感度をもつと報告されている。RIAとRCBAによるエストラジオール-17βの測定結果を比較すると、15pg/ml以上の濃度の場合には両者間の相関性は高いが、低濃度領域ではRCBAはRIAにくらべて低い値を示す。このような相違の理由として、1) RIAは低濃度で交差反応があるため、2) 血清中の低濃度の場合、RCBAの反応を妨害する物質が働くため、などの議論が交わされているが、未だ結論は出されていない。この問題の解決には今後の検討を待つ必要がある。

6) CODEX委員会とEU科学委員会との論点：家畜の肥育促進を目的とするホルモン剤の使用に関するCODEX委員会とEU科学委員会との議論は激化しているが、論点は以下の4事項にまとめられる。

(1) 食肉の摂取を介して体内に取り込まれるエストラジオール-17βの量と人体内で生成される当該ホルモン量との比較：第32回のJECFA(1988)における評価は、家畜に対するエストラジオール-17β剤の使用が適正規範に従って行われている限り、食肉の摂取を介して体内に取り込まれるホルモン量は人体内で生成される量にくらべて著しく低からホルモン剤使用による安全性に関する懸念はないという考え方に基づいている。一方、EU科学委員会は思春期前の小児におけるエストラジオール-17βの体内生成量は、JECFAが示している値よりはるかに(1/100程度)低いと見積もられると反論している。

(2) エストラジオール-17βのヒトに対する無影響量：更年期後の女性についてコルチコステロイド結合グロブリンの血清中濃度の増加を指標として無影響量が検討され、0.3mg/dayの値が得られている。第52回のJECFAでは、この値をエストラジオール-17βのNOEL

とし、これに10の安全係数(不確実係数)を適用してADIを0-50mg/kg bw/dayとしている。JECFAによる上記の見解に対して、EU科学委員会はこの考え方には小児に対する極めて微量のエストラジオール-17βの影響が全く無視されていると主張している。特に外因性内分泌かく乱化学物質についての研究で問題となりつつあるホルモ・インプリンティングによる影響、即ち、個体の発生・成熟の臨界期におけるホルモン受容体に対する作用がその後の成長や反応性に決定的な役割を果たすであろうという説の可能性を考慮すべきであるとしている。

(3) エストラジオール-17βのヒトにおける発がん性：避妊や治療に用いられるエストラジオール-17βによる乳がん、子宮内膜がん、卵巣がん等のホルモン依存性器官における発がんの増加が疫学的に報告されている。EU科学委員会では、従来は高脂肪摂取によるとみなされている食肉の多量摂取に伴う大腸がんの発生増加をホルモンの影響に結びつけており、この現象は食肉中のエストラジオール-17βによる遺伝子障害のためであるとしている。JECFAでは1987年以降のデータを総括した結果、エストラジオール-17βは遺伝毒性の可能性を持っているが、ヒト及び実験動物にみられる内分泌関連器官における発がんはホルモン受容体を介した非遺伝毒性のメカニズムによるとの結論を提出している。なお、食肉に残留するホルモン濃度でヒトに発がんが起きるとする報告はない。

D. 考察

ホルモンの生体影響については未解決の面があり、新しい科学技術の導入による最近の研究成果の中には適切な検証を経ていないものも含まれている。このような状況を背景に1999年の52回JECFAでは、エストラジオール-17βのヒトにおける健康リスクの評価について、1988年の32回会合での結論を見直すと共に、1987年以降に得られた所見を根拠の重みづけ(weight of evidence)を考慮してADI(0.05 μg/kg 体重/日)を設定し、最終的に家畜に対する使用が適正規範に従って実施されている限り、食肉中に残留したホルモンの摂取がヒトの健康に対して悪影響を及ぼすことはない判断している。

一方、JECFAでの評価及びそれを受けたCODEX委員会の結論に対するEU科学委員会の反論には、検証が不十分な

仮説に基づいてつくられた理論がかなり含まれている。このため、カナダ及び英国の家畜製品安全分科会は、1999年10月の報告書において、結論的に「ホルモン剤を投与した家畜由来の食肉の摂取による健康リスクが従来考えられていたよりも高い」とするEU科学委員会の主張を支持する科学的根拠はないと述べている。ECの関連委員会(Health A Consumer Protection Directorate general Management of Scientific Committee)は、英国の家畜製品委員会分科会の報告書と関連データを調査し、同報告書にはEU科学委員会が1999年4月に公表した見解の修正を必要とするような知見は含まれていないと述べている。更に、同委員会は意見が相違する最大の理由が科学的知見の解釈に由来し、EC側の主張は新しい科学的知見に基づいたものである事を強調しているが、見方を変えると、検証が不十分な論理に基づいてEC側の見解を正当化しているように受け取れる。

E. 結論

研究班では、上記の科学的知見と議論を基礎に家畜の肥育促進を目的とするエストラジオール-17βの使用を慎重に検討し、結論的に、この問題についての日本側の対応としては、CODEX委員会の結論に準じて、家畜における適正使用規範に従って使用するという原則が厳守されるという条件で、家畜へのエストラジオール-17βの使用はヒトに対する健康リスクを増加する要因にはならないという立場を取る方策が妥当であろうとの合意に達した。

なお、研究班会議において、この問題への対応に関連する研究課題として、下記事項の検討を可及的速やかに実施すべきであるとの意見が交わされた事を付記する。

- (1) エストラジオール-17βの高感度分析法の実用化
- (2) 思春期前及び胎児期における低濃度のエストラジオール-17βの影響
- (3) 思春期前の小児におけるエストラジオール-17βの産生
- (4) 合成女性ホルモン剤のヒト健康に及ぼす影響

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）
分担研究報告書

エストラジオール-17 β の発がんリスク

三森 国敏 国立医薬品衛生研究所病理部

研究要旨

1999年の第52回JECFAにおいてホルモンについて再評価を行い、エストラジオール-17 β (E2) は実験動物の実験成績およびヒトの疫学的データから十分な発がん性の根拠が示されており、特に、E2の代謝物であるカテコールには遺伝子障害性があるとの報告から、ヒトへの遺伝毒性を介した発がんリスクの懸念が欧州共同体 (EC) から出されている。

しかし、1987年以後の文献およびヒトの疫学的データを収集し、検討した結果、E2は、遺伝毒性の可能性はあるが、ヒトおよび実験動物での内分泌関連臓器での発がんは、ホルモン受容体を介した非遺伝毒性的な発がんメカニズムによるものであるとの結論が出された。

また、牛肉中のE2レベルは、外因性E2が投与されたとしても、適切な休薬期間を設ければ、内因性E2の生理的変動の範囲内にあること、ヒトでの臨床用量で内分泌学的に何ら異常をおこさない用量 (5 μ g/kg) が明確にされていることから、ヒトの臨床用量に比べれば畜産食品に含まれるこれらのホルモンの量は著しく低く、これらの食品の摂取により消費者に有害な作用を誘発する危険性は殆どない。

ただし、年齢差による感受性の差として安全係数10を使用しているが、性成熟に達した女性に比較し、未成熟な女児ないし閉経を迎えた女性のエストロゲン量が1/10の範囲に入るものとは考えられないことから、安全係数が10で適切か否かについては今後の検討が必要である。

A. 研究目的

エストラジオール-17 β (E2) の発がん性については1986年のJECFAにおいて検れているが、最新の知見により検証を行う。

B. 研究方法

以下の知見について、文献を解析し、妥当性について検討を行う。

1 動物における発がんデータ

- 1) エストラジオール-17 β のみあるいは他の化学物質との併用による発がん性
- 2) 発がん物質との併用によるE2の発がん性：E2の発がん性について、検討する。
- 3) E2の動物に対する発がん性評価

C. 研究結果

1 動物における発がんデータ

- 1) エストラジオール-17 β のみあるいは

は他の化学物質との併用による発がん性：エストラジオール-17 β (E2) およびそのエステルを以下の投与経路で種々の動物に投与された報告が既になされている。

○経口投与：マウス

○皮下あるいは植込み投与：マウス、ラット、ハムスター、モルモット、サル、ブタ

○腔内投与：ウサギ

○脾臓内投与：マウス

○新生児期暴露：マウス

経口投与では、マウス乳腺ウイスル (murine mammary tumor) の高度感染の有無にかかわらず、子宮 (子宮内膜および頸部) の腺癌および乳腺腫瘍の発生率が増加している。

皮下投与では、マウスでは乳腺、下垂体、子宮、子宮頸部、膈、リンパ球の腫瘍および精巣間細胞腫の発生率が増加し

ている。ラットでは乳腺および下垂体腫瘍の発生率が増加している。エストラジオール・ジプロピオネイト(estradiol dipropionate)の場合にはラットに浸潤性下垂体腫瘍が増加している。E2およびテストステロンの併用投与でラットに前立腺癌が増加し、一方、E2の埋植投与では膵臓外分泌の腫瘍が抑制されている。ハムスターでは、去勢および非去勢雄ならびに卵巣摘出雌にE2処置すると悪性腎腫瘍が高率に発生したが、非卵巣摘出雌にはこのような変化は認められていない。E2の去勢雄における腎癌がんには、血清のE2の急激な上昇と強い相関が認められる。モルモットでは、子宮および腹腔内に瀰漫性線維性筋腫様病変が観察されている。ブタでは、卵巣摘出動物にエストラジオールを埋植投与すると、眼球のメラノーマの大きさが、未処置動物に比較して増加している。E2とレボノルゲストレル(levo norgestrel)の併用腔内投与では、ウサギの子宮に脱落膜反応および脱落膜肉腫が発生している。

E2の脾臓内投与では、1日齢マウスの精巣を脾臓に隣接移植することにより、移植片内に典型的なライディッチ細胞腫が生じている。

マウス新生児への皮下投与では、後に子宮頸部および膣に前腫瘍性および腫瘍性病変が発生し、乳腺腫瘍の発生率が増加している。マウスを用いた実験では、E2の新生児期暴露によるアデノーマと扁平上皮癌の早期発生には直接的な関連がないことが明らかにされている。

新生児期にジエチルスチルベストロール処置した卵巣摘出マウスでは加齢とともに膣上皮の層状化が持続し、出生後にE2を埋植投与することによりこの変化は有意に増加している。

2) 発がん物質との併用によるE2の発がん性：E2の発がん性についてN-methyl-N-nitrosourea(MNU)、N-ethyl-N-nitrosourea(ENU)、3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene(3'-Me-DAB)もしくはmethylchlanthrene(MCA)を用いたマウス二段階発がんモデル、およびMNU、2-acetylaminofluorene(AAF)、diethylnitrosamine(DEN)、7,12-dimethylbenz[a]anthracene(DMBA)、N-nitrosobutylurea(NBU)もしくはazaserineを用いたラット二段階発がんモデルによる検討がなされている。

マウスでは、E2はMNUによる子宮内膜発がんに対して促進作用をよる子宮内膜発がんに対して促進作用を示したと

の報告がある。血清中の高いE2レベルと低プロゲステロンレベルの持続がマウスの子宮内膜腺癌に重要であることが示されている。逆に、E2は3'-Me-DABによる肝細胞腫瘍およびMCAによる子宮頸部癌の発育を抑制したと報告されている。

ラットでは、高用量E2の単独投与もしくはE2とプロゲステロンの併用投与により、MNUによる乳腺癌の発育が抑制されたとの報告がある。

卵巣摘出ラットへのE2およびMNU併用投与では膣乳頭腫が誘発され、E2の膣におけるプロモーター作用が示唆されている。部分肝切除、AAFおよび四塩化炭素処置後にE2を投与したSolt-Farberモデルラットでは、E2はラット肝臓にイニシエーション作用を示さないことが報告されている。E2はDENによるラット肝癌においてプロモーター作用を示さなかったと報告されている。E2で前処置することにより、発がん物質の染色体への影響は亢進され、肝細胞のDEN感受性が増加している

(Pretreatment with E2 increased hepatocyte susceptibility towards DEN action probably by enhancing the accessibility of the genome to the carcinogen.). 卵巣摘出もしくは非摘出雌性ラットをDMBA処置しても、胸部腫瘍の発育とE2用量との間に明らかな相関はないとの報告がある。ラットを用いた実験では、E2によりDMBA誘発胸部腫瘍の発生時期が延期したと報告されている。また、ある実験では、活性MARKカスケードがDMBA誘発ラット乳腺癌のE2依存性発育において重要なメカニズムであることが示唆されている。E2は、NBUでイニシエーションを行った去勢ラットの誘発性肝腫瘍に影響を及ぼさないが、下垂体腫瘍を誘発する可能性があることが示されている。E2処置は、アザセリンでイニシエーションしたラットの膵臓前腫瘍病変の発育を強く抑制するとの報告がなされている。

3) E2についての動物に対する発がん性評価：エストラジオール-17 β を長期間投与した場合の実験動物における発がん性に関しては、発がん性陽性の十分な証拠があるとみなされる。E2の腫瘍に対する修飾作用については、イニシエーターの有無に依存しているが、一般に、E2は子宮、乳腺腫瘍に対してはプロモーター作用を示し、肝腫瘍に対しては抑制作用を示すと結論される。E2がイニシエーション活性を有することを

立証する発がん実験の証拠は今までのところない。

D. 考察

今後検討すべき課題として、E2のイニシエーション作用の有無を明確にするための実験動物を用いた発がん実験の実施が必要である。

E. 結論

JECFAの最近の評価：1986年の第32回JECFAにおいて天然ホルモンの17 β -estradiol (E2)は「ADIおよびMRL特定せず」と評価されたが、それから既に12年の歳月が流れており、新たな科学的情報が蓄積されてきたことから、1999年の第52回JECFAは、このホルモンについて再評価を行い以下のとおり結論付けられた。

○E2は、実験動物の実験成績およびヒトの疫学的データから十分な発がん性の根拠が示されており、特に、E2の代謝物であるカテコールには遺伝子障害性があるとの報告から、ヒトへの遺伝毒性を介した発がんリスクの懸念が欧州共同体(EC)から出されている。

○しかし、1987年以後の文献およびヒトの疫学的データを収集し、検討した結果、E2は、遺伝毒性の可能性はあるが、ヒトおよび実験動物での内分泌関連臓器での発がんは、ホルモン・リセプターを介した非遺伝毒性的な発がんメカニズムによるものであるとの結論が出された。

○また、牛肉中のE2レベルは、外因性E2が投与されたとしても、適切な休薬期間を設ければ、内因性E2の生理的変動の範囲内にあることから、E2投与による牛肉への有害影響は考えにくいとの結論が出された。

○さらに、ヒトでの臨床用量で内分泌学的に何ら異常をおこさない用量(5 μ g/kg)が明確にされていることから、ヒトの臨床用量に比べれば畜産食品中に含まれるこれらのホルモンの量は著しく低く、これらの食品の摂取により消費者に有害な作用を誘発する危険性は殆どないが、E2についてADIを設定し、許容範囲を明確にすることが決定された。

○例えば、ヒトでの閉経後のestradiol-17 β の臨床用量でヒトに内分泌学的に何ら異常をおこさない量(5 μ g/kg)から安全係数100(個人差10と年齢による感受性の差10)を除いてE2のADI(50ng/kg)を設定している。

○一方、MRLについては、牛へのこの

ホルモン投与により、各種組織への残留濃度は生理的変動値を大きく上回ることはなく、検出限界に近い場合もあったと報告されている。

○これらの残留中央値から理論的最大一日摂取量(TMDI)を算出すると、それはADIの多くても2%に到達せず、安全域が非常に広いことから、標的動物に動物薬適性使用規範に準じてこれらが投与されている限り、MRLを特定する必要はないと結論された。

○ただし、E2の総摂取量については、TMDIなどから計算された「過剰摂取量」を超えないよう考慮すべきであることが勧告された。

問題点として、年齢差による感受性の差として安全係数10を使用しているが、性成熟に達した女性に比較し、未成熟な女兒ないし閉経を迎えた女性のエストロゲン量が1/10の範囲に入るものとは考えられないことから、安全係数が10で適切か否かについては今後の検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし。

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）
分担研究報告書

ホルモン作用機序

菅野 純 国立医薬品衛生研究所・毒性部

研究要旨

E_2 の生体への作用は以上の如く、受容体を介するシステムと受容体を介さないシステムの二大メカニズムが明らかにされている。これらの系を通じてエストロゲン及びエストロジェン様化学物質は生体に対し種々の作用を発揮する事も分子生物学や生物学の発展で明らかとなった。そして、生体側からみると、その作用は理論的には、生理的作用、あるいは可逆的な作用の範囲に収まるものと、生体に有害効果を起こす場合とに分けることが出来る。この両者は用量の立場からは連続した事象であることが想定され、その境界を明確に示すことは、現在のところ困難である。

A. 研究目的

エストロゲンの生物学的影響は、便宜上、生理的作用と有害効果の二つに大別して考えることが出来る。エストラジオール-17 β (E_2)の胎児期及び出生前後での生理的作用としては、性の分化、脳の発達、性腺機能の決定など器官形成とそれらの機能発現に重要な役割を演じていることが挙げられる。これらの機構を発現するためには、母胎、胎児、性腺、副腎、脳などで合成されるステロイドが 10^{-12} g/ml前後の濃度で機能を発揮すると考えられる。これは、 E_2 依存性培養細胞を用いた研究において 10^{-12} ~ 10^{-9} g/mlの範囲で細胞増殖活性を示すことから支持される。これに対し、従来の毒性評価法により検出されている有害効果は、本報告書全体の科学的知見の中に詳述されている発がん性、遺伝毒性、生殖毒性、催奇形性などに当たるが、これらの効果は、 E_2 の血中濃度がほぼ 10^0 g/ml以上で認められるとしていることから E_2 の最新の知見について検討する。

B. 研究方法

以下の項目について、文献を基に検討を行う。① E_2 の代謝と発現、② E_2 の細胞内動態とそのメカニズム、③受容体の分子生物学、④エストロゲン α 、 β 受容体の遺伝子操作での所見、⑤ E_2 におよび誘導される増殖因子

C. 研究成果

エストラジオール-17 β (E_2)の代

謝と作用発現：エストラジオール-17 β (E_2)は18個のcarbonを有し、ヒトや多くの哺乳類に対し最も強力な天然型エストロゲンである。卵胞より分泌され、細胞の分化、増殖に影響し、エストロジェン受容体 α (ER α)、 β (ER β)と結合して、その効果を示すことが知られている。これら受容体蛋白は $\alpha\alpha$ 或いは $\beta\beta$ ($\alpha\beta$ も少なくとも試験管内では形成される)の2量体を形成し、その乖離係数は0.1~1.0nMにある。芳香性A-環と3-OHがリガンド結合活性をもち、受容体の活性化を行う最も重要な部位である。 E_2 の代謝産物の多くはER α との結合能を大幅に減弱しているが、2-OH- E_2 、4-OH- E_2 体は E_2 に比べてそれぞれ100と150%のER α との結合能を有している。

薬理代謝：牛に E_2 を投与する場合、estradiol benzoateとして耳の皮下部分に投与する。これらは体内で直ちに E_2 に変換され、内因性 E_2 と区別出来なくなる。血中 E_2 の増加に伴い、下垂体より成長ホルモン(GH)の分泌が増加する。体内での代謝物として、筋肉内での多くは17 α - E_2 として、或いは E_1 として存在する。脂肪組織内でもほぼ同様の結果が得られている。肝、腎での代謝産物が最も多く、それらは17 α - E_2 、17 α - E_2 グルクロナイド、 E_2 、 E_1 などである。ヒトの体内で見いだされている2-OH、4-OH、16 α -OH- E_2 などは牛との共通代謝産物と考えられているが、未だに定量的データは報告されていない。

ヒトの体内ではC-1, C-2, C-3, C-4, C-6, C-7, C-11, C-14, C-15, C-16, C-18の carbon を含んだ部位で酸化反応が起こる。血中や尿中で最も多く見いだされるのは2-水酸化代謝産物である。肝はエストロゲン代謝の中心臓器であり、P4501A2, P4503A3, P4503A4 などにより2- α , 16- α の水酸化が行われる。4-水酸化物は、少量しか代謝されないが、 E_2 バランスの重要な役割を占めている。肉や肉製品にかかわる E_1 , エストラジオール-17 β の吸収、分解、排泄に関する情報は全く示されていない。2mg 経口投与された17 β - E_2 の20%は吸収され、血中半減期は2~16時間とされている。

E_2 の細胞内動態とそのメカニズム

(1) 受容体を介するシステム

ジェンセン、ジャコブソンらにより1960年代に発表されたトリチウム標識 E_2 の子宮内膜でのオートラジオグラフィによって標的細胞における E_2 の局在性が検出され、その所見が、ER 受容体研究の幕開けとなった。その後、ER の存在をめぐって、下垂体、肝、乳腺、子宮などで生化学的、形態学的研究が発表され、細胞質内あるいは核内受容体として認識されるようになった。このように、従来より知られていたペプチドホルモンなどの細胞膜受容体と異なった存在様式が示されたが、それはステロイドホルモンが脂溶性であるため細胞膜のリン脂質を介して容易に膜を通過する事からも支持されている。現在では核内受容体の分子構造の決定とcloningが行われ、その遺伝子配列も明らかにされている。その結果、 E_2 受容体は他のステロイドホルモンである progesterone, glucocorticoid hormone などの受容体と共通のDNA結合ドメインを有し、生物学的結合部位が各ホルモン特有の遺伝子構造を有することも明らかとされた。

受容体スーパーファミリーの分子構造は、アミノ酸配列の相関性と機能から6つのドメイン(A-F)に区分される(図1)。A/B domain は各々ステロイドホルモンのアミノ酸配列が最も異なる部位で、転写活性化(AF-1)や細胞特異的効果の発現にあずかる。C domain は塩基配列を認識し、標的遺伝子への特異的な結合にあずかり、受容体の2量体形式反応にも関与する。D domain は蝶番(hinge)構造をとり、高次構造の変換部位となる。甲状腺ホルモン受容体(TR)やレチノイン酸受容体(RAR, RXR)では転写抑制にもあづかる。E/F domain

n はリガンドとの結合、2量体の形成(homo-dimer)、転写制御(AF-2)、そして核内移行と多機能性領域を構成する。受容体はホルモン分子の100倍の大きさを有することも明らかとなった。

(2) 受容体を介さない影響

先に触れた如く、ステロイドホルモンはステロイド環を骨格の中心にもち、水溶性ペプチドホルモンと異なって、脂溶性である。血中にあるのは、その多くは serum globulin binding protein (SGBP) 及びアルブミンと結合した状態で存在し、10%以下が free の estrogen として存在することが明らかにされている。その標的臓器は、脳、肝などの主要臓器、ほとんどの内分泌系臓器、あるいは皮膚などであるが、その全貌は未だ明らかにされていない。(1)で述べた受容体を介したシグナル伝達は、ホルモン作用発現の機序としては、充分説明可能であるが、 E_2 の有する細胞障害性、変異原性など生体に対する有害影響のメカニズムについては十分な説明されていない。 E_2 やその水酸化代謝物によるDNA adductの形成、Free radicalの発生などは受容体を介さず、直接細胞構成生体分子との結合によりもたらされると考えられる。

以前はDESと異なり E_2 自身の genotoxicity や mutagenicity は推測の域を出ていなかった。しかし、近年の多くの分子生物学的手法の導入により、例えば腫瘍化の一つの指標である microsatellite instability、更には水酸化 E_2 による乳腺でのDNA付加体の形成、細胞質内微小管の変性の誘導、DNAのsingle strand切断などの現象が明らかとなり、少数の動物実験のデータと併せ考えると、現在では E_2 がイニシエーション及びプロモーションの両面の作用を有していると考えられる。

受容体の分子生物学：ジェンセンとゴルスキーは、受容体の存在が示唆された10年後に始めて実験的に受容体の構造を明らかにした。その最初のもは、17 β -estradiol に対する受容体であり、続いてテストステロン、プロゲステロン、グルコ・コルチコイド、甲状腺ホルモン、ビタミンD、レチノイドなどであり、これらは核内受容体のファミリーを構成していた。続いて、これらの核受容体の生理的制御を行う co-regulators (共役因子群)の存在が明らかとなった。遺伝子操作手技の発達に伴い、ステロイドレセプター・スーパーファミリー遺伝子に対する改変導入実験が行われ、受容

体欠失動物による機能解析が行われるに至った。最初にエストロゲン受容体欠失マウスが作製されたとき、エストロゲン受容体は、エストロゲン標的組織において広く分布してその生物活性の first messenger の役割を果たす唯一の分子であるとして認識されていたため、ホモ欠失個体は生まれてこないものと予想されていた。しかし、予想に反し、成獣にまで生育するホモ欠失個体が得られた（不妊ではあるが）。1996年に至り、複数の研究室より第二の ER 受容体の存在が示され、その結果、古典的 ER が ER α 、新規の ER が ER β と呼ばれることとなった。

ER α は約9つのエクソンから成る約6.3kbの転写産物であり、マウスの場合599個のアミノ酸配列よりなる66kDaの分子量を有する。

ヒト、ラットではややアミノ酸数が異なっている。マウスでは chr#10 に存在し、ヒトでは chr#6 に存在する。これら ER α は多くの組織や細胞で変異株がみられており、腫瘍組織では突然変異種も観察されている。

一方、ER β は485のアミノ酸より成り、約54kDaの分子量を有するもので ER α よりやや小さい構造を示している。その差はN-末の部位のアミノ酸構造がやや小さくなっていることによる。ER α 欠失マウス、ER β 欠失マウスおよび ER α ER β 重複欠失マウスが作出されている。

エストロゲン α 、 β 受容体の遺伝子操作での所見：ER α 欠失(ERKO)及び ER β 欠失(BERKO)マウスは1.8kbの Neo 遺伝子を ER α 遺伝子の exon2 に導入したものであり、同じく1.8kbの Neo 遺伝子を ER β 遺伝子の exon3 に入れたものが BERKO マウスである。ER α 、ER β の発現を RT-PCR で観察すると、ER α は、卵巣、子宮、乳腺、下垂体、肝、皮膚、筋肉、精巣、副精巣に強発現し、卵管、視床下部、心、血管、肺、腎などに中～弱発現している。一方、ER β は、副精巣で強発現する以外は、子宮、視床下部、副腎皮質、肺、精巣、前立腺で少量発現している。

ERKO で最も注目された現象は、ホモ欠失マウスが生まれてきたということである。E₂ が性の分化、脳をはじめ各臓器の機能的な分化に重要な役割を果たしていることを考えると、ERKO マウスでは胎児や新生児の致死が想定されたが、結果は野生型と同じくほとんど正常に生まれ、生育する事が観察された。ま

た、ERKO マウスは、性腺でのステロイドの合成能を有していた。

雌性生殖器：子宮重量は ERKO で減、BERKO で軽度減、子宮内腔、膈上皮いずれも ERKO で高度の増殖低下、BERKO では軽度低下。卵巣では、ERKO で黄体の欠如と出血卵胞がみられる特徴がある。BERKO ではこれらの変化はみられないが成熟卵胞からの排卵障害がみられ、リッターサイズが低下する。血中の E₂ や testosterone 値は、ERKO マウスで野生型に比べ、雌では高度に、雄では軽度に上昇している。

乳腺：乳腺の原基は新生児期に既に配置されているが、その増殖・分化の発達は思春期前後に種々のホルモンの影響下で開始される。ERKO マウス乳腺は、その思春期前後に達しても新生児期のままの乳腺の構造を保っている。即ち、性成熟に伴う発育・分化・増殖という状態を欠いている。このことは、ER α の欠如に伴い、その下流にある種々の増殖関連遺伝子の活化が起こらない結果として考えられる。BERKO マウスでは、ほぼ正常の乳腺分化を示すことが報告されている。

Wnt-1 マウスモデルを用いた乳癌発生における ER α の役割 (Cancer Res 1999, 59:1869-76)：Wnt-1 マウスは MMTV-Wnt-1 トランスジェニックマウスの略で、高率に乳癌を発生するモデルとして知られている。即ち、雌では1年以内に100%、雄でも15%に乳癌或いは乳腺の過形成が自然発生する。この Wnt-1 マウスの野生型と ERKO のマウスを交配し、ER α を欠いたマウスに於ける Wnt-1 遺伝子の影響を検討した。ER α を欠いたマウスでは乳癌の発生が高度に遅れて発生することが明らかとなった。このことは、Wnt-1 による乳癌発生には ER α は不要であるが、発生母地のサイズあるいは発がん促進過程に ER α が関与していることを示唆している。

E₂ により誘導される増殖因子：E₂ により誘導、増幅される遺伝子群には c-fos, c-jun, c-myc などが、核内に分布する増殖因子として、また、EGF, IGF などが膜結合型増殖因子として知られている。臓器特異的なものとしては、下垂体の pit-1/GHF-1, プロラクチン, オキシトシン, 等があり、また、乳腺、前立腺などでも特有の増殖因子が挙げられている。

D. 考察

E₂ の生体への作用は受容体を介する

システムと受容体を介さないシステムの
二大メカニズムが明らかにされている。
これらの系を通じてエストロゲン及びエ
ストロジェン様化学物質は生体に対し種
々の作用を発揮する事も分子生物学や生
物学の発展で明らかとなった。

E. 結論

生体側からみた E₂ の作用は理論的に
は、生理的作用、あるいは可逆的な作用
の範囲に収まるものと、生体に有害効果
を起こす場合とに分けることが出来る。
この両者は用量の立場からは連続した事
象であることが想定され、その境界を明
確に示すことは、現在のところ困難であ
る。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし。

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）
分担研究報告書

ヒト内因レベルへの影響

渡辺 昌 東京農業大学

研究要旨

米国では 50 年ほど前から家畜の飼育に性ステロイドホルモンを使用してきた。更に 3 種のより強い作用をもつ合成ホルモン、ゼラノール（エストロゲン作用）、メレンゲストロール、酢酸トレンボロン（アンドロゲン作用）が広く使われるようになってきている。

1999年に発表したEUの報告書では、1988年に検討されたJECFAの報告書に対して、1) 残留ホルモン量について、RIA法による値であり、信頼性にかける。2) ヒトとくに思春期の子ども性のホルモン産生について、思春期前の少年にとって食肉由来のエストラジオールは1日に産生する量の1%以上となる可能性が十分ある。3) ホルモン剤と生体内のホルモンとの関係について①多くの合成ステロイドホルモンはSHBGへの結合能が低く、血漿中ではフリーの形で生物活性が高い。②合成ステロイドホルモンは半減期がさまざまであること、③合成ステロイドホルモンは内因性ステロイドホルモンと共通の作用をもつが、すべての面で同じと言うわけではないという点について問題であるとしている。

一方、JECFAの結論では、4) 食肉からのエストラジオール-17 β 、プロゲステロン、テストステロン、ゼラノール、トレンボロン摂取量はJECFAの決定したADIに比べて非常に低い。5) 体内で産生されるホルモン量に比べて非常に低濃度である。6) 食肉中の濃度では変異原性、遺伝毒性にならない。7) 新しい鋭敏な分析法としている組み換え酵母によるホルモン力価の方法は評価が未定である。8) 引用文献が不適切、とくに量-反応関係が無視されており、さまざまないわれている変化を起こす量より食肉よりの摂取量ははるかに低い。9) EUの指摘している発がん性については、疫学的には肉・脂肪摂取とがんの関係を指摘しているのみであって、その中のホルモンとの関係には言及していない。とされている。

A. 研究目的

1998年JECFA (The Joint Food and Agricultural Organisation/World Health Organisation expert committee on food additives) は食肉中の残留ホルモンにの安全性についてレビューし、消費者にとって安全であると結論した。しかしEUはその後の測定法の進歩や小児、とくに思春期の子供はエストラジオールに感受性が高いことを指摘し、JECFAの結論は再検討が必要であると主張している。なぜならJECFAの安全性を出した過程にはいくつかの不確定な仮定が使われていたからである。

それに対して1999年4月30日にScientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health (SCVPH) のレポートが出された。このレポートはカナダのMinister of Agriculture, Fisheries and FoodのサブグループがおこなったEUのSCVPHレポートに対する反論である。本研究ではこの2つの報告書を中心にレビューし、問題点を評価した。

B. 研究方法

JECFAが1988年食肉中の残留ホルモンの安全性についてレビュー及びEU

が1999年に出したレポート及び1999年4月30日にScientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health (SCVPH)のレポートの妥当性について検討する。

C. 研究結果

近年環境中の内分泌攪乱物質としてさまざまなものが問題になっているが、生体内ではエストラジオールは環境中のこれら物質の10,000倍もの活性をもつ。

米国では50年ほど前から家畜の飼育に性ステロイドホルモンを使用してきた。更に3種のより強い作用をもつ合成ホルモン、ゼラノール(エストロゲン作用)、メレンゲステロール、酢酸トレンボロン(アンドロゲン作用)が広く使われるようになってきている。前2者はペレットとして皮下に埋め込まれ、屠殺時まで残っている。メレンゲステロールは子牛の餌に混ぜられる。もっとも広くつかわれているのはエストロゲンでエストラジオール-17β、エストロジオールベンゾエイト、合成ゼラノール等である。その他のホルモン剤はエストロゲンとの組み合わせで使われることが多い。

しかし、繁殖用の雄牛にはホルモン剤は使われない。それは睾丸の発達を遅らせ、受精率を下げるからである。また繁殖をめざすheiferへの使用も勧められていない。また、採乳用の動物へのホルモン剤使用は米国でも使われていない。ヨーロッパでは食肉生産にホルモン剤を使用することは1989年以来禁止されている。

EUは食肉生産にホルモン剤を使用して良いかどうかをきめる為に次の3点が明らかにされなければならない事を強調している。

- ①自然の状態で飼育された動物にくらべて、性ホルモンを使用した動物組織に代謝物も含めて残留ホルモン量が有意に高いか？
- ②残留性ホルモンおよび代謝物は人の生理的レベルを上回って意味あるものか？
- ③食肉から摂取される残留ホルモンによっておきるヒトでの生物学的影響について何を知っているだろうか？

残留ホルモン量についてもEUは1988年のJECFA報告での値がRIA法によるものであり、多くの検体で検出限界すれすれの値を示し、しかも方法により値のばらつきが大きく、信頼性にかける点を批判している。JECFAの結論でもエストラジオール、エストロン、プロゲステロン、テストステロンの残留量はす

べて高かった。しかし、これらレベルは妊娠 heifer よりは低かった。参考値としてしめされた値はテストステロンでは雄牛の値が、エストラジオールやプロゲステロンは妊娠中の heifer の値が使われた。

次にEUとJECFAあるいは米国との論点及び見解の相違を明確にするため、先ずEUの側の主張を詳述する。

妊娠していない動物でエストロゲン値があがる意味は—妊娠が遅い雌牛はもっともホルモンレベルが高くなる。家畜にホルモンを使用することは食肉中にホルモンとして残るのみでなく、尿尿から排出されるホルモンによって環境が汚染され、水源にも入る可能性がある。

ヒト、特に思春期の子どもの性ホルモン産生：ガイドラインでは少年の場合、エストラジオールが6 μg/日、プロゲステロン150 μg/日、少女のテストステロンは32 μg/日とされている。一日産生率(PR)は代謝クリアランス率(MCR：24時間に血漿中のホルモンが排除されるのに必要な血清の量)と血漿中のホルモン量から下記の式によって計算できる。

$$PR(\mu g/day) = \text{plasma concentration} (\mu g/ml) \times MCR(ml/day)$$

健康な少年、少女のMCRに関してはいままで報告がない。アイソトープで標識したホルモンを与えるという倫理的問題もある。1960年代、1970年代には成人男女に関して少数のMCRのレポートがだされた。また、先天性副腎過形成とアンドロゲン抵抗性の2名の思春期児のテストステロンのMCRが報告された。しかしこれら病的状態のホルモン値は著しく異常であり、健康な思春期のこどもの状態を反映するものではない。JECFAの報告でPRの参考文献とされたものは上記疾患を有するものであり、健康な思春期のこどもの参考値としうるものではない。また、MCRについては成人の値を使用していると思われる。その結果少年のエストロジオールのPRとして100 μg/日とされる(表6)。この値には疑問が多い。まずMCRは身体の大きさが関係していて、特に体表面積に比例する。成人女性にくらべ3、4歳の少女は30—50%の体表面積なのでJECFAの試算は2、3倍PRを過剰に見積もっている。また血清中の結合たん白質、主として肝における代謝酵素活性も問題である。血漿中の大部分のエストラジオールはSHBGと、またテストステロンはTeBGと結合している。フリー

のステロイドホルモンがクリアランスをうけるのでMCRはSHBGに結合したホルモンの分画と反比例する。つまり、SHBGのレベルが高かったり、結合能が強いとMCRは低くなる。血漿からステロイドホルモンが肝細胞にとられるとマイクロゾームでリダクターゼによって代謝される。

甲状腺ホルモンとアンドロゲンはリダクターゼ活性を高める。SHBGの低いこととあわせ、このことは男性のMCRを低くする要素である。また、子どもはSHBGが高いので体表面積で補正してもMCRは2-4倍低くなる。

思春期の子どものテストステロンとエストラジオール値は検出限界値に近いか下回る。それでも最新のデータでは思春期まで加齢とともに高くなることが発見された。このエストラジオールのPR値は0.04 μ g/日であり、いままで考えられていた値の100分の1程度である。少年におけるエストラジオールのPRが0.04 μ g/日とすると、1%の増加は0.4ng/日となる。JECFAの1988年の報告では食肉のエストラジオールレベルは5-100ng/kg 無処置の肉にくらべて高いとされる。また、エストロン値も高かった。他の代謝産物も報告書にはなかったが存在していたらしい。1日100gの肉を食べるとすると、エストラジオール0.5-10ng/日とることになり、それにエストロゲン活性をもつ代謝産物が加わる。経口摂取されたうち、どれだけ体内に取り込まれるかが問題である。エストラジオール、エストロンは10%程度と低い、硫酸エストロン、エチニル・エストラジオールは60%と高い。以上のことから、思春期前の少年にとって食肉由来のエストラジオールは1日に産生する量の1%以上となる可能性が十分ある。

性ステロイドホルモンが成長や成熟、生殖機能に果たす役割は昔から知られていたが、それは大人や思春期のレベルであって、思春期前のテストステロンやエストラジオールの役割については良く知られていない。

低エストラジオールの作用はターナー症候群の臨床試験から得られた。骨端線の成長に関して2相性の作用を示し、高濃度ではかえって成長を阻害した。エチニル・エストラジオールを100ng/kg/日5週間与えたところ成長速度が増加したが、それ以上の高用量では成長率は増えなかった。

この100ng/kg/日は40kgの子供では一日4 μ g/日になり、これは思春期の子供の再計算されたPRを上回るし、食肉から摂取されるであろう量より多い。エストラジオールの吸収率は10%程度、エチニル・エストラジオールのは60%位であるが、25-50ng/kg/日という低濃度のエチニル・エストラジオールでもターナー症候群の少女の成長を促進した。3-5週という短い処置でもこの効果はみられる。

低濃度長期の量・反応関係はほとんどわかっていない。クラインらの超高感度の測定法によると、5.5-10.5歳の思春期前の少女は0.6 \pm 0.6pg/ml、4.5-13歳の少年は0.08 \pm 0.2pg/mlであった。この値は極めて低い。少女のほうが8倍高く、なぜ少女の方が発育が良いのかを説明できる。エストロゲンの骨の成長と成熟に対する2相性の作用により、高濃度のエストロゲンは成熟をもたらす、は骨端を癒合させ、直線的成長を停止させる。このようにエストラジオールが少女時代に高濃度であることは、早熟と早い骨端の成熟をもたらす。思春期前の大変低濃度の範囲内での血清エストラジオールの小さな変化ですら意味ある生物学的変化をもつ。

低濃度のエストロゲン治療の研究から臓器が異なるとエストロゲン感受性も異なることが示された。ターナー症候群の少女では低濃度エストロゲンによる成長は顕著であるが、高濃度エストロゲン投与にみられるような膣や乳腺の発育、月経の開始、SHBGの変化等はおきない。健康な閉経後の婦人でもエストロゲン刺激の徴候はいくつかの臓器にみられるのみである。これら婦人の血中濃度は平均8pg/mlであるが、膣、子宮内膜、子宮筋の濃度はそれぞれ198、655、149pg/gであり、非常に効率的なエストラジオールの蓄積がおきる。乳腺腫瘍組織もエストラジオールの濃度が血清中より高い。

血液中のエストラジオールはこれら組織のエストラジオールの唯一の源ではない。硫酸エストロン、エストロン、エストラジオールは容易に転換する。子宮内膜、膣、乳腺腫瘍組織におけるエストロゲン代謝の研究からこれら組織は効率的に硫酸エストロンやエストロンからエストラジオールをつくることがわかった。したがってエストラジオールのみでなく、これら代謝物の評価も必要である。エストロゲンの発がん性や催奇形性は動

物実験やDESを与えられた女性で示された。しかし、この際のエストロゲン濃度は生理的濃度を著しく上回る。低濃度ではこの作用は可逆的、つまり閾値があるのではあるか？ターナー症候群の場合、組織は異なった感受性をもっているため異なった組織に特別の閾値を適用できた。腔や内膜の変化は形態学的なものであるが、シグナル伝達系や細胞増殖に関連した遺伝子変化も形態と同様に重要な変化である。形態学的変化には生化学的変化が先行している。生化学的変化は複雑で、量・反応関係に関する知識は乏しい。乳癌由来のMCF7細胞に10の⁻¹⁴乗(10fg/ml)という低濃度のエストロゲンをくわえることにより特別な遺伝子を活性化した。この濃度は細胞1個あたり10-100分子のエストロゲンがある濃度で、このような少数個の分子でも遺伝子変化を起こすことを示した。また、エストラジオール欠乏状態にしておくと10の⁻¹⁴乗から⁻¹⁵乗モル濃度でMCF7細胞の増殖を刺激する。最近シーハン等は内因性のホルモンと同じ作用をもつ外因性のホルモン投与はNOAELをきめる基礎となっている閾値の概念がもてないのではないかと指摘した。エストラジオール誘導の亀胚の性可逆性は、エストロゲン作用の閾値を内因性のものがこえている場合、外因性エストロゲンの閾値は存在しない。

以上のことから低濃度ではあるが過剰の曝露のある集団にどのような変化が起こりうるであろうか？初経がわずかに早くなる。最高身長に達する年齢がわずかに若くなる。エストロゲン関連がん(主として乳癌)が増える。等である。生化学的変化ははっきりとした副作用が現れねば認められないだろう。

ここ数10年乳癌は西欧諸国で増加している。がんの原因はほとんど分かっていないが、遺伝的素因と環境要因の両方がある。今世紀に入って西欧諸国での初経年齢も低下している。現在、この傾向は栄養状態が改善されたからと考えられている。エストロゲン刺激作用による乳房や恥毛の発達は米国の少女で7歳で黒人が27.2%、白人で6.7%である。以前の比較しうる信頼できるデータはない。野生動物やヒトの生殖の問題がおきているが集団のデータから証明するのも困難である。少数の例は事故によりかなり多量の曝露がおきた場合である。もう一つ関連した重要な現象にホルモン・インプリンティング(ホルモンによる

刷り込み)がある。これは成熟中のクリティカルな時期にホルモン受容体に作用する影響は、後になって成長や反応性に決定的な役割を果たすという説である。ラット周産期に一回のDESやアリルエストレノール投与により、終生子宮のエストロゲン受容体の数が減り、肝ミクロゾームの酵素活性の変化によりテストステロンへの反応性が変わる。また、雌幼ラットに一回のテストステロン注射が、終生続くエストロゲン反応性を変化させる。決定的な時期に一回でも生理的濃度を上回るホルモンあるいはその類似体が与えられると発達する臓器への影響やホルモンへの反応性が変わってしまうのである。生理的濃度内での微妙な変化でも、後に働くであろう臓器のホルモン感受性を微妙に変えるという可能性も考えられる。

内因性ステロイドホルモンと合成ステロイドホルモンの違い：

いままで述べてきたことは内因性のステロイドホルモンの話であって、家畜に使用されている合成ステロイドホルモンは以下のとおりのいくつかの異なった部分がある。

1) 多くの合成ステロイドホルモンはSHBGへの結合能が低く、血漿中ではフリーの形で生物活性が高い。内因性ステロイドホルモンは98-99%がSHBGに結合している。であるから、血漿中の合成ステロイドホルモンが内因性のものと同濃度あるいは低いとしても、その生物活性ははるかに強い。

2) 合成ステロイドホルモンは代謝経路が異なるので半減期もさまざまとなる

3) 合成ステロイドホルモンは内因性ステロイドホルモンと共通の作用をもつが、すべての面で同じと言うわけではない。

合成ステロイドホルモンのゼラノール、酢酸メレンゲステロトール、酢酸トレンボロンとそれらの代謝産物は動物やヒト体内に自然では存在しない。これらは医薬品としてヒトへ使用されていないので動物のデータしかない。これらホルモンによる異なった効果や曝露の結果を検討せねばならない。

Subgroup of the Veterinary Products Committeeの反論：1999年4月30日にScientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health(SCVPH)のレポートが出された。このレポートはカナダのMinister of Agriculture, Fisheries and Foodのサブグ

グループがおこなった EU の SCVPH レポートに対する反論である。

以下の点を強調している。

- 1) 食肉からのエストラジオール-17 β 、プロゲステロン、テストステロン、ゼラノール、トレンボロン摂取量は JEFCA の決定した ADI に比べて非常に低い。
- 2) 体内で産生されるホルモン量に比べて非常に低濃度である。
- 3) 食肉中の濃度では変異原性、遺伝毒性にならない。
- 4) 新しい鋭敏な分析法としている組み換え酵母によるホルモン力価の方法は評価が未定
- 5) 引用文献が不適切、とくに量-反応関係が無視されている。さまざまデータにより変化を起こす量より食肉よりの摂取量ははるかに低い。
- 6) 発がん性に関して、疫学的には肉と脂肪摂取とがんの関係を述べているのみであって、その中のホルモンには言及していない。
- 7) 発生障害に関して低濃度のデータはない。外来性ホルモンには閾値がないとする考えも根拠はない。外来性ホルモンの研究は多いがレポートで取り上げられたような問題があるというデータはない。

以上のことから SCVPH の出した結論には重大な疑義がある。

ADI : European Committee of Veterinary Medicinal Products (CVMP) は 1994 年の会議で以下のような ADI を決めている。これは NOEL に不確定要因で除したものである。

1999 年 4 月 30 日に Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health (SCVPH) のレポートが出された。このレポートはカナダの Minister of Agriculture, Fisheries and Food のサブグループがおこなった EU の SCVPH レポートに対する反論である。

以下の点を強調している。

- 1) 食肉からのエストラジオール-17 β 、プロゲステロン、テストステロン、ゼラノール、トレンボロン摂取量は JEFCA の決定した ADI に比べて非常に低い。
- 2) 体内で産生されるホルモン量に比べて非常に低濃度である。
- 3) 食肉中の濃度では変異原性、遺伝毒性にならない。
- 4) 新しい鋭敏な分析法としている組み換え酵母によるホルモン力価の方法は評

価が未定

5) 引用文献が不適切、とくに量-反応関係が無視されている。さまざまデータにより変化を起こす量より食肉よりの摂取量ははるかに低い。

6) 発がん性に関して、疫学的には肉と脂肪摂取とがんの関係を述べているのみであって、その中のホルモンには言及していない。

7) 発生障害に関して低濃度のデータはない。外来性ホルモンには閾値がないとする考えも根拠はない。外来性ホルモンの研究は多いがレポートで取り上げられたような問題があるというデータはない。

以上のことから SCVPH の出した結論には重大な疑義がある。

ADI : European Committee of Veterinary Medicinal Products (CVMP) は 1994 年の会議で以下のような ADI を決めている。これは NOEL に不確定要因で除したものである。

ECFA の一日推定量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) によると子どもは摂取量が少ないことからこの 6 分の 1 の値をしめしている。

しかし、JECFA の標準摂取量は仮定に過ぎず、英国の 1 週間の秤量法をもとに計算すると JECFA の値は蜂蜜を除き、すべて 97.5 パーセントイルより上であった。300g の赤み肉を食べる者は 0.2%、50g の動物脂肪をとるものは 1.4%、100g の卵は 0.5%、20g の蜂蜜は 4.6%であった。1.5L の乳製品、100g の肝、50g の腎をとるものは一人もいなかった。

肝臓は 97.5 パーセントイルの人は 35.4g であるが、時に女性で 288g、男性で 418g もたべる人がいるので、このような場合には残留ホルモンの影響を考える必要があるかも知れない。

D. 考察

内因性のホルモン産生量にくらべ食肉残留ホルモン量はきわめて少ない。英国の食事調査から計算した量では生体に害を及ぼす量ではない。

米国では 50 年ほど前から家畜の飼育に性ステロイドホルモンを使用してきた。更に 3 種のより強い作用をもつ合成ホルモン、ゼラノール (エストロゲン作用)、メレンゲストロール、酢酸トレンボロン (アンドロゲン作用) が広く使われるようになってきている。前 2 者はペレットとして皮下に埋め込まれ、屠殺時に切り取られる。メレンゲストロールは子牛の餌に混ぜられる。もっとも広く使