

Table 1. Maternal findings in rats given monobutyl phthalate (MBuP) on days 15-17 of pregnancy

MBuP (mg/kg)	0 (control)	250	500	750
No. of pregnant rats	16	16	16	16
No. of dead pregnant rats	0	0	0	0
Initial body weight (g) ^a	243 ± 15	239 ± 14	243 ± 13	241 ± 16
Body weight gain during pregnancy (g) ^a				
Days 0-15	47 ± 6	49 ± 5	48 ± 6	48 ± 7
Days 15-18	30 ± 6	27 ± 8	15 ± 10*	9 ± 12*
Days 18-21	35 ± 11	32 ± 7	28 ± 8	17 ± 10*
Adjusted weight gain ^b	23 ± 11	23 ± 10	29 ± 4	26 ± 9
Food consumption during pregnancy (g) ^a				
Days 0-15	250 ± 18	258 ± 23	260 ± 14	261 ± 19
Days 15-18	53 ± 5	50 ± 11	47 ± 9	43 ± 6*
Days 18-21	47 ± 9	47 ± 9	51 ± 3	50 ± 6

^a Values are given as mean ± SD.

^b Adjusted weight gain refers to maternal weight gain excluding the gravid uterus.

* Significantly different from control, $P < 0.05$.

Table 2. Reproductive and fetal findings in rats given monobutyl phthalate (MBuP) on days 15-17 of pregnancy

MBuP (mg/kg)	0 (control)	250	500	750
No. of litters	16	16	16	16
No. of corpora lutea per litter ^a	16.8 ± 1.8	16.1 ± 1.3	16.1 ± 1.6	16.1 ± 1.3
No. of implantations per litter ^a	14.9 ± 2.3	14.9 ± 1.6	14.1 ± 1.8	15.0 ± 1.2
No. of litters totally died	0	0	0	3
No. of resorptions and dead fetuses per litter ^a	0.9 ± 0.8	1.8 ± 2.0	4.5 ± 3.4*	7.9 ± 5.1*
% Postimplantation loss per litter ^b	6.5	12.0	30.6*	52.7*
No. of live fetuses per litter ^a	14.0 ± 2.6	13.1 ± 2.2	9.4 ± 2.5*	7.1 ± 5.0*
Sex ratio of live fetuses (male / female)	117 / 107	110 / 100	71 / 82	54 / 58
Body weight of live fetuses (g) ^a				
Male	4.71 ± 0.32	4.67 ± 0.47	4.55 ± 0.41	4.23 ± 0.33*
Female	4.44 ± 0.26	4.45 ± 0.31	4.31 ± 0.45	4.03 ± 0.27*
No. of male fetuses (litters) with undescended testes	0	9 (6)*	61 (16)*	53 (13)*

^a Values are given as mean ± SD.

^b [(No. of resorptions + no. of dead fetuses)/no. of implantations] x 100.

* Significantly different from control, P < 0.05.

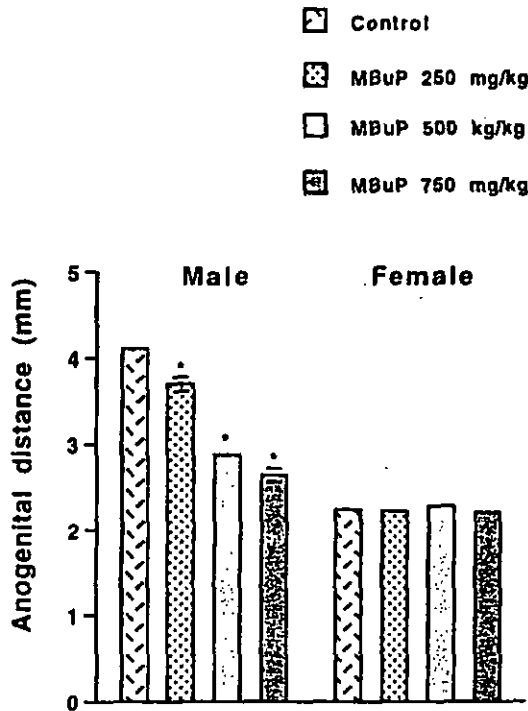


Fig. 1 Anogenital distance (AGD) in male and female fetuses of rats given monobutyl phthalate (MBuP) on days 15-17 of pregnancy. Values are given as mean \pm SE. * Significantly different from the control, $P < 0.05$.

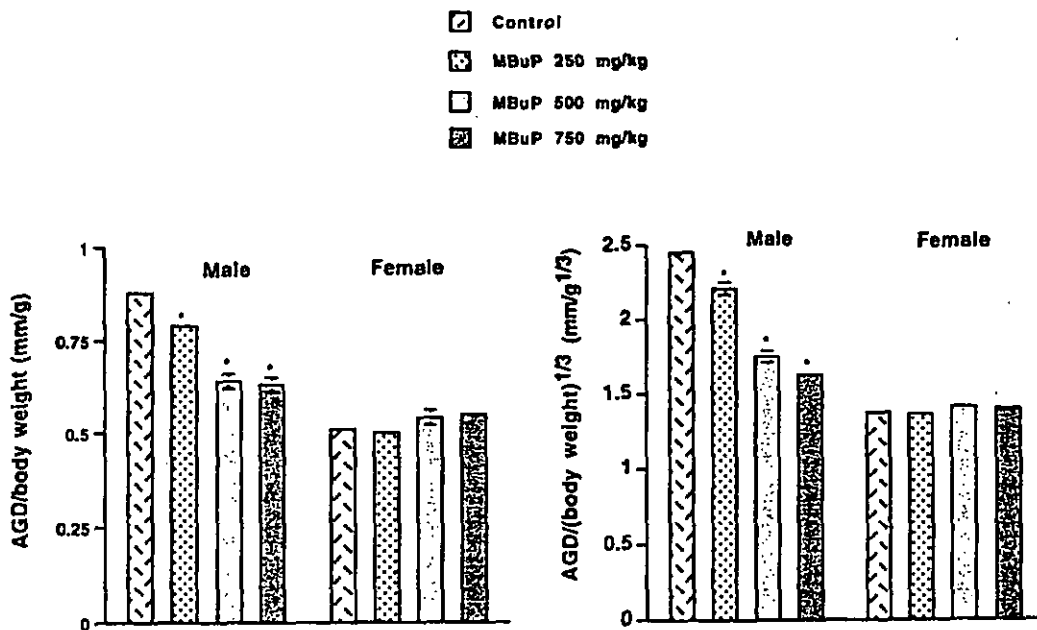


Fig. 2 Anogenital distance (AGD)/body weight ratio and anogenital distance (AGD)/cube root of body weight ratio in male and female fetuses of rats given monobutyl phthalate (MBuP) on days 15-17 of pregnancy. Values are given as mean \pm SE. * Significantly different from the control, $P < 0.05$.

アレルギー反応に関与するマスト細胞への環境化学物質の影響評価と 免疫系への影響のデータ調査

研究者 手島 玲子 国立医薬品食品衛生研究所機能生化学部

研究要旨

アレルギー反応に関与するマスト細胞への環境化学物質の影響評価研究として、平成12年度は、次世代影響リスク評価候補物質の中から、フタル酸エステル類をとりあげマスト細胞への影響につき検討を行った。用いた3種のフタル酸エステルは、マスト細胞からの脱顆粒反応を増強する活性のあることが示された。また、免疫系への影響、特にアレルギー反応系への影響に関する文献調査では、フタル酸類によるアレルギー性接触皮膚炎を誘発するものが3件、農薬のマラチオンのマスト細胞からの脱顆粒反応促進に関する物が4件、PCB暴露により、アレルギー性皮膚炎の増強したものが1件検索された。

A. 研究目的

フタル酸エステル類はプラスチックの可塑剤として広く用いられているが、近年環境ホルモンの一つとして注目を集めている。フタル酸エステルの生殖系や免疫系への影響はこれまでも報告があるが、即時型アレルギーへの影響は十分解析されていない。そこで本研究では、マスト細胞へのフタル酸エステル類の影響を解析することを目的とした。

B. 研究方法

マスト細胞はラットの培養粘膜型マスト細胞株 (RBL-2H3) 及びマウス骨髄由来マスト細胞 (BMHC) を用いた。ジニトロフェニル (DNP) 特異的 IgE によりマスト細胞を感作し、DNP を結合した BSA により刺激した。フタル酸エステルとしては、フタル酸ジブチル (DBP)、フタル酸イソブチル (DIBP)、フタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) を用いた。細胞内 Ca^{2+} 応答は fura 2-AM と蛍光分光器により、脱顆粒反応は β -hexosaminidase 活性により測定した。

C. 研究結果

- 1) フタル酸類のマスト細胞からの脱顆粒反応への影響: DBP、DIBP、DEHP のすべてが、濃度依存的にマスト細胞の抗原刺激による脱顆粒反応を増強した (Fig.1)。なお、ここで用いた濃度範囲(5-500 μ M)においては、3種のフタル酸エステルの RBL-2H3細胞への細胞障害性は認められなかった。脱顆粒反応は、 Ca^{2+} の流入により引き起こされることから、マスト細胞にフタル酸エステルを添加したときの細胞内 Ca^{2+} 応答を調べた。3種のフタル酸エステルそれぞれ 50 μ M 作用させた時のカルシウム応答の経時変化を図 2a に示す。3種の試薬の中では、

DBP が最も細胞内カルシウム上昇の程度が高く、刺激後 100 秒でほぼ最高に達した。3 種のフタル酸エステルによるカルシウム応答の用量による影響を調べた結果を図 2b に示すが、5 μ M では、3 種のフタル酸とも細胞内カルシウム上昇は引き起こさないが、50 μ M で、DBP による上昇が顕著となり、500 μ M では、DBP、DIBP とともにカルシウム濃度上昇を引き起こした。次に、RBL-2H3 細胞及び BMMC における抗原刺激及び DBP 刺激に対する細胞内カルシウム応答を調べたところ、どちらのマスト細胞においても 50 μ M DBP の添加は、細胞内カルシウム濃度を緩やかに上昇させ、引き続き抗原刺激に対しても相加的な応答を示した (Fig. 3a,b)。次に、フタル酸エステルにより放出されるカルシウムの供給源を調べるために、細胞外 Ca^{2+} 非存在下で、RBL-2H3 細胞を刺激した (Fig. 4)。その結果、細胞に DBP を添加したところ、一過性の Ca^{2+} 応答が観察され、細胞内ストアからのカルシウム放出が促されることが観察された。その放出は、抗原刺激時に放出される Ca^{2+} 応答と競合しないことが示された (Fig 4a)。また、抗原刺激によるカルシウム応答は、小胞体の Ca^{2+} -ATPase 阻害剤である thapsigargin (TG) 感受性であったのに対し (Fig. 4b)、DBP による Ca^{2+} 放出は TG に非感受性であった (Fig 4c)。また、TG と DBP により処理した RBL-2H3 細胞においては、その後のイオノマイシン処理によるカルシウム応答が消失した (Fig. 4c)。

- 2) 次世代影響化学物質の免疫系への影響のデータ調査：次世代影響化学物質の免疫系特にアレルギー反応系への影響に関する文献調査を行った。アレルギー影響を示す文献は、免疫影響を示す文献の中では、比較的少数で、フタル酸類によるアレルギー性接触皮膚炎を誘発するものが 3 件 1-3)、農薬のマラチオンのマスト細胞からの脱顆粒反応促進に関する物が 4 件 4-7)、PCB 暴露により、アレルギー性皮膚炎の増強したものが 1 件 8) 検索された。それぞれの論文の概要を Table 1 に示す。

D. 考察

- 1) 環境ホルモンとして知られるフタル酸エステル類の中には、高濃度でマスト細胞の細胞内 Ca^{2+} 応答を惹起し、抗原刺激による脱顆粒反応を増強する作用のあることが示唆された。また、DBP により放出される Ca^{2+} は、小胞体とは異なる細胞内ストアから放出されていることが示唆された。また、単一細胞を用いた研究から、DBP によるカルシウム応答がオシレーションの様式をとることも示されつつある。フタル酸エステルの RBL 細胞への作用機構が、エストロゲン様の作用によるものであるかについては、さらに検討が必要と思われる。
- 2) 次世代影響化学物質の免疫系特にアレルギー反応系への影響に関する文献調査では、ダイオキシン類による、胸腺の萎縮をはじめとするリンパ球の機能抑制をはじめ、リンパ球の分化、活性化の抑制影響を示す文献は多く存在するが、アレルギー反応系への影響を示す論文は少なかった。今後、疫学調査もすすめば、更なるデータの蓄積がなされてくることが、期待される。

E. 結論

アレルギー反応に関与するマスト細胞への環境化学物質の影響評価研究として、平成12年度は、次世代影響リスク評価候補物質の中から、フタル酸エステル類に、マスト細胞からの脱顆粒反応を増強する活性のあることが示され、細胞内カルシウムストアからのカルシウムを放出する活性を有していることも判明した。また、内分泌攪乱物質のアレルギー反応系への影響に関する文献調査では、フタル酸類によるアレルギー性接触皮膚炎を誘発するものが3件、農薬のマラチオンのマスト細胞からの脱顆粒反応促進に関する物が4件、PCB暴露により、アレルギー性皮膚炎の増強したものが1件検索された。

References

- 1) Wilkinson SM et al. (1992) Allergic contact dermatitis from dibutyl phthalate, propyl gallate and hydrocortisone Timodine. *Contact Dermatitis*. 27, 197
- 2) Hills RJ et al. (1993) Allergic contact dermatitis from di-isodecyl phthalate in a polyvinyl chloride identity band. *Contact Dermatitis*. 29, 94-5
- 3) Walker SL et al. (2000) Occupational contact dermatitis from headphones containing diethylhexyl phthalate. *Contact Dermatitis*. 42, 164
- 4) Rodgers K. and Xiong S. (1997a) Effect of acute administration of malathion by oral and dermal routes on serum histamine levels. *Int.J.Immunopharmacol.* 19, 437-41
- 5) Rodgers K. and Xiong S. (1997b) Effect of administration of malathion for 90 days on macrophage function and mast cell degranulation. *Toxicol. Lett.* 93, 73-82
- 6) Rodgers K. and Xiong S. (1997c) Effect of administration of malathion for 14 days on macrophage function and mast cell degranulation. *Fundam. Appl. Toxicol.* 37, 95-9
- 7) Xiong S and Rodgers K (1997) Effects of malathion metabolites on degranulation of and mediator release by human and rat basophilic cells. *J.Toxicol.Environ.Health.* 51, 159-75
- 8) Guo YL et al (1999) Chloracne, goiter, arthritis, and anemia after polychlorinated biphenyl poisoning: 14-year follow-up of the Taiwan Yucheng cohort. *Environ. Health Perspect.*, 107, 715-719

F.研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

中村亮介、手島玲子、澤田純一（2000）：マスト細胞のCa²⁺応答及び脱顆粒反応に及ぼすフタル酸エステル類の影響。日本薬学会第121年会，札幌，3月、講演要旨集 p189

Table 1

次世代影響化学物質のアレルギー反応系への文献調査

1) フタル酸類

Wilkinson SM et al (1992) allergic contact dermatitis from dibutyl phthalate

Hills RJ et al (1993) allergic contact dermatitis from di-isodecyl phthalate

Walker SL et al (2000) contact dermatitis from diethylhexyl phthalate

2) マラチオン

Rodgers K and Xiong S. (1997a) acute administration to mice → serum histamine ↑

Rodgers K and Xiong S. (1997b) 90 days administration → mast cell degranulation

↑

Rodgers K and Xiong S. (1997c) 14 days administration → mast cell degranulation

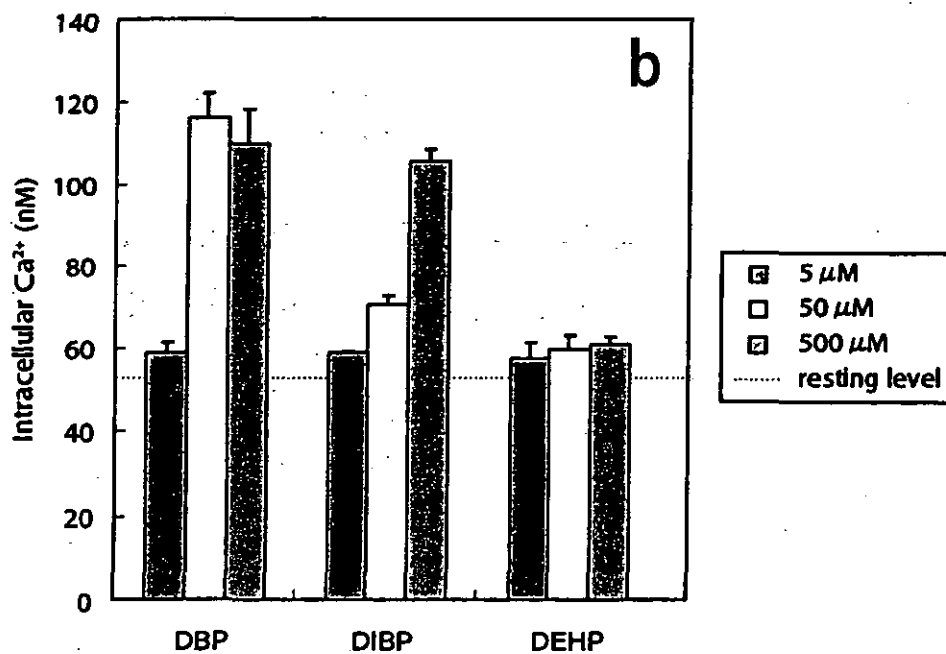
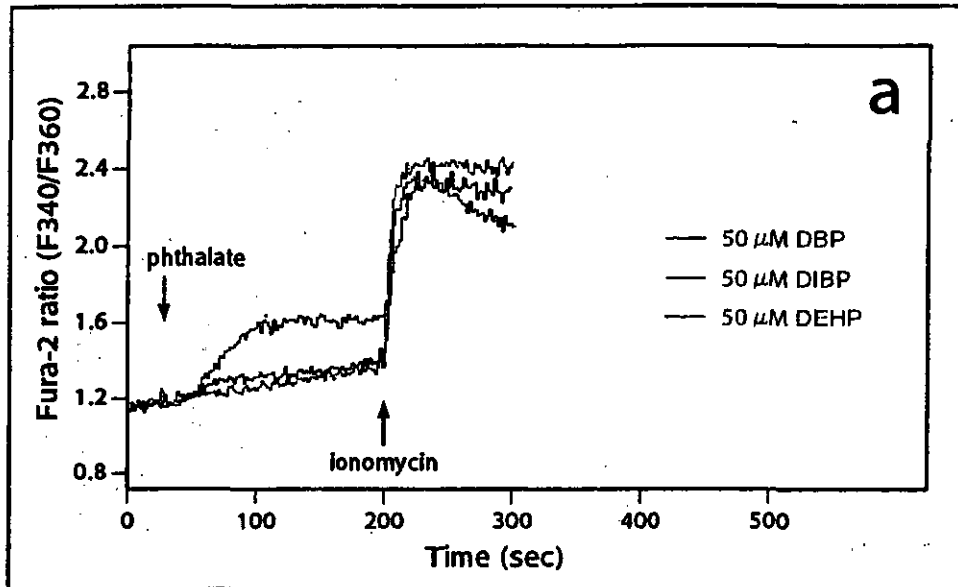
↑

Xiong S and Rodgers K (1997) in vitro mast cell degranulation ↑

3) PCB/PCDF

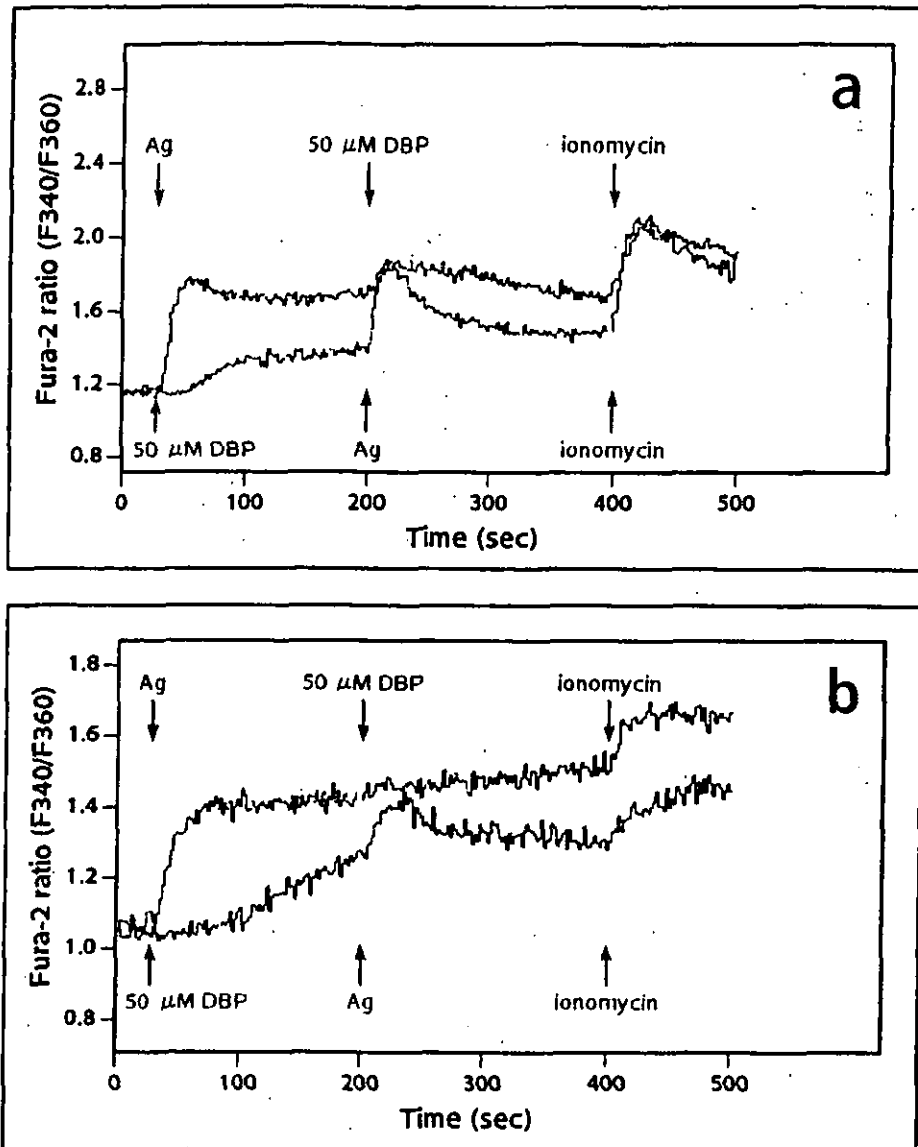
Guo YL et al (1999) 14-year follow-up of Taiwan Yucheng cohort → anemia, arthritis, skin allergy, goiter, chloracne ↑ in the PCB/PCDF-exposed men and women

Fig. 2. RBL-2H3マスト細胞のCa²⁺応答に及ぼすフタル酸エステル類の影響



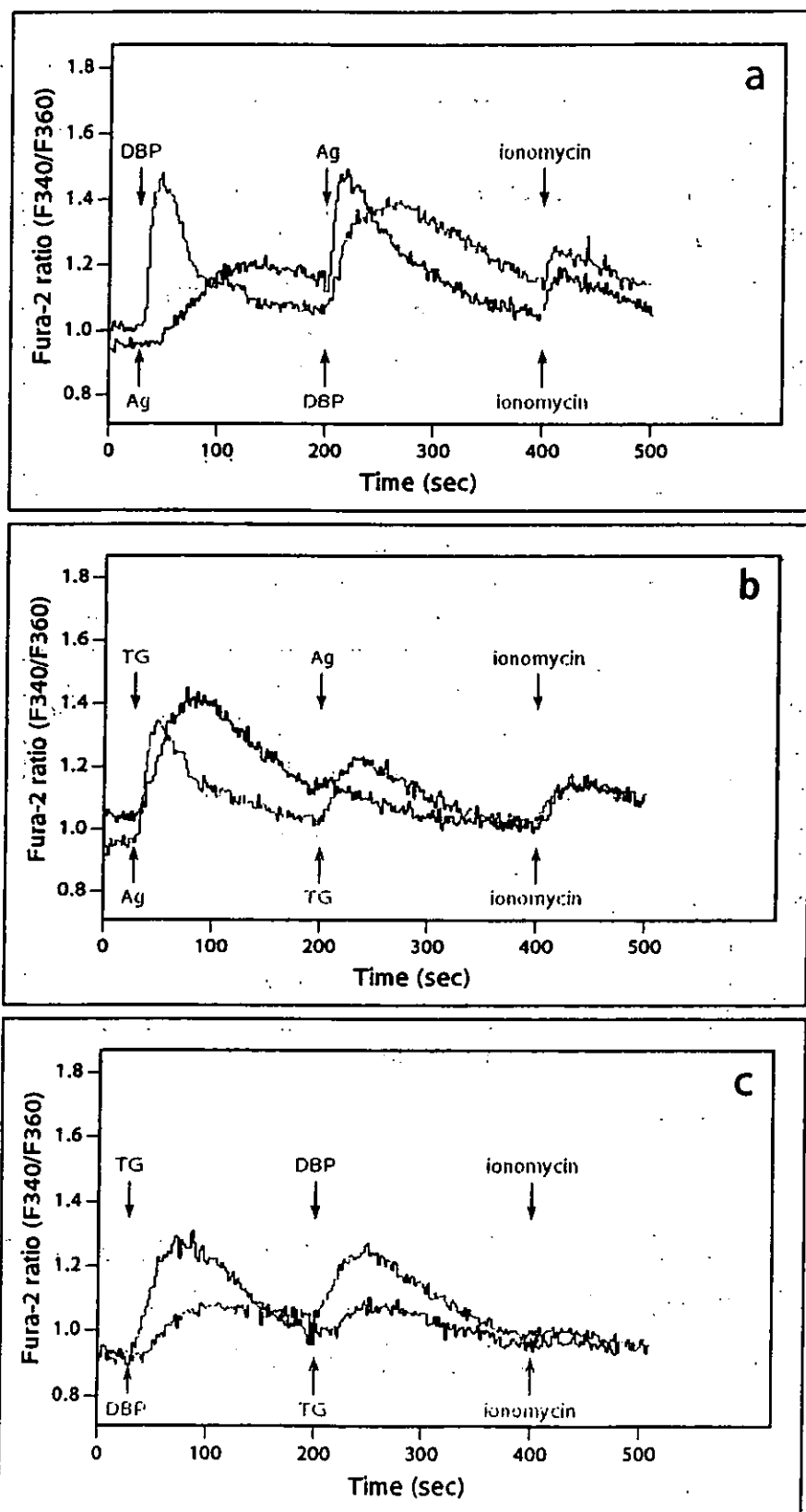
a: RBL-2H3細胞をfura-2 AMで標識し、蛍光分光器によりF340とF360の比（細胞内Ca²⁺濃度）をモニタしながら図に示した時点で薬物を添加した。b: フタル酸エステル添加から100秒経過した時点の細胞内Ca²⁺濃度。

Fig. 3. マスト細胞のCa²⁺応答に及ぼすDBPの影響



a: RBL-2H3細胞の細胞内Ca²⁺濃度変化。b: BMMCの細胞内Ca²⁺濃度変化。どちらの場合も、DBP添加により緩やかに細胞内Ca²⁺濃度が上昇している。抗原刺激はこれに相加的な効果を示す。

Fig. 4. DBPに应答するRBL-2H3細胞内Ca²⁺ストアの解析



細胞外 Ca²⁺ 非存在下における RBL-2H3 細胞の各種刺激に対する応答。
TG: thapsigargin (20 nM)。小胞体 Ca²⁺-ATPase の不可逆的阻害剤。

薬剤による環境水の汚染に関する調査研究

— 天然および合成エストロゲンによる汚染 —

研究者 松木容彦、今井 清 (財)食品薬品安全センター秦野研究所

研究要旨

近年の医薬品開発の進展に伴い使用される医薬品の品目や製造量の増加に伴い、ヒト治療用医薬品や動物薬品の糞尿排泄あるいは使用後の余剰薬剤の廃棄による排水、河川水および地下水などの汚染に関する問題は世界的関心事となっている。このような医薬品による環境水汚染に関しての各国での調査活動状況を調べることを目的とし、その作用から特に次世代への影響を与えることが危惧される天然エストロゲンと合成エストロゲン剤に着目して文献調査を行った。その結果、日本を含め、各国での環境水汚染レベルとしては、天然エストロゲンレベルが合成エストロゲンレベルに比し高い状況にあり、各国ともおよそ数 ng/L～数十 ng/Lにあることが判り、河川流域の近隣に棲息する魚に対してビテロゲニンを発現させるエストロゲンレベルを示す地域もかなり認められた。また、天然および合成エストロゲンの環境水汚染レベルには両化合物の水への溶解性の違いに基づいた季節変動が認められている。さらに、下水処理プラントにおける処理法の違いによりエストロゲン除去能が異なり、一般的に合成エストロゲンの方が天然エストロゲンよりも除去能が低い傾向が認められ、一部の地域の飲水でもエストロゲンが検出されている。しかし、現在飲水中に検出されるエストロゲンレベルではヒトの健康への影響はないとしている。

A. 研究目的

現在世界各国で、いわゆる環境ホルモン化学物質、ダイオキシン、PCB、DDT、ビスフェノールA、ノニルフェノール、フタル酸エステル、トリブチルスズ、植物性エストロゲンならびにエストロゲン製剤等の内分泌ホルモンかく乱作用による野生生物への影響ならびに環境汚染状況の調査、さらにはこれらによる生態系やヒトの健康への影響に対するリスク評価の検討など、様々な方面からの研究が続けられている。

ヨーロッパ諸国あるいは米国を中心にすでに二十数年程前から、医薬品あるいは動物用医薬品などについて使用済みの余剰薬剤、ヒトや家畜の糞尿排泄由来の天然エストロゲン類および合成エストロゲン類の下水等への排泄あるいは廃棄等による河川汚染や養殖場での飼料への添加薬剤による海水汚染が与える水棲動物への影響、あるいは飲水や食物を通じてこれら汚染医薬品のヒトの健康への影響が危惧され、特に病院や家庭を中心とした排水や下水処理場における流入水あるいは流出水中さらには飲水中の種々の医薬品や天然エストロゲンなどの汚染濃度の実態調査が行われている(表1、2)^{1,2)}。しかしながら、我国においてはこのような医薬品や天然エストロゲンによる環境水汚染に関する実態調査報告は極めて少ない。

今回は、極めて低濃度レベルで水棲動物の生殖発生や胎児あるいは乳幼児の健康や生殖への影響を与える可能性の高い天然エストロゲン（内在性エストロゲン）および合成エストロゲン類の環境水汚染に関する国内外での調査実態ならびにこれらエストロゲン類の活性汚泥中での微生物分解、排水中での光分解あるいは酸化分解さらには下水処理プラントでの除去能などに関する情報について文献調査を中心に行った。その他、ヒトでの天然エストロゲンおよび合成エストロゲンの代謝、排泄ならびにわが国で現在生産されている合成エストロゲンの種類や生産量あるいは適応についても調査したので併せて報告する。

B. 研究方法

医薬品およびエストロゲンによる環境水汚染に関する情報を得るため、予め Current Contents ならびに RTECS (Registry of Toxic Effects of Chemical Substances) をもとに調査したが、該当文献は検出できなかった。ついで EPA (United States Environmental Protection Agency) の Internet-Home page より Environmental Science Division : References relevant to PPC Ps in the Environment を開き、関連文献を 105 件選択した。ただし、上述の Home page 中の入手困難なあるいは記載頁が不明確なレポートは入手しなかった。入手した文献の中からさらに孫引きで適切な関連文献の入手を図った。今回はこれらの文献と参考図書を中心に、特に天然エストロゲンおよび合成排卵抑制剤の化学的性状、代謝、排泄、分解、環境水汚染状況などに関する調査を行い、概要を作成した。

C. 研究結果

1. 使用済医薬品の取り扱い、廃棄処理の状況（アメリカでの調査）⁹⁾

1996 年にピッツバーグ毒物センター (Pittsburgh Poison Center) において 500 人の一般人と 100 ケ所の病院薬局関係者や薬剤師協会に対して使用期限切れの薬剤をどのように処理しているかについての電話聞き取り調査を行っている。その結果、一般市民では、その 1.4% は薬局に返却する、54% はごみ箱へ捨てる、35.4% はトイレや台所排水に捨てる、7.2% は薬剤を捨てないでそのまま所有している、2% は全量使用するとの回答が得られている。一方、調査した 100 機関の薬剤師の 3% は未使用薬剤の処理法に対する適切な考えに従って処分していたが、多くの場合、製造会社に返却すると回答している。また、返却できなかった薬剤の処分法としては 15% は焼却処分を、また、17% はバイオハザード廃棄処理業への引き渡し、残りの 68% はごみ箱、流しやトイレへ捨てるといった回答が得られている。適切な薬剤処理法に関する情報を消費者に伝えていた薬局は全体のわずか 5% であった。このような未使用あるいは期限切れの薬剤処分状況調査結果から、アメリカでは廃棄薬剤処理法に関するガイドラインの作成ならびに毒物情報センターや薬局による安全な廃棄法に関する消費者への情報提供ならびに教育の必要性が提言されている。

2. 天然エストロゲンおよび合成エストロゲンの名称、物性ならびに構造

今回調査の対象した主な天然エストロゲンおよび合成エストロゲンの化学名、物性および構造を表 3 および図 1¹⁶⁾ に示した。

3. エストロゲン曝露によるエストロゲン作用発現と生殖発生への影響

環境水中エストロゲン汚染による水棲生物への作用に関連する報告は少なくない。1993年、Sharpe and Skakkebaek により睪丸がんの増加や雄の雌化現象は食物や飲水中に含まれるエストロゲン等の影響によるとの指摘がなされ⁴⁾、ついで Purdom ら (1994) や Harries ら (1996, 1997) によりイギリスの Lea 河川領域での実験において、排水処理場の下流に棲息する雄のニジ鱒にビテロゲニンの発現が認められ、このエストロゲン作用を有する排水の発生源は家庭用排水が主であるという報告がなされた^{5,7)}。また、Purdom (1994) らや Sheahan ら (1994) は、エチニルエストラジオールは、0.1 ng/L でニジ鱒のビテロゲニンレベルを上昇させ、エストロンやエストラジオールに比べてエストロゲン作用が著しく高いことから排水中のエチニルエストラジオールレベルは特に注目すべきとしている^{8,9)}。

1996年に Roembke らは、フタル酸エステル、PCBs ダイオキシン、植物性エストロゲンならびにヒト由来エストロゲンなどの曝露が体内のホルモンシステムのバランスをくずすと指摘している⁹⁾。また Folmar ら (1996) は、アメリカでの調査において市の下水処理場下流に棲むコイの大部分にプラズマビテロゲニンの上昇を認めている¹⁰⁾。さらに Jobling ら (1996) は、エチニルエストラジオールが 2 ng/L レベルで雄魚にビテロゲニンの発現と睪丸成長抑制作用を示したことから、エストロゲン製剤の環境汚染レベルはエストロゲン作用を十分発現するレベルとしている¹¹⁾。

1998年、Routledge らは雄魚にエストラジオール 10 ng/L およびエストロン 100 ng/L で同レベルのビテロゲニンが誘発され、また、エストラジオールとエストロンを各 25 ng/L 混合した場合にはビテロゲニンの誘導に、両者の相乗的作用がみられると報告している¹²⁾ (図2)。また、雄のニジ鱒では 100 ng/L 曝露で血中ビテロゲニンレベルは 2.6 ± 0.5 mg/mL に達すること、ローチ (コイの一種) への同用量曝露では $60 \mu\text{g/L}$ (ニジ鱒の 1/30 程度) と低いレベルであり、種差のあることが、さらに、ニジ鱒へのエストロンとエストラジオールの併用時 (各 25 ng/L) には投与後3週間で急激なビテロゲニン濃度が上昇 (投与初期の 150,000 倍) して 17.4 ± 6 mg/L に達し、最終的にはおよそ 50 mg/mL まで上昇し、併用投与により相乗的作用が現れることが報告されている¹²⁾。

その他、北アイルランドの農業分野での調査では、家畜での過エストロゲン症の原因が、サイロに貯蔵されている飼料 (鶏糞を含む) 中に高レベルに含まれていたエストラジオールとエストロンによることが示されており、飼料検査の結果、エストラジオールとエストロンの総レベルは 317 ng/g であったことが確認されている¹³⁾。

一方、環境由来の種々のエストロゲン作用化学物質曝露によるヒトでの生殖・発生への悪影響が危惧され、動物を用いても性ステロイドホルモン曝露による生殖・発生や生殖機能への影響について多くの実験的研究結果が報告されている。ラットの実験結果から、エストロゲンの催奇形成作用は、半陰陽性変化が主であり、エストロゲンが生殖器の分化時期に投与されると、雄胎児はミューラー管由来臓器と雄性型外生殖器を保持する傾向を持ち、その際、雄性構造が抑制され、雄生殖器の雌化が起こること (逆にアンドロゲンを投与すると、雌胎児にウォルフ管由来臓器の保持と雄性型外生殖器へ分化が起こる) が知られている。たとえば、妊娠ラットへのエストラジオール投与においては、エストロゲン誘発性の雄胎児の外生殖器の雌性化が報告されており、精巣は雌の卵巣と同様の位置に停留し、精巣上体、精管、精囊、前立腺の萎縮や欠如が認められる。

また、マウスでは妊娠 11 日～17 日にエストラジオールを投与すると雄胎児の腹腔内にウォルフ管とミュラー管の遺残を伴う卵精巣と腹腔内精巣が認められる¹⁴⁾。

ヒトでのエストロゲン過剰疾患の臨床的知見としては、男性における性欲の減退、女性様乳房、インポテンツ、女性における月経間性器出血、月経過多などがあげられる。その他にも、輸入食肉中に残留する家畜肥育ホルモン剤摂取による幼児の性早熟化なども知られている¹⁵⁾。

4. 天然エストロゲンの代謝と糞尿中排泄

エストロゲンの代謝¹⁴⁾

主に性腺あるいは妊娠中の胎盤で生成分泌されるエストロゲンは主として肝臓で、また、一部は腎臓、腸管、皮膚などで代謝され、尿中、糞便中に大部分は硫酸エステルあるいはグルクロン酸抱合体として排泄される(図3)。肝で代謝、抱合を受けたエストロゲンの約 50%は胆汁中に排泄され、その 90%は腸肝循環を行い、最終的には尿への排泄が中心であり、エストロン、エストラジオールならびにエストリオールとそれらのサルフェートおよびグルクロニドが主である。ヒトでの放射性標識エストラジオールの尿中への回収率は 80%であり¹⁶⁾、また、投与エストラジオールの 7%が糞中に排泄されるとしている¹⁷⁾。妊娠末期には、エストロゲン生成が活発化し、胎盤では胎児副腎由来のアンドロゲンである DHA-S (dehydroepiandrosterone sulfate)から 16 α -OHDHA-S (16 α -hydroxydehydroepiandrosterone sulfate)を経て、エストリオールを多量生成する。妊娠末期のエストロゲン量は非妊娠時の 500 から 1000 倍に増加するが、その 90%はエストロゲン作用の低いエストリオールである。

エストロゲン活性の最も高いエストラジオールの代謝経路としては、酸化型のエストロゲンから 16 α -水酸化を経、エストリオールを生成する行程の他に 15 α -水酸化体を経てエストテロールを生成する経路、また、エストロンおよびエストラジオールの C-2 または C-4 位に水酸化を受けたカテコールエストロゲン、さらにそれらがメチル化されたメトキシ体生成経路が主である¹⁴⁾。

エストロゲンの尿中レベル

尿中に排泄されるエストロゲンの中、エストリオールが量的には一番多く、その大部分は抱合体である (E₃-16G : 68%、E₃-3G : 29%、E₃-3S : 5%、E₃-3S-16G : 3%)¹⁵⁾。

尿中エストロゲンレベルの臨床的測定法としては、尿を酸-加熱水解し、エーテル抽出後、E₃キットによる測定あるいは Kober 反応による比色定量法が一般的に用いられる。特に、各エストロゲンについては RIA や ELISA により測定されている。ヒト尿中エストロゲンの正常値を以下に示す¹⁵⁾。

エストロゲンレベル (RIA 法)			エストリオールレベル		
非妊娠	排卵期	45.1~93.4 μ g/day	妊娠	25~30週	5~20 mg/day
	卵胞期	7.2~23.5 μ g/day	妊娠	20~40週	20~70 mg/day
	黄体期	22.4~74.3 μ g/day			
	閉経後	18.5 μ g/day 以下			
成人男子		11.0~19.7 μ g/day			

一方、Williams and Stancel (1996) の報告によれば、エストラジオールの尿中排泄量は正常婦人の卵胞期では 25~100 μ g/日、黄体期では 10~80 μ g/日、閉経婦人では 5~10 μ g/日、妊婦では 30 mg/日としている¹⁸⁾。その他、牛、ブタ、馬、ヤギなど多くの家畜の糞尿にも大量のエストロゲンが排泄されていることが知られている。

5. 合成エストロゲンの種類、適応ならびに生産量^{15) 19)}

合成性ステロイドホルモン剤を表 4¹⁵⁾、5¹⁵⁾ に示した。

1) エストロゲン剤の適応¹⁹⁾

① エストロゲン製剤¹⁹⁾

わが国で市販されているエストロゲン製剤のうち、エストラジオールのエステル体 (安息香酸、吉草酸など) は注射剤として、エチニルエストラジオール (Ethinylestradiol)、メストラノール (Mestranol) は経口剤として用いられ、卵胞ホルモン作用を目的として無月経、無排卵周期症、月経量や周期の異常、機能性子宮出血、子宮發育不全、卵巣機能不全や不妊娠、更年期障害などの治療や乳汁分泌抑制目的に使用される。エストリオールには注射薬、内服薬、膣座薬があるが、更年期障害、膣炎、分娩時の子宮頸管軟化などに適応される。一方、非ステロイド系のエストロゲン剤のジエチルstilbestrol (Diethylstilbestrol) やヘキセストール (Hexestrol) は、前立腺癌治療に、また、ヘキセストールは前立腺肥大症にも適用される。その他、妊馬尿からの抽出物の結合型エストロゲンも種々の疾患に使用され、これはエストロン、エストラジオール、エクイリン (Equilin)、エクイレニン (Equilenin) などのエストロゲン活性物質の硫酸エステル複合体である。プレマリン (Wyeth-Ayerst 社) が代表的製剤であり (多くは 0.625 mg 含有)、これは更年期障害治療に広く用いられ、1995 年のアメリカでの調査では 500 から 1300 万人がホルモン補充療法に使用されている²⁰⁾。その他、アメリカでは何百万頭の牛の肥育ホルモンとしても用いられていることが知られている。

エストロゲン剤は、いずれも胃腸障害や血栓症、子宮内出血、肝障害などの副作用を有し、長期連用すると乳癌、子宮体癌などの発現や生育に悪影響を及ぼす。特に、妊娠中の使用は禁忌である。

② エストロゲンとプロゲステロンの合剤¹⁹⁾

エストロゲンとプロゲステロンの合剤は多数市販されており、両者の含量比は様々である。

エストロゲンとしてはメストラノールかエチニルエストラジオールかのいずれかである。エチニルエストラジオールの含量は通常 20~50 μ g (35 μ gが多い) であり、メストラノールはエチニルエストラジオールの代替として用いられるが、エストロゲン活性が低いので含量は多い。子宮内膜症への適用もなされるが、もっぱら経口避妊薬として用いられている。アメリカの調査では15~44才の女性、約1,000万人の女性がこれを使用しており²¹⁾ (Peterson, 1995)、製剤としてはエチニルエストラジオールと19-ノルプロゲステロンを含む¹⁸⁾。

③ エストロゲンとアンドロゲンの合剤¹⁹⁾

注射剤であり、エストロゲンとしてはエストラジオールかそのエステル体が、アンドロゲンとしてはテストステロンかそのエステルが配合されている。適応症は更年期障害、機能性出血、骨粗鬆症などである。長期間使用すると副作用として男性化作用が現れる。

④ 肥育ホルモン剤¹⁶⁾

1940年代、家畜の肥育ホルモン剤としてあるいは食欲促進を目的として安価で作用の強いジエチルスチルベストロールが用いられていたが、FDAはその使用を制限した。それに代わり、現在はエストラジオールやエストラジオールベンゾエートとアンドロゲン (trenbone acetate, testosterone propionate) やプロゲスチン (progesterone) の合剤が牛の耳介への埋殖 (パンチ) として用いられている。エストロゲン含量は20~40 mgである。

2) ステロイドホルモン剤 (医薬品) の生産量

我国において医薬品として1995年に製造された合成性ステロイドホルモン剤としては、錠剤と注射液を合わせると、テストステロン 41 kg、エストリオール 40 kg、プロゲステロン 12 kg、エストロゲン 30 kg である²²⁾。一方、動物薬としては国内で製造されているものとして、胎盤性性腺刺激ホルモン剤 486 L、複合ホルモン製剤 160 L、その他のホルモン製剤 1352 Lがあり、輸入品としてはその他のホルモン製剤 1701 Lがある²³⁾。主に妊婦や授乳婦用の医薬品として、また、繁殖用の動物医薬品として使用されている。わが国における1999年の合成性ステロイドホルモンの生産量は、テストステロン 25.9 kg、エストリオール 49.5 kg、プロゲステロン 12 kg、結合型エストロゲン 69 kg である (表6)²⁴⁾。

1995年のアメリカでの経口避妊薬、ホルモン補充治療薬および肥育ホルモン剤の年間生産量と販売量を表7に示した¹⁶⁾。

6. 合成エストロゲン剤の代謝と糞尿中排泄¹⁹⁾

臨床的に用いられている合成エストロゲン剤はエチニルエストラジオールとメストラノールの2者が多いが、他にエストロンサルフェート (Estrone sulfate) も用いられる。

エチニルエストラジオールはエストラジオールに比し、肝での初回通過効果は少なく、またエストラジオールやエクリンエストロゲンよりもエストロゲンリセプターへの結合親和性が大きい。メストラノールはエチニルエストラジオールのC-3のメチル体であり、エストロゲン・リセプターとの結合親和性は低い。

合成エストロゲン剤の代謝経路を図4に示したが、エチニルエストラジオールはエストラジオールの代謝と異なり2位の水酸化、それに続くメチル化が主経路であり、主排泄経路の尿中に

は2-ヒドロキシ体および2-メトキシ体が主としてC-3のグルクロニドとして、一部はサレフェートとして尿中に排泄される^{17,25)}。また、エチニルエストラジオールの代謝物の尿と糞への排泄割合はおよそ4:6であり、両経路への排泄量は投与量の91%が回収される²⁶⁾。また、糞中への未変化体の排泄は1~16%である²⁷⁾。その他の代謝部位としては、C-4、C-6およびC-16位への水酸化である。メストラノールでは、まず体内で脱メチル化を受けエチニルエストラジオールに変化し、活性エストロゲンになり、代謝される。また、エストロンサルフェートでは加水分解されエストロンに変換した後、これらのエストロゲンはさらに体内を循環し、主に肝で代謝を受け糞尿中に排泄される。

なお、Diethylstilbestrol (DES) は、1940~1950年代に流産防止、家畜の肥育ホルモンとして使用された発ガン性が確認され、現在は使用禁止されているが、一部前立腺がん治療に用いられている。その他、主として外国で用いられている合成プロゲステロン剤としては、C-18エチルステロイドである Desogestrel、Norgestimate、Gestoden がある。これらは3位の水酸化を受け、さらに、3-ketodesogestrel を経、trahydro-metabolite に変換し、さらに極性の高い代謝物に変化する。Norgestimate の場合は3位の oxime と17位の acetoxy 基が加水分解を受け、tetrahydro-norgestrel や他の水酸化を受け代謝される。Gestoden も同様 tetrahydro-metabolite と水酸化体が生成する。これらの合成プロゲステロン剤は今後日本でも使用される可能性が大きい薬剤と言われている。

7. エストロゲンの主な環境水汚染の発生源と経路^{1,2)}

これまで国外で調査されてきた環境汚染薬剤としては、ヒトの治療用医薬品と畜産や養殖を目的として使用される動物用医薬品が中心である。これら薬剤による環境水汚染源としては、主として病院や家庭での薬剤服用患者の糞尿の下水（病院：未規制、家庭：単独浄化槽）への放出、大学研究機関や製造工場からの排水、家庭等における使用後の余剰薬剤の下水への廃棄が主な汚染源とされる（図5）。その他、経口避妊薬やヒトや家畜の糞尿中へ排泄される天然エストロゲンあるいは投与された家畜の糞尿中へ排泄される動物用医薬品の地下水への浸透あるいは下水や河川への混入なども注目され調査対象となっている。また、これら薬剤や天然エストロゲンによる環境汚染経路としては、薬剤製造工場、出荷工場、病院ならびに家庭からの排水→下水→河川→下水処理施設→上水処理施設→水道水経路あるいは家畜排泄物中エストロゲンの牧畜地や農耕地からの地下浸透→地下水→井戸水経路、また、古いスラッジ（河川の底質）廃棄による土壌や地下水への浸出、さらには大雨や洪水による河川への直接混入経路などが一般的に考えられている。さらに、薬剤の環境移行経路過程において、その一部は微生物による生分解あるいは光や化学的酸化分解を受け、環境水中にはこれらの分解物と未分解薬物が混在した状態で残留する。

一方、家畜の肥育促進剤の食肉への残留や養殖場で飼料に添加して用いられる寄生虫駆除剤等の底質への貯留、さらには湖水あるいは海水の汚染も注目されており、また、農業用灌漑用水中の薬物については植物の成長に影響を与える可能性も指摘されている。

上述のように環境に放出されたヒトや動物に用いられる種々の薬剤は、下水処理プラントや上水処理操作さらには自然の濾過や分解などを含めた浄化システムによりその大部分は除去されるが、これらの除去システムをすりぬけた一部の薬剤、特に生理活性の高い混入製剤やエストロゲンなどは河川に棲息する魚や種々の生物の体内に取り込まれ、生殖器の形成や生殖機能への影

響を及ぼす可能性が多くの研究により指摘されている。また、飲水への混入により特に乳幼児や母体を通しての生殖器官形成期の胎児における生殖器官形成あるいは生殖機能への影響を与える危険性が危惧されている。

8. 環境水中での天然および合成エストロゲンの安定性ならびに下水処理プラントによる除去

避妊やホルモン補充療法に用いられるエストロゲン製剤の体内排泄物中の未変化体や代謝物ならびに使用後の残余薬剤さらにはヒトや動物の糞尿に排泄される天然エストロゲンなどによる環境水汚染の予測やリスク評価を行ったり、あるいは汚染低減策を講じる上ではエストロゲンの未変化体や代謝物あるいは分解物の水中での溶解性や下水処理装置による除去能に関する情報入手も重要な情報の一つとなる。

ヒトや家畜の糞尿から排泄される天然のエストロゲンならびにその代謝物のほとんどはグルクロニドやサルフェートの抱合体として排泄され、排水中あるいは下水処理施設では一部加水分解されて非抱合体として存在することは前述したが、この過程で加水分解が実際どの程度起こるか詳細な報告はない。1943年、Zondeck はエストロンとジエチルスチルベストロールの分解性について調べ、これらの化合物は自然酸化分解は極めて受け難いが、溶液中では黄色に変色し、非無菌処理操作下で得られた油状状態では室温でかなり短時間でそのほとんどが分解する（約90%）と報告している²⁸⁾。さらに、1964年、Hansen らは土壌に添加した放射性ジエチルスチルベストロールの分解性を¹⁴CO₂ 産生量を指標として調べ、3ヶ月で1.6~16%、6ヶ月で12~28%分解するとしている。また、32種の非病原性微生物中2種の微生物がエストロゲン活性を不活化することを明らかにしている。1965年、Stunm-Zollinger and Fain (1965) らは、土壌や排水中あるいは活性汚泥中にステロイドを炭素源とする微生物が存在し、それらが産生する酵素によりステロイドが分解されることを報告している²⁹⁾。1969年、Tabak and Bunch は、活性汚泥を用いて種々の培養条件下で天然エストロゲンと合成エストロゲンの分解について調べ、合成エストロゲンの方が微生物分解への抵抗性の高いこと、また、活性汚泥を加えない場合にはステロイドはほとんど分解されず、酸化的分解は容易に起こらないことを示し³⁰⁾、Zondeck らの報告を支持する結果を得ている。

Tabak ら (1981) は、アメリカの代表的な14箇所の排水処理プラント（活性汚泥使用）から得た未処理排水（流入水）と処理水（流出水）を用いて両者のエストロゲンレベルを比較し、活性汚泥処理によるエストロゲンの分解性を調べている³¹⁾。その結果、流入水および流出水のいずれにおいてもエストロン、エストラジオールあるいはエストリオールなどの天然エストロゲンレベル（流入水と流出水とのレベル：0.01~0.08 ng/L）に比べエチニルエストラジオール（流入水：1.21 ng/L、流出水 0.81 ng/L）レベルが高く、活性汚泥処理では合成エストロゲンの方が分解され難く、環境水に放出、残留され易いことを示した（表8）³¹⁾。また、夏季と冬季の排水中レベルの変動についても調査しており、その要因として気温の違いによりエストロゲンの溶解性が異なる点を指摘している。さらに、天然エストロゲンや合成エストロゲンの環境水中の濃度やそれへの残留性は、1) 溶解性、2) 分解性、3) 体内排泄時の未変化体と代謝物の割合、4) 排泄エストロゲン類の環境水中で加水分解や微生物分解による分解され難さなどの要因により決まると提言しており、事実、水に易溶な化合物はより微生物分解が受け易いことを確認している。また、難溶な化合物は分解され難く、沈殿、吸着等により徐々に環境水中に蓄積するとして

いる。

一方、Aherene ら (1985) はエストロゲンレベルが 17 ng/L である河川水について下水処理後得られる飲水中にエストロゲンは検出されなかったことから、エストロゲンが活性汚泥による処理操作下で分解すると報告している³²⁾。また、Shore and Shemesh ら (1988) はニワトリ糞の堆肥中のエストロゲンが 6 ヶ月間放置ではほとんど分解されないことを示している³³⁾。

1993 年、Shore らは農業灌漑用水路からの排水 (1.3 nmol/L) 中のエストロゲンレベルの *anaerobic* と *aerobic* (活性汚泥反応槽中) 処理下でのエストロゲンの除去能を比較し、両者で除去率が異なること、またこの処理水 (0.1~0.2 nmol/L) をさらに砂濾過することにより、エストロゲンが極めて低レベル (9±3 pmol/L) まで低減されると示している³⁴⁾。

上述の如く、エストロゲンが排水中や活性汚泥中でその一部が分解される事実は多くの研究者により示されてはいるものの、体内から主として抱合体として排泄される天然エストロゲン、合成エストロゲンならびにそれらの代謝物についてはそれらの下水処理過程でどの程度加水分解され遊離体を生成するのか、その他の分解によりどのような構造の分解物を生成するのか、さらにはそれら分解物のエストロゲン活性が有るのか無いのかなどについて調べた文献はみられない。

1999 年、Johnson らは、いくつかの仮定を設定した上で Desbrow ら (1998) の報告した³⁵⁾ イギリスの下水処理の流出水中のエストロゲンレベルに関するデータを基にしてそれぞれの河川近隣地域の人口構成と男女のエストロゲン排泄量 (男性、正常婦人、妊婦を区別) および排水量などに関する推定値を用いて、各河川地域にある下水処理場の処理能について評価している (表 9)³⁶⁾。各下水処理場で用いられている排水処理法 (浸透型フィルター、生物フィルター、曝気法、活性汚泥) 毎の除去結果からエストラジオールの除去については活性汚泥が生物フィルターより必ずしも優れていないことを示している。Desbrow らはエチニルエストラジオールについては生物フィルターでは十分除去できないことを示している³⁵⁾。また、Johnson らは有機綿を用いると効率良くエストラジオールが除去できる (81%) としている³⁶⁾。また、このように推定値を用いての算出法で得られた結果は³⁶⁾、アメリカでのデータ (除去率 50~70%)³¹⁾ やドイツでのデータ (除去率 58~91%)³⁷⁾、イスラエルのデータ (除去率 80%)³⁴⁾ とそうかけ離れた値でないとしている。

9. 天然および合成エストロゲンの溶解性

Kabasakalian ら (1966) はエチニルエストラジオールも含め 21 種のステロイドの溶解性について調べ、25℃、0.4~285 mg/L の範囲にあるとしている³⁸⁾。Norpoth (1973) は種々の排卵抑制ホルモン剤の溶解性は蒸留水中では 0.21~4.75 mg/L で、天然の尿中ホルモンでは少し溶解性が高く 5.75~13.25 mg/L であることを報告している (表 10)³⁹⁾。また、メストラノールの溶解性について蒸留水と汚水を用いて調べた結果、蒸留水への溶解性は高く、汚水では溶解性が低下し、その種類によっても異なることを示している (図 6、7)³⁹⁾。メストラノールおよびエチニルエストラジオールの蒸留水への溶解性はそれぞれ 205 μg/L と 4745 μg/L としている。その後、Tabak ら (1981) は蒸留水への溶解性について調べており、合成卵胞抑制ホルモンでは 0.16~4.83 mg/L であるとしており³¹⁾、上述の Norpoth らの値とほぼ近似した結果を得ている (表 11)³⁹⁾。さらに、天然エストロゲンは合成黄体ホルモンよりも溶け易く、また、プロゲス