

## 内分泌かく乱化学物質における低用量問題について 班会議参考資料

1996年にロンドン郊外のウェイブリッジ(Weybridge)で、内分泌かく乱化学物質に関する初めての国際会議<sup>1</sup>が開催されてから10年が経過した。同じく厚生労働省の内分泌かく乱化学物質に関する検討会<sup>2</sup>も第1回の検討会の開催以来10年を数える。この間、2002年には、世界保健機構(WHO/IPCS)がグローバルアセスメント<sup>3</sup>をまとめ、また1昨年(2006)11月には、ウェイブリッジ会議10周年を記念した欧州連合(EU)によるワークショップ<sup>4</sup>がヘルシンキで開催されて、関連した研究の進捗状況が報告された。これまでの検討結果によれば、内分泌かく乱化学物質問題は、さまざまな課題が、本節で取り扱ういわゆる低用量問題<sup>5</sup>と関連することが明らかになっている。そこでここでは、この約10年間の内分泌かく乱問題に対する取り組みを、向後の検討に資することを目的として、この低用量問題との関連において知見を整理することとする。

### 1. 一般的背景—ウェイブリッジ会議からヘルシンキ・ワークショップまで—

当時、ワニ、カメ、あるいはカモメなど種々の野生生物では、それぞれ血漿エストロジェンの減少、ヴィテロジェニン(下位脊椎動物の卵黄タンパク成分)の増加、あるいは卵殻の菲薄化等、様々な異常生態が観察され、それらがジコフォル、DDT、あるいはPCBsなど様々な農薬や化学物質によるとの危惧を惹き起こしていた<sup>6</sup>。これはさらに、ヒトで、尿道下裂のような小児の先天性奇形、俗に“切れる”といった表現で表される同じく小児の精神神経学的な情動障害、あるいは男性の精子形成異常、さらに乳がんや前立腺癌など内分泌器官での腫瘍発生の亢進にも関連があるものと危惧されることとなり、一層の注目を集めた<sup>7-8</sup>。

こうした中で1996年に開かれたEUの主催するウェイブリッジ会議では、WHOと経済協力開発機構(OECD)がそれぞれ役割を分担し、この問題に協力して取り組むことが申し合わせられ、そこでの課題のひとつとして、WHOは内分泌かく乱問題に関する世界的なアセスメント、「グローバルアセスメント」の編纂を20人ほどの編集委員を以て、3年計画で完成させることとなった。厚生労働省はこれに対して、編集委員を派遣するなど積極的に協力した。そこでは個々の事象のひとつひとつを文献にもとづいて検討する手法がとられたが、2002年、それまで、その存在そのものに疑念の投げかけられていたエンドクリン問題(後の、内分泌かく乱化学物質問題)に対して、これがすでに存在する既存の事象と考えられるべきことを結論し、国際的なピア・レビューの後、その結果を刊行した<sup>9</sup>。

この時点でのWHO/IPCS文書のまとめでは、野生生物に関しては、時間的・空間的に限定的ながら、環境中のホルモン類似作用性の化学物質によって、野生生物が種々の障害を受けていると考えられる事象が認められると指摘された。またヒトなど、ほ乳動物については4点、すなわち、

1) 身体が形成されて行く過程での曝露は、刺激に対する応答機能を恒久的に変化させてしまう可能性があること、

2) 成熟した動物への曝露は、ホメオスタシス（恒常性）によって補われ、表面的には顕著な影響を示さないかもしれないこと、

3) 発育段階の違いや季節変動などで同じホルモン様の影響が異なった結果を呈する可能性のあること、そして、

4) 内分泌系の異なった要素間でのクロストークにより予想外の影響を生ずる可能性のあることなどが指摘され、何よりも、前述の通り、内分泌かく乱化学物質問題がもはや仮説の問題ではなく、すでに存在する既知のことがらであって、従って、何らかの対応が必要なこと、などを骨子としていた。

グローバルアセスメントでの、「内分泌かく乱化学物質は、成獣には影響を起しにくいようである、しかし、胎生期や新生児期の形態形成期では、不可逆的影響を及ぼす可能性がある」との指摘により、各国のこの問題に対する取り組みは、具体的方向性を帯びて活発化した。一昨年末のヘルシンキ会議は、このものの刊行以後さらに5年を経て、欧州機構などのこの問題に関する研究支援が本格的に軌道に乗った中で行われ、あたらしい多くの有用な研究情報が紹介されることとなった。なお、ヒトのリスクが日常的には認められないとのグローバルアセスメントの結論と、野生生物の深刻な実態との乖離については、ここでは、「多くの内分泌かく乱化学物質が、経口的に摂取されるものと想定されるのに対して、ヒトの摂取する食物や上水ではその衛生管理が整っていることによって、結果として（ヒトへの曝露による）有害性影響が、事実上認められないのではないか」との考え方でまとめられている<sup>10</sup>。

## 2. 低用量問題をめぐる諸課題とその後の展開

以上が現在に至る内分泌かく乱化学物質問題の経過の概要である。この問題では、当時、そうした環境生物やヒトで危惧されるとする事象が、実際に実験動物で観察され得るのかという論点がまず取り上げられることとなった。毒性学では、実験的に比較的高用量域でもって生物反応とその無反応域を押さえて、それらの測定点より低い用量での生体影響は、その結果から外挿して予測するという手法をとっている。環境中での危惧される物質の曝露量は必ずしも高いとは思われないだけに、内分泌かく乱化学物質が、そうした低い用量の摂取量でヒトなどに生体影響を惹き起こすということはいわば想定外であった。そこで低用量における生体影響の有無は、そうした物質が従来の毒性試験を擦り抜けていた可能性と併せて、人々の大きな関心事となっていく。これが低用量問題の現象的な始まりであり、これにより身の回りの物質の低用量域における生体影響の検討が、内分泌かく乱化学物質問題のひとつの焦点となった。ここでは、まず、既存の試験法による内分泌かく乱化学物質と考えられるものの検出についての、毒性学領域での当初の認識にふれ、ついで、その後の低用量問題の認識の進展と対象となる諸物質、およびそれらの生体影響について、主だった所見を略述することとする。

【既存の毒性試験法による低用量域の内分泌かく乱作用の検出】 厚生労働省が2001年に発表した中間報告書の追補では、この既存試験法による低用量域の内分泌かく乱作用の検出の可能性について「現時点で、入手できる科学的知見からは、低用量域における内分泌かく乱作用を直ちに断定することには疑問がある」とまとめられている。つまり検出されていない。その後発表された結果でも、内分泌かく乱化学物質影響として危惧の指摘された既知の生体影響を確認した例は、既知の試験法でも、あるいはその一部

の観察条件を補強した改良試験法でも、調べられた限りで存在しなかった、と結論されている<sup>11)</sup>。

これを要するに、WHOのグローバルアセスメントでの結論やWHOの一連の報告は、先の低用量問題での取り組みのその後の推移を見ると、毒性試験領域では、必ずしもそのままは受け入れられず、少なからぬ識者の中でも、従来の試験法で確認されない「乖離現象」として納得されずにとどまった。そのことは、その後も「試験手順の不確実性問題」の究明の一環として、内分泌かく乱化学物質と想定される物質を用いた数多くの生殖毒性試験や発がん性試験が、つい先頃まで精力的に重ねられていることにも反映されている<sup>12)</sup>。

他方、こうした現象は、内分泌学的には、従前、ホルモン剤の開発などに用いられて知られていたホルモン影響試験法のひとつ、“子宮腫大試験”を、その頃、OECDが新たにとりあげることになった経緯からしても首肯されるとおり、この種の物質は、サイトカインなどの作用と同様に、比較的少量で高い生物学的活性を有することが、現象的にはある程度、予想されていた。それは、この頃、同じくWHOによって新たな試験法の開発の重要性が強調された所以でもある。そうしたいわば可逆性の生体異物相互作用が、不可逆的で、場合によっては継世代にもおよぶ、生体障害を惹き起こす可能性については、この時点ではまだ真剣な眼が及んでいなかったということと理解される。

グローバルアセスメントは、この点を、先の「乖離現象」としてではなく、総合的な見地から、さしあたりホルモン様物質に見られる特性の一般現象として、その生体影響の特徴を解説した。このことは、その後のこの“乖離問題”に対する虚心坦懐な研究を促し、新たな展開を導き出す役割を果たした。

ところで、受容体レポーターアッセイ法の進展に伴い、内分泌かく乱化学物質作用を、狭く受容体原生の生体影響として、高度の低用量作用を想定する考え方が検討され、スクリーニング系への応用がなされた。注目すべき点は、そうした受容体レポーターアッセイなどでホルモン様の影響の認められた物質でも、全体に共通した低用量作用に特有な生物学的指標のようなものは見出されず、内分泌かく乱化学物質として共通に概念づけられる作用も見いだされなかった。むしろ、様々な物質がそれぞれ別個の作用機構によって生体機構のかく乱に役割を果たしている可能性が窺われ、その中には、これまで知られていなかった様々な作用機序も見いだされてきた<sup>13) 14)</sup>。こうした内分泌かく乱化学物質問題の拡がりとは、この概念に含まれ得る化学物質を想定したときの、一般性のある試験法の開発が非常に困難であることを、同時に示唆していた。

【「低用量問題」とは<sup>15)</sup>】 研究の進展とともに明らかになった低用量問題の概念で特筆すべき点は、これが、想定される内分泌かく乱化学物質の諸性質として同時に取り上げられた、「反応閾値の有無」、それらの「相乗性・相加性の有無」、及び「高用量から低用量への外挿の妥当性」や「反応の線形-非線形用量相関問題」などの諸問題を構成要素とし、相互に密接な関連をもったいわば“ひとつながりの問題”であったことである。この立場から、閾値問題や相乗性・相加性、あるいは用量相関問題について通覧するとそれらの関連は、以下のようになる。

【閾値の有無】 閾値の有無に関する情報は実質的には生物統計学的に用量相関モデル型から導き出される。EPAのアール・グレイ(Earl Gray)は、抗アンドロゲン作用を持つ物質の種々の雌化指標が、同様のロジスティック・カーブもしくはS字状曲線をとっていて、調べた限りで測定値がベースラインレベル

まで接近した、つまりモデルは、無閾値反応に限りなく近いと想定された、としている<sup>16,17</sup>。このように体内環境でのホメオステシスから切り離れた実験系<sup>18</sup>では、in vivo 試験でさえも極めて低い用量で様々の反応を生ずることが分かってきた<sup>19,20</sup>。生体は低用量ホルモン様物質を検知しないのではなく、検知した上でこれに対応して反応する事実がやがて明らかになるに連れて、このような有処置 in vivo 試験の生体の低用量反応性の確認情報としての有用性が理解されるようになっていった。

閾値の有無の正確な結論はともかく、ここで見られたような生物統計学的な結果が、低用量影響の本態を解明する必要性を迫られる基礎となったことは疑いない。やがて生体異物相互応答を把握するための遺伝子発現観察の進展に伴って、肉眼的ないしは組織学的に観察されるよりも低い用量での生体反応が認められるようになってきた。さらに、生体反応の中にはそれまでの毒性試験における無作用量よりも低い用量における応答が見いだされると同時に、低用量特異的な反応も観察されるようになっていった。

**【低用量の内分泌かく乱化学物質の複合効果について】** こうした化学物質がたとえ弱い効果に留まるとしても、そして個々のそれが僅かな影響に留まったとしても、もし複合した場合に加算効果があるとすると、その影響はもはや無視できなくなると考えられる。これを相加性複合効果と呼んでいるが、化学物質の作用機序は物質毎に異なり、これまで一般論としては、そうした複合効果を想定することはなかった。しかし内分泌かく乱化学物質は、そもそも内分泌系に影響を及ぼすことの危惧される共通性のある物質として認識されていたので、これらでのそうした効果の有無は、従前からの検討されるべき課題として受け止められていた。

相乗性・相加性の有無に該当するデータとしては、かつてタフト大学のソト(Ana Soto)が複合アッセイ系確立の可能性を論じた報告<sup>21</sup>が原点と思われる。その後、結果が定まらなかったが、まとまった報告としては、2002年のロンドン大学のコーテンキャンプ(Andreas Kortenkamp)らの、試験管内反応に関する相加性についての報告が特筆される<sup>22,23</sup>。そこでは、幾つかの内分泌かく乱性を有すると考えられる微量の物質を一括して作用させたところ、個別に作用させたとき何らの内分泌かく乱性を示唆する作用の見られなかった用量の物質が、混合されることにより、女性ホルモンつまりエストロゲンにも匹敵する高いホルモン様生物活性を示したと云うものである<sup>24</sup>。

個体レベルの試験系でも顕著な相加効果がふたつのグループから報告されている<sup>25,26</sup>。いずれもデンマークにおける2007年のワークショップ<sup>27</sup>の成果で、クリスチャンセンらのそれは、抗アンドロゲン作用物質であるヴィンクロゾリン、フルタミド、およびプロシミダンの複合投与による混合体の投与動物群のみに見られた尿道下裂や肛門生殖突起間長の短縮などの指標での異常で、ライダーらのそれは、先のヴィンクロゾリン、プロシミダンの他、リヌロンなどの農薬ならびに、BBP、DBP、DEHPなどのフタレート類あわせて7種の複合効果を同様のエンドポイントで見たものである。ここで見られた相加性は、特異な共通性質を有する化学物質の組合せゆえに認められた特異な現象とする考え方も見られるが、類似ホルモン様作用のシグナルに関する限りこうした現象が否定できない、という現象にとどまったとしても、確定した事態は非常に重く、リスクアセスメント上、大きな検討課題を負う結果となったと云わねばならない<sup>28,29,30</sup>。なお、ここで試験の対象として用いられている指標(エンドポイント)はいずれも、低用量といっても、(当然のことながら)短期の試験アッセイ系で用量を10~100倍程度増量すれば個々に検出

の可能な用量レベルに設定して、そこでの相加性を実験デザインとしている。低用量作用における検討対象となる諸指標での被験物質の用量には、絶対的な低用量という概念があるのではなく、それぞれのエンドポイントの発現用量域に従って、異なってくることに留意する必要がある。

**【様々のホルモンとホルモン類似物質】** 以上のような認識に立って、眼を身の回りの物質に移してみると、人々の身の回りには、内分泌かく乱性の危惧される化学物質もさることながら、ホルモン物質、ホルモン類似物質そのものがたくさん存在している。もとより、生体ホルモンは、本来、低用量で作用し、また、用量、投与方法によってはある程度生体に有害性を及ぼし得る性質のものである。体内にはそのような影響を避けるためのより緻密な防護システムも備わっており、これが順調に機能していることが、外界からの影響を適度に収める要件となる。更年期女性の女性ホルモン低下に対するホルモン補充療法が、乳がんへのリスクなど種々の副作用を念頭において、ガイドラインに沿って慎重に行われることもそうした理由にもとづいている<sup>31</sup>。

他方、胚細胞期や胎児期・新生児期のような形態形成期にあたる、まだ機能が安定する前の時点では、その不可逆的な影響が無視できないとするデータが集積している<sup>32</sup>。この点は、思春期における影響についても同様と考えられる<sup>33</sup>。従って、これらにおける不全の有無などには、もとより注意を払う必要が求められている。因みに、ヒトでの発がん性に予防効果が期待され、ほぼ無制限に健康に良いかのごとくに理解されてきたいわゆる植物ホルモン(phytoestrogens)のひとつ、大豆イソフラボン<sup>34</sup>の場合も、その取り過ぎには、障害が惹き起こされる可能性が喚起されるようになっている<sup>35</sup>。従って、内分泌かく乱性の危惧される物質に対してこれまでとってきたリスクマネジメント上の慎重な対応は、適切にして妥当なものであったと考えることができる。

**【内分泌かく乱化学物質の共通分子マーカー】** こうした内分泌かく乱性を持つと考えられるものを物質的に通覧したとき、それらに何らかの共通した生体異物相互作用のようなものがあるのかについての検討も、従前からの課題であった。しかしリポーターアッセイなどを通じた検討が進むにつれて、内分泌かく乱化学物質作用全体に共通した低用量作用に特有の生物学的指標のようなものが見出されなかったことは前述の通りである。それは今日的には、内分泌作用が各種受容体にわたることのみならず、それらの作用機作が、後述する“内分泌器官の拡張”などを含む、今日でも計り知れない多岐に渡る現象であることを反映しているからだと考えられる。ともかくこれを見直す目的で、生体が曝露物質にどう反応しているのかを遺伝子の発現パターンで観察する試みが進んだ。そこでは、1万を超える遺伝子の発現状態を、対照群における反応と比較したところ、エストラジオール、DES(ジエチルstilbestrol)、オクチルフェノールなどの、女性ホルモン様の作用を持つと考えられている物質での発現観察を行ったにもかかわらず、それらの物質に共通して発現する遺伝子が意外に乏しいという結果であった<sup>36</sup>。こうした傾向は、ノニルフェノール、ビスフェノールA、ゲニシュタインなどの化学物質に共通の性質をもつ遺伝子をパイグラフのような方法で表した場合も同様で、それら3者に共通に発現の上昇したり低下する遺伝子が僅かに30個程認められるのみであった、との報告とも符合する<sup>37</sup>。すなわち内分泌かく乱化学物質と称する物質を一括する網羅的な特徴は必ずしも認められず、エストロゲン受容体遺伝子との相互作用指標を含め、マーカー指標は、限定的なスクリーニングを対象としたものにとどまることを意味している。

【低用量のビスフェノールAの生体影響について】 物質の方から見たとき、以前、塩化ビニルの可塑剤として、そしていまポリカーボネートやエポキシ樹脂の原料として広く使用されているビスフェノールAひとつをとってみても、これは使用量も多く、既に知られている認識の範囲でも危惧が小さくないので、数多くの研究が行われてきた。

このものには“弱いエストロゲン活性”があることが知られていたが、前述の複合効果でふれた物質と異なって、種々の毒性試験アッセイ系で無毒性量(NOEL)<sup>38</sup> 50mg/kg という値からも分かるとおおり、かなりの用量まで有害性指標が見いだされない点に特徴があり、排卵調整の目的で開発された人工女性ホルモンのエチニルエストラジオール (EE)などと同様、いわゆる低用量影響の議論の中心になる物質群に属している。もとよりEEの低用量での性周期への遅延効果がすでに知られているので、ビスフェノールAでの生体影響が“弱いエストロゲン活性”に留まるとは云え、これにモデルとしての関心が寄せられたことには必然性がある。結果として、発表された報文数も膨大である<sup>39</sup>が、その中で、ビスフェノールAの生体作用は、後ほど詳しく述べる通り、胎生期曝露にあつては“その濃度以下では毒性反応がないとされる用量(無作用量:NOEL)”よりもさらに低い用量でも行動影響や性周期の異常を引き起こす旨の報告がすでに見られたので、リスク上、十分な注意を要することが指摘されていた<sup>40</sup>。しかし毒性試験の結果からは、周知の通りこれを否定する報告が少なくない。直近の報告例でも、例えば、米国のヒト生殖リスク評価センター(CERHR)が各国の専門家に呼びかけて討論を行ったまとめ<sup>41</sup>によると、結果として収集された文献では、かなりの高用量まで試験がなされていたが、危惧のあつた奇形や出産障害は認められず<sup>42</sup>、受精能の低下も認められず<sup>43</sup>、前立腺の重量変化や、前立腺がんも見られなかった<sup>44</sup>。また短期試験とは云えないながらも、内分泌かく乱化学物質で指摘される思春期の早期発来などの蓋然性指標も確認されなかったとしている<sup>45</sup>。なお、ビスフェノールAの低用量での新生児の行動影響については、このCERHR報告でも否定していない。いま低用量での新生児の行動影響に注目が集まっている所以でもあり、こうした遅延性の後期効果に関しては認められる点に、注意しなければならない。

加えて、Rochelle Tylらの最近の2世代(マウス)や、3世代(ラット)の繁殖試験報告によれば、これらの試験アッセイ系で観察される指標に関する限り(従つて、仔動物の成長後の検索が不十分になるが)、やはり低用量影響は認められなかったという結果となっている<sup>46,47</sup>。このTylらの報告では、比較的<sup>48</sup>低用量域を含む試験がなされたが、高用量域における遅延性の無排卵が認められた以外に目立った影響は認められなかった<sup>46</sup>。これを、どのような状況の時、生体異物相互作用が不可逆的な調節異常につながつてゆくのかという視点に注目すると、この試験では、投与量の下限が3~30 µg/kg/dayに設定され比較的<sup>49</sup>低用量域を含む試験がなされたものの、経口・持続投与を採つたことにより、被検動物に反応の“不応性”を惹き起こした可能性や、“ウィンドウ効果の棄却”を惹き起こした可能性などが推定され、全般として、発生期の、確率論的で多様な発達シナリオをかく乱する、的確なターゲッティングがなされなかったのではないかと指摘されている<sup>48,49,50</sup>。これは先のノースカロライナ会議<sup>51</sup>でも取り上げられていた点であり、試験を行ったRochelle Tylの手順に問題があつたのではなく、試験アッセイ系そのものに内包している問題点に起因した乖離とも考えられる<sup>52</sup>。加えて、繁殖試験では、仔動物を生後一定の時期に屠殺するので、先の情動障害で注目されている危惧に応える試験デザインとしては、Tylの実験は、条件を充たし

ていないかもしれない。なお、同じデザインの試験で、17 $\beta$ -エストラジオール(E2)でも同様の結果であったと報告されている<sup>53</sup>。

そうした情報が錯綜している折、本年4月、米国の国家毒性試験計画(NTP)は、これまでの分析データ結果を審査した結果、もし小児が胎児期もしくは生下時の早い時期にビスフェノールAの曝露を受けるならば、それが低用量であっても当該の児の行動に深刻な影響を与える可能性がある旨の暫定レポートを公表した<sup>54</sup>。米国・食品医薬品局<sup>55</sup>をはじめ、カナダ健康保健省<sup>56</sup>および欧州食品安全機構(EFSA)<sup>57</sup>などは、この問題が、小児を含むヒトの実際の曝露量と、危惧すべき曝露量との隔たりの程度に掛かっているものと考えていたので、リスクマネジメント上の判断は、現状におけるそれぞれの領域での曝露量に応じて考えられるべきものとの立場で対応した。実際に用いられている“ほ乳瓶”の状況の違いなどとも相俟って、本邦での使用実態は、さし当たり危機回避の対象とはならないものと考えられるが、さらなるヒトへの健康影響評価と、何よりも早急な、曝露を中心とした疫学的検討が迫られている状況であることには相違ない<sup>58</sup>。

### 3. 高次生命系と低用量問題

内分泌かく乱化学物質問題を生体影響の方から検討する試みとして、内分泌系と平行して、神経・行動系、免疫・感染防御系を加えた高次生命系における横断的影響研究が、当初より、厚生労働省のメカニズム研究の一環として推進されてきた。それぞれの系では、その機能的特質は異なるものの、内分泌かく乱作用に共通した生物学的蓋然性が明らかになっている。

**【高次生命系】** 高次生命系とは、神経・行動系、免疫・感染防御系、そして生殖・核内受容体系などを対照とする複雑系を指している<sup>59</sup>。内分泌かく乱化学物質の生体影響研究では、女性ホルモンなどの受容体(ER)が普段から発現していて、しばしばこれらの組織で共通の補助因子の発現が認められる。併せてそれぞれの組織で長期のメモリー機構(記憶装置)も存在するので、神経・行動系、免疫・感染防御系、そして生殖・核内受容体系、の3系統を横断的に注目することの重要性が以前より強調されていた(図1)。その後、内分泌かく乱化学物質問題では、これら3系統のいずれの系でも共通する低用量域の様々な反応態様(モード・オブ・アクション=MOA)も見いだされるに至り、その意義に注目が集まっている。

**【神経・行動系】** とくに注目される点としては、前項でも指摘した通り、低用量のビスフェノールAによる神経行動影響の問題がある。すなわち、0.01~0.2mg/kg/dayという低用量のビスフェノールAで、種々の生体作用がマウスでもラットでも認められ、特に、神経行動異常を引き起こすことが明らかにされた<sup>60</sup>。これらの実験は、それまで“その濃度以下では毒性反応がないとされてきた用量(無作用量)”よりもさらに低い濃度での結果であったから、神経行動試験については、現在採用されている試験法そのものの再検討を促す要因となっており、関連した多くの試験法開発研究が進んでいる。因みに哺乳綱動物の雌雄は、中枢神経系における性分化の発達に伴って独自の行動パターンをとることが知られている。これに沿ってビスフェノールAの行動に対する影響を調べると、行動面で雄の雌化が起こっていることが示唆されることがわかった。このように、胎児や小児の形態形成期が、外来刺激に対して鋭敏であることは、内分泌かく乱関連研究の進展に伴って、はじめて明らかに成りつつある事柄でもある。神経と神経を繋ぐ

部分を構成するスパインという物質の形成にも影響を与える、という形態形成過程での可塑性にかかわる報告もなされている<sup>61</sup>。

形態形成期の胎児や子供に気を付けなくてはならないことは、もとより以前から指摘されていた。DESという物質は、実験的に再現性のある尿道下裂を引き起こす女性ホルモン作用をもった物質であるが、その投与時期に臨界点が、投与量に臨界量があることが想定され、ウィンドウ現象と呼ばれたことは前述の通りである<sup>62</sup>。因みにビスフェノールAが経胎盤移行をすることも、今日ではよく知られているが、井口らによって、妊娠17日目のマウスと、妊娠150日目のニホンザルを用いて、当時、明らかにされた知見である<sup>63</sup>。

**【免疫・感染防御系】** 内分泌かく乱化学物質に対しては、免疫系も敏感に反応することが明らかになっている。免疫系リンパ球の中のT細胞の母細胞にビスフェノールAを曝露すると、ヘルパーT細胞の亜分画同士の産生効率が変化し、それらの比率が異なってくることが証明されている。免疫系でそうした鋭敏な反応が認められることは、先のヘルシンキ会議でも強調され、警鐘を寄せられた。

高次生命系に焦点を当てた研究は、今後、重要性を増して行くものと考えられる。

#### 4. あらたに明らかになった低用量問題での今後の研究の必要性

すでに見たように、低用量問題は、従来の試験法が対象としていた毒性と異なった生体障害機構に基づくことが次第に明らかになってきた。それは、従来の化学物質が、直截的には生体分子の酸化や還元、DNAや脂質など高分子への付加体形成や架橋形成といった主として化学反応を基礎とした直接的構造変化で説明される影響に主眼をおいて試験・評価されてきたのに対して、内分泌かく乱化学物質では、むしろ生体内分子の変質、壊変を直接的な要因としない、低用量であるがゆえに生体の通常調節レベル下で進行する生理的シグナルの、これまで想定されてこなかった持続的かつ可逆的な調節不全であったということが出来る。これを毒性や傷害と一線を画し、“かく乱”という概念を導入して、その違いの理解を促したグローバルアセスメントにおける定義は、いかにも炯眼であったと云わねばならない。以上のような視点に立って、最後に、この10年間の低用量問題に関連する研究で新たに明らかになり、今後、特段の取り組みの求められている留意点について、特筆すべき主なものを取りあげて整理しておきたい。

**【あらたに見いだされる低用量での生体影響】** 毒性学における諸試験では、高用量の反応から直線回帰によって、低い用量での反応性を予測するのが一般的である。低用量作用が次第に明らかに成りつつある内分泌かく乱化学物質の作用曲線について、無作用量以下の低用量域で、外挿表徴型と異なった反応がないかについては、早くから議論があった。そして実際に既存のデータを整理すると、従来、無作用量とか、無毒性量と定めた用量よりさらに低い用量で、さまざまな所見が観察されることが分かってきた。

なぜ内分泌かく乱化学物質が、従来型の用量反応関係をとらず、U字型や逆U字型の反応曲線をとったり、非常に低用量レベルでの特異的反応を示したりするのかについては、当初、そのこと自体に疑念を投げかける声も少なくなかった。しかし様々の交差反応性ネットワークを形成する受容体群やコ・ファクター群での、至適の用量相関変域がしばしば相互にずれていたりすることや、用量の増加とともに受容体反応が飽和に達し不応状態になるといった現象が明らかにされるに伴って、問題点が整理され、そうした



反応曲線への理解が急速に進んでいる<sup>64</sup>。

かくして理解のギャップの埋められた事柄は少なくないが、他方この領域には、まだ人類の未知にとどまる事柄も多そうである。米国のEPAに所属する国立環境影響研究所(NIEERL)ではこの点を重視して、これまでのタイムラインよりも、より長期的な展望をもった基礎的研究課題を設定して、この問題の検討を続けている<sup>65</sup>。

**【低用量域で観察される確率論的な生体反応】** 低用量影響には、種々の試験法を適用すると、しばしば実質的な反応データとして認識されず、いわばノイズのような結果が見られることが稀ではない。低用量変化は頻度も低く、平均値をとるとしばしば背景データに隠れてしまうことが稀でないからである。これに対して、似たような現象が、例えばフェノバルビタールによるメチル化の結果から見いだされている。ミシガン州立大学のグッドマン(Jay Goodman)のフェノバルビタールによるメチル化という化学変化の形成確率は、これを平均すると実験群は対照群と差異が認められなかったが、ネズミー一匹毎に検出してみると、対照群と違って、個体毎に大きく異なった値が観察された<sup>66</sup>。こうしたフェノバルビタールによるメチル化はエピジェネティックな変化と呼ばれ、ここで認められた低用量におけるメチル化は確率論的に形成され、純系動物でも個体毎に同じ結果には成らない。エピジェネティック変化としてはクロマチン濃縮、ヒストン修飾、DNAメチル化など様々な修飾が取り上げられるが、内分泌かく乱化学物質における低用量反応を、こうしたエピジェネティックな現象として理解する考え方が急速に進展している<sup>67</sup>。この領域での今後の研究の進展を注視する必要がある。なお、こうしたエピジェネティックな変化がゲノムにインプリントされて、継世代変化として固定されてゆく可能性も現実の問題として論じられている<sup>68,69</sup>。

**【高感受性期—胎生期・新生児期・思春期の問題】** 形態形成期、すなわち機能的安定性の成立する前の、胎生期での影響に関して、無視できない不可逆的な事象が指摘されていることは前述した<sup>70</sup>。胎生期・新生児期・思春期問題には、低用量問題とのリンクを示すデータが少なからず見いだされており、グローバルアセスメントでも指摘された通り、新生児では、系によってはそれが不可逆反応として観察される<sup>71</sup>。

これに対して、遺伝子改変動物などによる過剰反応系動物でのみ検出され、野生型の成体で検知されない用量レベルにおける“新しい概念の影響”として、① 閾値問題、② 非線形の用量相関、あるいは③ 相加反応などの問題を見直す必要性に注目する考え方もある。内分泌かく乱化学物質の危惧の指摘された物質の生体影響研究では、影響メカニズムの解明が困難にもかかわらず、確認や追試の必要が生じることが少なくない。これに伴って、経過を追った系統的な情報収集の継続が必要である。

また、グローバルアセスメントでは触れられなかったが、性に関するホメオステシスの不安定な“思春期”についての、研究も、もっと注目されるべきと考えられる<sup>4</sup>。臨界期への暴露が与える影響の評価基準は、いまだ定まっていない。思春期の早発傾向を示唆する報告も認められ、今後の研究が求められている。

**【低用量レベルでの発がんの蓋然性】** 2006年11月、米国ノースカロライナ州で、ビスフェノールAのヒトの健康影響に関するリスクの評価のための、環境影響、試験管内試験、および動物実験結果相互の関連

を検討する専門家会議が開催された。そこでは内分泌かく乱化学物質によってがん(癌)が起りやすそうな体内環境の形成される可能性について、今後の検討が必要とのまとめになっている<sup>72</sup>。最近、女性ホルモンとダイオキシン類のひとつが、正常のmycという遺伝子と協同して、細胞を無限増殖へ導くテロメラーゼという酵素の活性を引き上げる<sup>73</sup>、という報文も発表されている。試験管内実験であってさらなる検討が必要であるが、こうした変化は、がん化の促進(プロモーション)につながる蓋然性を意味しているとも考えられるので、いずれにしてもこの方面での早急な検証が求められている。

内分泌かく乱化学物質の性質の1つとして、早期に思春期を発来させる可能性、とか、早期の老化を引き起こす可能性などの危惧も指摘されてきた。ビスフェノールAによる結果では、投与した動物の寿命曲線が、対照に較べて死亡が早期化し、傾きも急峻になる傾向があることが知られている。その真偽についてはまだ検証を要するが、これが正しいとすると、先に紹介した生殖リスク評価センターCERHRの判断とも乖離する結果となるので、これについても更なる検討が求められる。

**【内分泌器官の拡張】**この10年間に、従来、内分泌器官と呼んできた臓器以外にも、内分泌器官としての役割を果たしている組織が新たに見いだされてきた。膜受容体も広くそのカテゴリーに含まれる発見であった<sup>74,75</sup>。この発見は、オルファニデスラによって指摘されていた核内受容体で説明の困難だった、遺伝子機能を介さない即時性のノンゲノミック(non-genomic)な反応機構にもとづくホルモン様作用<sup>76</sup>の理解を助ける役割を果たした。さらに細胞内小器官である小胞体の膜にもエストロゲン受容体(ER)が局在し<sup>77</sup>、急峻な反応に対応することが明らかになってきた。これらの発見は、内分泌かく乱問題における、現状で未知の要因の介在を念頭に置いた検討を進めることの意義を喚起した。加えて肝臓とか、脂肪細胞とか、同じく内分泌器官と考えてこなかった臓器が、内分泌器官としての役割を果たしていることも明らかになってきた。例えばノニルフェノールという物質は、通常の方法で見ると極く弱い女性ホルモン様の作用をもっているが、肝臓に注目すると、女性ホルモンよりも、ずっと強い活性を持っていることが、井口らによって明らかになっている。この件は、肝臓を、内分泌器官と考えるべきか、という問題につながるが、こうした認識の変化についても今後の検討が求められる。脂肪織についても同様のことが指摘されている<sup>78</sup>。イボニシのような環境生物での内分泌かく乱の知られる有機スズが脂肪織産生を引き起こすことや、それらの機構に核内受容体の作用が影響していることなどは、これに相当すると考えられる。かくして、同じ受容体結合能を有するリガンド物質が、広範な標的受容体シグナル機構、さらにはまったく異なるフェノタイプに関わるコ・ファクターなどと相互作用を惹き起こすなど、先頃までの認識を書き換える驚くべき関係が浮かび上がってきている。

**【内分泌機能の概念の拡張】**内分泌器官の拡張のみならず、内分泌器官そのものの概念を変える事象も見いだされている。異物受容体と呼んでいるダイオキシン受容体は、エストラジオールが存在しない状態では、P300と名付けているタンパク分子の助けで転写活性化を担って、女性ホルモン様の作用をもつことが分生研の加藤等のグループによって発見された<sup>79</sup>。しかもここでは、エストラジオールがあるときは、この分子は、反対にユビキチン・リガーゼ(Ubiquitin ligase)とよぶ複合体を形成し、エストロゲン受容体を壊して、抗女性ホルモン様の役割を発揮することも分かった<sup>80</sup>。これは、ホルモン受容体でもない、異物受容体と呼ばれる生体内分子が、ホルモン様の作用を交差性に発揮するということであり、内分泌か

く乱問題の分子的基盤が、概念的に大きく拡大していることを意味している。この問題の生体影響面での大きさを認識する上で、この発見が内分泌かく乱化学物質の今後の生体影響研究に果たす役割には注目を要する。

## 5. おわりに

内分泌かく乱化学物質問題が取り上げられるきっかけになったことそのものは、化学物質のヒトや野生生物の生殖や内分泌機能への危惧にあった。やがてその可能性の原点がホルモン作動性の化学物質の低用量での影響にあるものとの認識に近づいた。しかしこれは従来の試験法では有害性が観察(=検出)されないなど、その基礎となるメカニズムがなかなか明らかにならなかった。

すでに見たように、これが従来の試験法で観察されなかった背景は、この低用量問題が、従来の試験法が対象としていた毒性と異なった生体障害機構に基づくものであったことによる。すなわち、従来の化学物質の毒性では、いわば、生体分子の酸化や還元、あるいはDNAや脂質などの高分子への付加体形成や架橋形成、などといった、主として生体物質の変質、壊変といった化学反応を基礎とした器質的構造変化に主眼をおいて、試験と評価がなされてきた。しかしこれに対して内分泌かく乱化学物質では、一般的性質としては生体内分子の変質や壊変といった構造異常は乏しく、むしろ曝露影響は、低用量であるがゆえに通常の生体の生理的調節水準下での微視的機能変化として進行し、次第に持続的調節不全に至る生体異物相互作用の調節異常に基づいている。すなわち機能不全の検出されない潜在性障害機構を背景としていた。

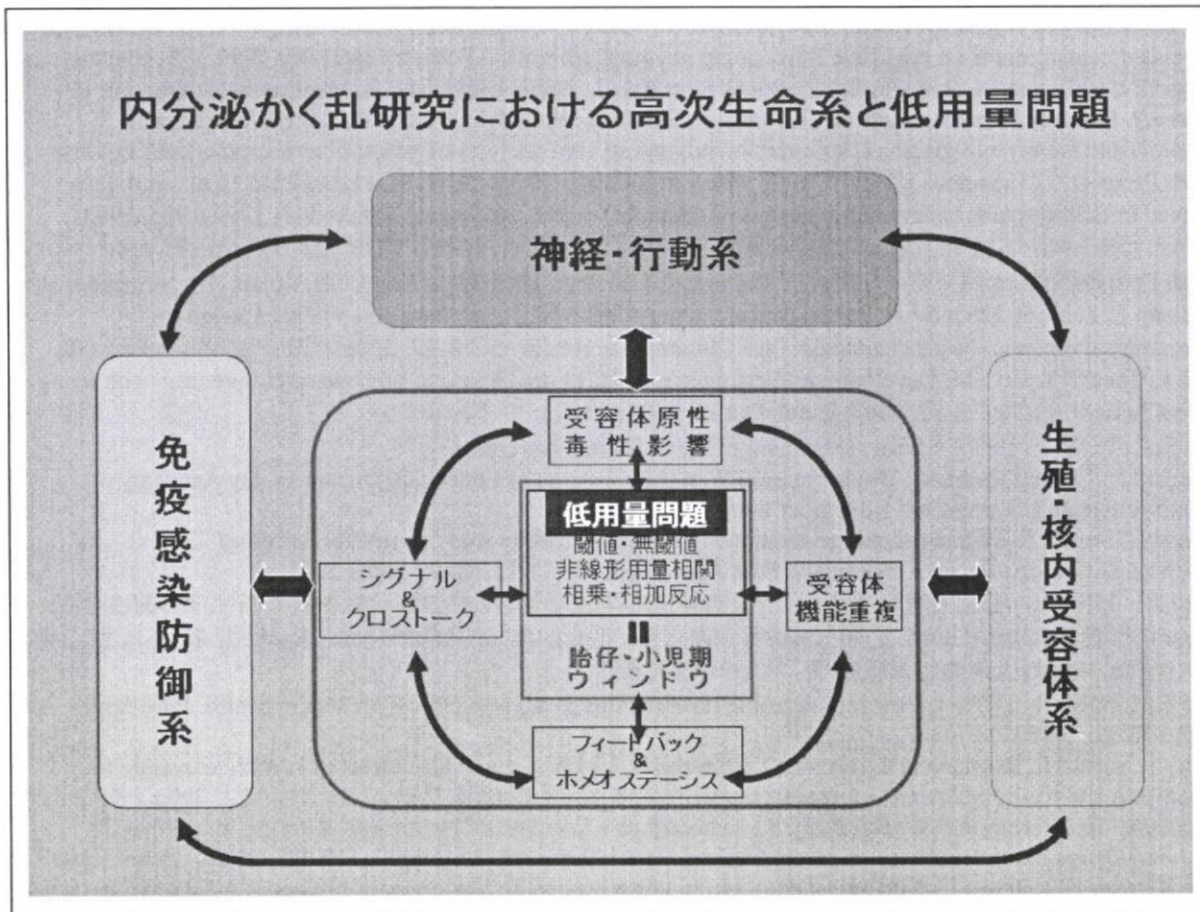
この問題の初期、胎生期のような初期形態形成期や、小児の生殖器系での二次性徴の形成期に限局して、内分泌かく乱現象が稀少な確率論的データとして報告された。これらはいずれも以上のような背景と結びついていたものと考えられる。今回見るような、フィードバック機構や可逆性の効く範囲の、むしろ低用量短期曝露にあってはじめて惹き起こされ、高用量では検出されないような毒性は、これまでの毒性試験では想定されて来なかったものである。低用量のビスフェノールAの胎児期曝露が、生後の神経行動系の情動異常を惹き起こす可能性が指摘されているだけに、早期の試験系の開発が期待されるが、低用量ビスフェノールAの項でも見たとおり、出版されたばかりの Rochelle W. Tyl らによるビスフェノールAの2世代試験でも、(比較的<sup>1</sup>低用量域を含む試験であったにも拘わらず)何らの影響も認められなかった<sup>46</sup>。今回このまとめでは、Tyl らの実験結果と一連の研究で導入されている条件の違いを、持続投与によるウィンドウ効果の棄却の可能性や、被検動物の“不応性”の惹起の可能性などを推定したが、仔動物での情動障害などがエンドポイントとして観察されていないことなども乖離の原因となっている余地があり、Tyl の結果の検証のためには多くの検討が必要である。あたらしい試験系の開発は、そうした認識に立って、展望が見いだされるものと考えられる。

低用量における生体異物相互作用の調節不全は、内分泌かく乱化学物質問題を契機として見いだされた、これまでの毒性学の標的になかった、あたらしい概念の“毒性現象”であり、従来の毒性学の方法論で解決し難い独自の研究課題を内包している。例えばこれらの調節不全を原理とした有害性では、通常の生体機能調節が、生理的範囲から異常状態に移行する境界が、振幅の中の変化のような、線引きの困難な

毒性学が未経験の境界を含んでいる。そうした境界には直接的な構造異常も即時的な機能異常も伴っていないと考えられるだけに、これを裏付ける生体分子シグナル機構の、より詳細な研究が必須となる。こうした事柄は、あたらしい毒性学が求められる課題の一例にすぎない。内分泌かく乱化学物質問題によって始めて見いだされたこのあたらしい生体障害の概念は、当初の想定を超えて、生体調節障害の全域に及ぶ課題の拡がりを含むしている。“化学物質の生体調節障害”という課題を対象としたあたらしい毒性学の確立のためには、さらなる概念の構築・整理と、対応する試験法の樹立が一層確かなものとなる必要がある。

低用量問題は、胎生期ウィンドウに密接に関連している。これは神経・行動学的不可逆性にも関連している。近年、毒性学の領域では、“こどもは小さな大人ではない”、ということが指摘されるようになった。WHOもこの点を重視して、内分泌かく乱化学物質問題の対象とし、あらたに、“こども”を事業目標の重点に据えている。この“こどもの特性”には、例えば胎生期小児期の薬物代謝の発達などに関連した成人との差異に基づくものとして、これまでも、“こどもの反応性”の脆弱で可塑的なモード・オブ・アクション (MOA) にもとづく安全係数の負荷の試み（例えば米国 EPA では、一定の判断のもとに5を除く）が行われてきた。しかしこうした試みは、むしろ“こどもを小さな大人”と扱ったものと考えられ、多分にその妥当性は限定的と考えられる。“こども”の問題が、質的に対応されなければならない本質は、今回本節で見てきたように、生体異物相互作用における生体の調節異常という新しい毒性が、発達期の胎児や形態形成期の小児で、不可逆性の変化を惹き起こしやすいという事実に基づいている。内分泌かく乱化学物質の今後の研究と施策には、こうした蓋然性に留意することが肝要である。

図 1



引用文献

- <sup>1</sup> European Commission: European Workshop on the Impact of Endocrine Disruptors on Human Health and Wildlife. Report of Proceedings. 2-4 December 1996, Weybridge, U.K.
- <sup>2</sup> 「内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会」平成 10 年 4 月設置。  
厚生省生活衛生局化学物質安全対策室編「内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会中間報告書」平成 10 年 11 月 (1998)
- <sup>3</sup> WHO/International Programme on Chemical Safety; Eds, T. Damstra, S. Barlow, A. Bergman, R. Kavlock, G.van der Kraak., Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors. World Health Organization, 2002, pp. 180. (<http://www.ehp.niehs.nih.gov/who/>). 邦訳は、厚生労働省ホームページ参照 (<http://www.nihs.go.jp/edc/global-doc/index.html>)
- <sup>4</sup> Academy of Finland/European Commission: Weybridge+10 Workshop, Impact of Endocrine Disruptors. November 8-10, 2006. Meeting Abstracts. pp. 111.
- <sup>5</sup> 詳細は後述するが、ここで言う「低用量問題」とは、いわゆるホルモン様作用物質の生体に対する作用が、多くの場合通常の試験法では検出されなかったという 2000 年 10 月、米国ノースカロライナ州で開催された低用量問題についてのワークショップでの認識を基礎にしている。注 10 も参照。
- <sup>6</sup> Colborn T, Dumanoski D, Myers JP: Our Stolen Future, A Dutton Book, 1996, Weybridge, UK, pp.128.
- <sup>7</sup> 井上 達. エンドクリン問題の最近の動向. 季刊環境研究 106: 24-35, 1997.
- <sup>8</sup> なお、当時の指摘に対応するその後の関連研究のうち、注目される近年の報文には、それぞれつぎのようなも

- のがある:「尿道下裂」, Fisher JS. Environmental anti-androgens and male reproductive health: focus on phthalates and testicular dysgenesis syndrome. *Reproduction* 127:305-315, 2004; 「小児の精神神経学的な情動障害」, Jacobson JL, Jacobson SW, Humphrey HEB. Effects of in utero exposure to polychlorinated biphenyls and related contaminants on cognitive functioning in young children. *J Pediatr* 116:38-45, 1990./Schmutzler C, Gotthardt I, Hofmann PJ, Radovic B, Kovacs G, Stemmler L, Nobis I, Bacinski A, Mentrup B, Ambrugger P, Grüters A, Malendowicz LK, Christoffel J, Jarry H, Seidlová-Wuttke D, Wuttke W, Köhrle J. Endocrine disruptors and the thyroid gland—a combined in vitro and in vivo analysis of potential new biomarkers. *Environ Health Perspect*. 115 (Suppl 1):77-83, 2007; 「精子形成障害」, Sharpe RM, Skakkebaek NE. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 341: 1392-1395, 1993; 「乳がん」, Snedeker SM. Pesticides and breast cancer risk: a review of DDT, DDE, and Dieldrin. *Environ Health Perspect* 9(Suppl 1): 35-47, 2001./Rubin CH, Lanier A, Kieszak S, Brock JW, Koller KR, Strosnider H, Needham L, Zahm S, Harpster A. Breast cancer among Alaska Native women potentially exposed to environmental organochlorine chemicals. *Int J Circumpolar Health* 65: 18-27, 2006; 「前立腺がん」, Pins GS, Birch L, Tang WY, Ho SM. Developmental estrogen exposures predispose to prostate carcinogenesis with aging. *Reprod Toxicol*. 23(3):374-82, 2007. E-pub Oct 24, 2006、など。
- <sup>9</sup> 脚注 3.に同。WHO/IPCS: Global assessment of the endocrine disruptors.
- <sup>10</sup> Tsuomisto J.: Closing Remarks. Weybridge+10 Workshop, Impact of Endocrine Disrupters. By Academy of Finland/European Commission. November 8-10, 2006.
- <sup>11</sup> Aoyama H, Suzuki K. Enhanced one-generation reproductive toxicity study in rats for detecting endocrine-disrupting effects of chemicals. *Pure Appl Chem* 75 (11-12): 2497-2501, 2003.
- <sup>12</sup> Burger J.: 緒言. In: 環境問題科学委員会・国際純正応用化学連合「内分泌活性物質のヒトおよび野生生物に及ぼす影響-SCOPE/IUPAC プロジェクト報告書」(上・下)、2005, pp. 884. (なお、Rochelle Tylらによる2世代、3世代の一連の生殖毒性試験結果、注 46~48も参照)
- <sup>13</sup> Inoue T. Hormonally active agents and plausible relationships to adverse effects on human health. *Pure Appl Chem.*, 75: 2555-2561, 2003.
- <sup>14</sup> Honma S, Suzuki A, Buchanan DL, Katsu Y, Watanabe H, Iguchi T. Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. *Reprod Toxicol*. 16: 117-122, 2002. / Palanza P, Howdeshell KL, Parmigiani S, vom Saal FS.: Exposure to a low dose of bisphenol A during fetal life or in adulthood alters maternal behavior in mice. *Environ Health Perspect* 110,Suppl.3:415-422, 2002. / Schonfelder G, Flick B, Mayr E, Talsness C, Paul M, Chahoud I.: In utero exposure to low doses of bisphenol A lead to long-term deleterious effects in the vagina. *Neoplasia* 4:98-102, 2002. / Schonfelder G, Wittfoht W, Hopp H, Talsness CE, Paul M, Chahoud I.: Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ Health Perspect* 110: A703-707, 2002. / Tinwell H, Haseman J, Lefevre PA, Wallis N, Ashby J.: Normal sexual development of two strains of rat exposed in utero to low doses of bisphenol A.: *Toxicol Sci* 68:339-348, 2002./ Wetherill YB, Petre CE, Monk KR, Puga A, Knudsen KE.: The xenoestrogen bisphenol A induces inappropriate androgen receptor activation and mitogenesis in prostatic adenocarcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 1:515-524, 2002. / Ashby J.: Testing for endocrine disruption post-EDSTAC: extrapolation of low dose rodent effects to humans. *Toxicol Lett* 120:233-242, 2001. / Markey CM, Luque EH, Munoz De Toro M, Sonnenschein C, Soto AM.] In utero exposure to bisphenol A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland. *Bio Reprod* 65: 1215-1223, 2001. / Markey CM, Michaelson CL, Veson EC, Sonnenschein C, Soto AM.:The mouse uterotrophic assay: a reevaluation of its validity in assessing the estrogenicity of bisphenol A. *Environ Health Perspect* 109: 55-60, 2001. / Gupta C.: Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals. *Proc Soc Exptl Biol Med*. 224: 61-68, 2000. / Elswick BA, Welsch F, Janszen DB.: Effect of different sampling designs on outcome of endocrine disruptor studies. *Reprod Toxicol* 14:359-367, 2000./ Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Tillmann M, Markert B.: Effect of endocrine disruptors on prosobranch snail (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part I: Bisphenol A and octylphenol as xeno-estrogen. *Ecotoxicol* 9: 383-397, 2000. / Tinwell H, Joiner R, Pate I, Soames A, Foster J, Ashby J.: Uterotrophic activity of bisphenol A in the immature mouse. *Regul Toxicol Pharmacol* 32:118-126, 2000. / Howdeshell KL, Hotchkiss AK, Thayer KA, Vandenbergh JG, vom Saal FS.: Environmental toxins: Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature* 401: 763-764, 1999.
- <sup>15</sup> 脚注 5 の通り、米国環境防護庁(EPA)は、いわゆる内分泌かく乱問題で対象となっているような物質影響が、通常の試験法で従来求められてきた無作用量(NOEL)や無毒性量よりも低い用量\*で観察されるかに焦点をあて、「低用量問題に関するワークショップ」をノースカロライナで開催した。そこでは、ビスフェノールA(BPA)の低用量データ報告の認否について、確認されたとする報告と認められなかつ

たとする報告の双方に信頼性(credibility)を確認した。さらに低用量作用を示す試験の再現性や、長期試験がジエチルスタイルベストロール(DES)にも BPA にも作用を示さなかった事実に言及し、現状に於ける低用量問題の不確実性を結論した。\*<http://nipserv.niehs.nih.gov/htdocs/liason/Final RptLowDose FR.html>。

- 16 Gray LE Jr, Ostby J, Monosson E, Kelce WR.: Environmental antiandrogens: Low doses of the fungicide vinclozolin alter sexual differentiation of the male rat. *Toxicol Ind Health* 15(1-2): 48-64, 1999.
- 17 Gray LE, Ostby J, Furr J, Wolf CJ, Lambright C, Parks L, Veeramachaneni DN, Wilson V, Price M, Hotchkiss A, Orlando E, Guillette L: Effect of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals. *Hum Reprod Update* 7(3): 248-264, 2001.
- 18 たとえば子宮腫大試験(Uterotrophic bioassay)のような ex vivo 系試験
- 19 Kanno J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W: The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: phase 1. *Environ Health Perspect* 109(8): 785-794, 2001.
- 20 他方、十分に低用量の領域での、リガンドの受容体との会合は当然確率的に低くなるものと考えられ、近年、発がん性研究領域でも “practical な” 閾値はあるものとの考え方が散見される。内分泌かく乱化学物質問題の影響でも同様の考え方がある。(後述、脚注 44 の Gore A.C. et al. を参照。)
- 21 Soto AM, Fernandez MF, Luizzi MF, Oles Karasko AS, Sonnenschein C.: Developing a marker of exposure to xenoestrogen mixtures in human serum. *Environ Health Perspect* 105(3): 647-654, 1997.
- 22 Rajapakse N, Silva E, Kortenkamp A: Combining xenoestrogens at levels below individual no-observed-effect concentrations dramatically enhances steroid hormone action. *Environ Health Perspect* 110(9): 917-921, 2002.
- 23 Silva E, Rajapakse N, Kortenkamp A.: Something from “nothing”—eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environ Sci Technol* 36(8): 1751-1756, 2002.
- 24 実際のデータは、報告者らの文中にあるような相乗性(synergy)は意味せず、相加性(additive)に相当する。(編者注)
- 25 Christiansen S, Scholze M, Axelstad M, Boberg J, Kortenkamp A, Hass U. Combined exposure to anti-androgens causes markedly increased frequencies of hypospadias in the rat. *Intnt'l J Androl* 31: 241-248, 2008.
- 26 Rider CV, Furr J, Wilson VS, Gray Jr, LE. A mixture of seven antiandrogens induces reproductive malformations in rats. *Intnt'l J Androl* 31: 249-262, 2008.
- 27 第4回内分泌かく乱物質ワークショップ(2007年5月28-31日)。デンマーク環境省の後援で、コペンハーゲンにて開催された。
- 28 Kortenkamp A. Ten years of mixing cocktails – a review of combination effects of endocrine disrupting chemicals. *Environ Health Perspect* 115(suppl. 1), 98-105, 2007.
- 29 Kortenkamp A. Low dose mixture effects of endocrine disruptors: implications for risk assessment and epidemiology. *Intnt'l J Androl* 31: 233-140, 2008.
- 30 Crews D, Willingham E, Skipper JK. Endocrine disruptors: present issue, future directions. *Q Rev Biol* 75:243-260, 2000.
- 31 Takeo C, Ugai K, Araki J, et al. Pharmacogenetics of hormone replacement therapy for climacteric symptoms. *Biochem Biophys Res Commun.* in press, doi:10.1016/j.bbrc.2008.07.017. 2008.
- 32 Tsutsumi O.: Assessment of human contamination of estrogenic endocrine-disrupting chemicals and their risk for human reproduction. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 93:325-30, 2005 [E-pub 2005 Jan 26].
- 33 EPA が思春期アッセイを取り上げていることから明らかなとおり、巻頭の要旨に組み込まれるべきであったと考えられる。
- 34 その功罪とも、糖質のはずれた大豆イソフラボン・アグリコンのエストロゲン類似作用に関連するものと考えられている。
- 35 厚生労働省:大豆及び大豆イソフラボンに関する Q&A  
(<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2006/02/h0202-1a.html>)
- 36 井口泰泉:好意により提供された未発表データ。
- 37 Hong E-J, Park S-H, Choi K-C, et al. Identification of estrogen-regulated genes by microarray analysis of the uterus of immature rats exposed to endocrine disrupting chemicals. *Repro Biol and Endocrinol.* 4-49: 1-12, 2006.
- 38 US-NTP(1982)の F344 ラットの2年間経口投与慢性毒性発がん性併用試験による。なお、別報、Furukawa らによる13週間反復投与毒性試験では、NOEL は、500mg/kg/day。
- 39 関澤 純監修:ビスフェノールAの低用量影響評価データ集。平成 17 年 3 月、pp. 332/同、平成 18 年 3 月、pp. 224。

- Rapid modulation of synaptic plasticity by estrogens as well as endocrine disrupters in hippocampal neurons. *Brain Res Rev* 57(2):363-75, 2008. Epub 2007 Jul 28.
- <sup>62</sup> Miyagawa S, Suzuki A, Katsu Y, Kobayashi M, Goto M, Handa H, Watanabe H, Iguchi T. Persistent gene expression in mouse vagina exposed neonatally to diethylstilbestrol. *J Mol Endocr* 32: 663-677, 2004. / WHO/International Programme on Chemical Safety; Eds, T. Damstra, S. Barlow, A. Bergman, R. Kavlock, G. van der Kraak., *Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors*. World Health Organization, 2002, pp. 180. (<http://www.ehp.niehs.nih.gov/who/>). 邦訳は、厚生労働省ホームページ参照 (<http://www.nihs.go.jp/edc/global-doc/index.html>)
- <sup>63</sup> Uchida K, Suzuki A, Kobayashi Y, Buchanan DL, Sato T, Watanabe H, Katsu Y, Suzuki J, Asaoka K, Mori C, Arizono K, Iguchi T. Bisphenol-A administration during pregnancy results in fetal exposure in mice and monkeys. *J Health Sci* 48: 579-582, 2002.
- <sup>64</sup> Gore AC, Heindel JJ, Zoeller RT. Endocrine disruption for endocrinologists (and others). *Endocrinology* 147: S1-3, 2006. / Welshons WV, Nagel SC, vom Saal FS. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology* 147: S56-69, 2006.
- <sup>65</sup> EPA ホームページ参照。 [http://www.epa.gov/NHEERL/research/endocrine\\_disruptors/research\\_areas.html/](http://www.epa.gov/NHEERL/research/endocrine_disruptors/research_areas.html/) [http://www.epa.gov/NHEERL/research/endocrine\\_disruptors/dose\\_effects.html](http://www.epa.gov/NHEERL/research/endocrine_disruptors/dose_effects.html)
- <sup>66</sup> Bachman AN, Phillips JM, Goodman JI: Phenobarbital induces progressive patterns of GC-rich and gene-specific altered DNA methylation in the liver of tumor-prone B6C3F1 mice. *Toxicol Sci* 91(2): 393-415, 2006.
- <sup>67</sup> 前出 44 の Gore et al. と同じ。(Gore AC, Heindel JJ, Zoeller RT. Endocrine disruption for endocrinologists (and others). *Endocrinology* 147: S1-3, 2006.)
- <sup>68</sup> Guerrero-Bosagna C, Sabat P, Valladares L. Environmental signaling and evolutionary change: can exposure of pregnant mammals to environmental estrogens lead to epigenetically induced evolutionary changes in embryos? *Evol Dev* 7(4):341-350, 2005.
- <sup>69</sup> Li S, Hursting SD, Davis BJ, McLachlan JA, Barrett JC. Environmental exposure, DNA methylation, and gene regulation: lessons from diethylstilbestrol-induced cancers. *Ann N Y Acad Sci* 983: 161-169, 2003.
- <sup>70</sup> Miyagawa S, Suzuki A, Katsu Y, Kobayashi M, Goto M, Handa H, Watanabe H, Iguchi T. Persistent gene expression in mouse vagina exposed neonatally to diethylstilbestrol. *J Mol Endocr* 32: 663-677, 2004.
- <sup>71</sup> Rajapakse N et al. Combining xenoestrogens at levels below individual no-observed-effect concentrations dramatically enhances steroid hormone action. *Environ Health Perspect*, 110: 917-921, 2002.
- <sup>72</sup> Keri RA, Ho S-M, Hunt PA, Knudsen KE, Soto AM, Prins GS: An Evaluation of Evidence for the Carcinogenic Activity of Bisphenol A. *Reproductive Toxicology* (2007), doi:10.1016/j.reprotox.2007.06.008
- <sup>73</sup> Sarkar P, Shizaki K, Yonemoto J, and Sone H.: Activation of telomerase in BeWo cells by estrogen and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in co-operation with c-myc. *Internl J Oncol* 28: 43-51, 2006.
- <sup>74</sup> Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 146: 624-32, 2005.
- <sup>75</sup> Zhu H, Rice C, Pang Y, Pace M, Tomas P. Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(5):2231-6, 2003. Epub 2003 Feb 6.
- <sup>76</sup> Moggs JG, Orphanides G. Estrogen receptors: orchestrators of pleiotropic cellular responses. *EMBO Rep*. 2(9): 775-781, 2001/ Moggs JG, Orphanides G. Genomic analysis of stress response genes. *Toxicol Lett*. 140-141: 149-53, 2003.
- <sup>77</sup> Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, & Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 307: 1625-1630, 2005.
- <sup>78</sup> Iguchi T, Watanabe H, Ohta Y, Blumberg B.: Developmental effects: oestrogen- induced vaginal changes and organotin-induced adipogenesis. *Int J Androl*. 31(2):263-8. Epub 2008 Jan 29, 2008.
- <sup>79</sup> Ohtake F, Takeyama K, Matsumoto T, et al. Modulation of estrogen receptor signaling by an association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423: 545-550, 2003.
- <sup>80</sup> Ohtake F, Baba A, Takada I, Okada M, Iwasaki K, Miki H, Takahashi S, Kouzmenko A, Nohara K, Chiba T, Fujii-Kuriyama Y, Kato S. Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature* 446: 562-566, 2007.



- <sup>40</sup> Sekizawa J.: Low-dose effects of bisphenol A: a serious threat to human health? in press, 2008./ vom Saal FS, Akingbemi BT, Belcher SM, et al. Chapel Hill Bisphenol A expert panel consensus statement: Integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reprod Toxicol* 24: 131-138, 2007./注 47 も参照。
- <sup>41</sup> Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: Interim Draft, NTP-CERHR Report on the Reproductive and Developmental Toxicity of Bisphenol A. April 2007, pp. 405.
- <sup>42</sup> 同上、p. 131: マウスやラットで最高用量、640mg/kg/day (rats)や 1250mg/kg/d (mice) 投与しても奇形や出産障害を起こさなかった。
- <sup>43</sup> 同上、p. 322: 出生後のマウスやラットに、最高用量 450mg/kg/day (rats)、600mg/kg/d (mice)投与しても、受精能に影響は見られなかった。
- <sup>44</sup> 同上、p. 113, 128: 成長後のラットやマウスに、最高用量 475mg/kg/day (rats)600mg/kg/d (mice)投与しても、前立腺の重量変化や、前立腺がんの発症を見なかった。
- <sup>45</sup> 同上、p. 125, 127, 137, 139: 成獣ラットやマウスに、475mg/kg/day 投与しても、思春期月令などの成長パラメータを変化させなかった。
- <sup>46</sup> Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Sloan CS, Castillo NP, Veselica MM, Seely JC, Dimond SS, Van Miller JP, Shiotsuka RS, Beyer D, Hentges SG, Waechter, Jr. JM. Two-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD-1 (Swiss) mice. *Toxicol Sci* 104: 362-384, 2008.
- <sup>47</sup> Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Thomas BF, Keimowitz AR, Brine DR, Veselica MM, Fail PA, Chang TY, Seely JC, Joiner RL, Butala JH, Dimond SS, Cagen SZ, Shiotsuka RN, Stropp GD, Waechter, Jr. JM. Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci* 68: 121-146, 2002.
- <sup>48</sup> Lemmen JG, Broekhof JLM, Kuiper GGIM, Gustafsson JA, van der Saag PT, van der Burg B. expression of estrogen receptor alpha and beta during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 81:163-167, 1999.
- <sup>49</sup> Markey CM, Coombs MA, Sonnenschein C, Soto AM. Mammalian development in a changing environment: exposure to endocrine disruptors reveals the developmental plasticity of steroid-hormone target organs. *Evol Dev* 5:1-9, 2003.
- <sup>50</sup> Suzuki A, Sugihara A, Uchida K, Sato T, Ohta Y, Katsu Y, et al. Developmental effects of perinatal exposure to bisphenol-A and diethylstilbestrol on reproductive organs in female mice. *Reprod Toxicol* 16:107-116, 2002.
- <sup>51</sup> 文末注 No. 5 を参照(2000 年 10 月、米国ノースカロライナ州で開催された低用量問題についてのワークショップ)
- <sup>52</sup> 実際に、母動物の中樞神経系コリンエステラーゼ活性を明らかに抑制する濃度のフェニトサイオン(fenitiothion)が、系世代試験で、繁殖性や内分泌機能に影響を示さなかったことなどの報告が見られ、OECD の試験法ガイドライン作りにあたっている米国の委員らは、これに注目している。Okahashi N, et al. Lack of evidence for endocrine disrupting effects in rats exposed to fenitrothion in utero and from weaning to maturation. *Toxicol.* 206: 17-31, 2004.
- <sup>53</sup> Tyl RW, Myers CB, Melissa C, Marr MC, Sloan CS, Castillo NP, Veselica MM, Seely JC, Dimond SS, Van Miller JP, Shiotsuka RS, Stropp GD, Waechter Jr. JM, Hentges SG. Two-generation reproductive toxicity evaluation of dietary 17 $\beta$ -estradiol (E2; CAS No. 50-28-2) in CD-1 (Swiss) mice. *Toxicol Sci* 102: 392-412, 2008.
- <sup>54</sup> National Toxicology Program: Draft NTP Brief on Bisphenol A. April 14, 2008, pp. 47.
- <sup>55</sup> <http://www.fda.gov/oc/opacom/hottopics/bpa.html>
- <sup>56</sup> [http://www.chemicalsubstanceschimiques.gc.ca/challenge-defi/bisphenol-a\\_e.html](http://www.chemicalsubstanceschimiques.gc.ca/challenge-defi/bisphenol-a_e.html)
- <sup>57</sup> [http://www.efsa.europa.eu/EFSA/KeyTopics/efsa\\_locale-1178620753812\\_BisphenolA.htm](http://www.efsa.europa.eu/EFSA/KeyTopics/efsa_locale-1178620753812_BisphenolA.htm)
- <sup>58</sup> 厚生労働省食品安全部でも、ビスフェノールAがヒトの健康に与える影響について、先頃、7月8日(2008)付けで、食品安全委員会へ健康影響評価を依頼している。  
( <http://www.mhlw.go.jp/houdou/2008/07/h0708-2.html> ;  
<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/kigu/topics/080707-1.html> )
- <sup>59</sup> 井上 達, 井口泰泉. 生体統御システムと内分泌攪乱. シュプリンガー・フェアラーク東京, 2005. pp. 325.
- <sup>60</sup> 栗生(Aou)らによれば、Wistar 系の妊娠ラットへの Bisphenol A 1.5mg/kg (NOAEL は 50mg/kg) 投与は、仔の成育後のオープン・フィールドテストにおける行動と、脳の青斑核(locus ceruleus)の小型化など雌化傾向を惹起したと報告している(Kubo K, Arai O, Ogata R, Omura M, Hori T, Aou S. Exposure to bisphenol A during the fetal and suckling periods disrupts dexual differentiation of the locus coeruleus and of behavior in the rat. *Neurosci Lett*, 304, 73-76,2001. / Kubo K, Arai O, Omura M, Watanabe R, Ogata R, Aou S. Low dose effects of bisphenol A on sexual differentiation of the brain and behavior in rats. *Neurosci Res.* 45, 345-356, 2003).
- <sup>61</sup> Ogiue-Ikeda M, Tanabe N, Mukai H, Hojo Y, Murakami G, Tsurugizawa T, Takata N, Kimoto T, Kawato S.;

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑 誌

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	号	ページ	年
Hirabayashi Y, <u>Inoue T.</u>	Aryl hydrocarbon receptor biology, xenobiotic responses in hematopoietic progenitor cells	Biochem Pharmacol doi	77	521-35	2009
Hirabayashi Y, <u>Inoue T.</u>	Principles of data-mining in toxicogenomics	In: Sahu SC, ed. Toxicogenomics: A Powerful Tool for Toxicity Assessment. Hoboken, NJ John Wiley & Sons, Ltd.		57-84	2008
<u>Sekizawa J.</u>	Low Dose Effects of Bisphenol A: A Serious Threat to Human Health?	J Toxicol Sci	33	389-403	2008
Ishii K, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, <u>Sugimura Y.</u>	Role of stromal tenascin-C in mouse prostatic development and epithelial cell differentiation.	Dev Biol	324	310-9	2008
<u>Iguchi T.</u> , Watanabe H, Ohta Y, Blumberg B.	Developmental effects: estrogen induced vaginal changes and organotin induced adipogenesis	Int J Androl	31	263-8	2008
Milnes MR, Garcia A, Grossman E, Grün F, Shiotsugu J, Tabb MM, Kawashima Y, Katsu Y, Watanabe H, <u>Iguchi T.</u> , Blumberg B.	Activation of steroid and xenobiotic receptor (SXR, NR112) and its orthologs in laboratory, toxicological, and genome model species	Eviron Health Perspect	116	880-5	2008
Nakamura T, Kats Y, Watanabe H, <u>Iguchi T.</u>	Estrogen receptor subtypes selectively mediate female mouse reproductive abnormalities induced by neonatal exposure to estrogenic chemicals. Toxicology	Toxicology	253	117-24	2008
Ohtake F, Fujii-Kuriyama Y, <u>Kato S.</u>	AhR acts as an E3 ubiquitin ligase to modulate steroid receptor functions	Biochem Pharmacol	77	474-84	2009
Okada M, Takezawa S, Mezaki Y, Yamaoka I, Takada I, Kitagawa H, <u>Kato S.</u>	Switching of chromatin-remodelling complexes for oestrogen receptor-alpha	EMBO Rep	9	563-8	2008
Ohtake F, Baba A, Fujii-Kuriyama Y, <u>Kato S.</u>	Intrinsic AhR function underlies cross-talk of dioxins with sex hormone signalings	Biochem Biophys Res Commun	370	541-6	2008
Nakamura Y, Suzuki T, Arai Y, <u>Sasano H.</u>	Nuclear Receptor DAX1 in Human Prostate Cancer: A Novel Independent Biological Modulator	Endocr J			2008 (Epub)
Wada S, <u>Yamazaki T.</u> , Kawano Y, Miura S, Ezaki O	Fish oil fed prior to ethanol administration prevents acute ethanol-induced fatty liver in mice.	J Hepatol	49(3)	441-50	2008
Ogiue-Ikeda M, Tanabe N, Mukai H, Hojo Y, Murakami G, Tsurugizawa T, Takata N, Kimoto T, <u>Kawato S.</u>	Rapid Modulation of Synaptic Plasticity by Estrogens as well as Endocrine Disrupters in Hippocampal Neurons	Brain Res Rev	57	363-75	2008
Hojo Y, Murakami G., Mukai H, Higo S, Hatanaka S, Ogiue-Ikeda M, Ishii H, Kimoto T, <u>Kawato S.</u>	Estrogen synthesis in the brain – Role in synaptic plasticity and memory	Mol Cell Endocrinol	290	31-43	2008

Myers JP, vom Saal FS, Akingbemi BT, Arizono K, Belcher S, Colborn T, Chahoud I, Crain DA, Farabollini F, Guillette LJ Jr, Hassold T, Ho SM, Hunt PA, Iguchi T, Jobling S, <u>Kanno J</u> , Laufer H, Marcus M, McLachlan JA, Nadal A, Oehlmann J, Olea N, Palanza P, P	Why Public Health Agencies Cannot Depend upon 'Good Laboratory Practices' as a Criterion for Selecting Data: The Case of Bisphenol A doi	Environmental Health Perspectives	117(3)	309-15	2009
Sanosaka T, Namihira M, Asano H, Kohyama J, Aisaki K, <u>Igarashi K</u> , <u>Kanno J</u> , Nakashima K	Identification of genes that restrict astrocyte differentiation of midgestational neural precursor cells	Neuroscience	155	780-8	2008