

他方、ヒトやウサギの核内受容体 RXR に関する研究³⁰によれば、げっ歯類の RXR と分子種が異なり、BPA で現在マウスやラットで観察されている影響よりヒトへの影響が小さいとする根拠はないとする考え方もあり、認識の統一には、さらなる研究の蓄積が必要である。なお、雄性生殖器関連の情報としては、独自に確立されたマウス前立腺の無血清器官培養法によれば、 10^{-9} M のエストラジオールが、TGF α 強陽性の扁平上皮化生を誘導するとの観察が観察されている³¹。検討の結果、これは前立腺における ER α 強を介して誘導される TGF α が、扁平上皮の化生を引き起こすものと考えられているが詳細は明らかでない。

グローバルアセスメントにも明らかなように、免疫・感染防御系に関する知見は乏しい。未発表データとして見出されるものとしては、① 成体マウスを使った *in vivo*³² における DES の影響³³、② 胎児胸腺器官培養による DES、エストラジオール、BPA、p-n-オクチルフェノール、ベンジルn-ブチルフタレートなどの化学物質のリンパ球のT細胞増殖分化への影響³⁴、③ 同じく5種類の化学物質の脾臓T細胞の増殖に及ぼす影響などについて検討した結果、T細胞の早期の増殖・分化に抑制的な影響を与えるという。胎児系では、妊娠マウスに飲水投与でBPA(2.5ug/mlおよび10.0ug/ml)を投与し、その胎児の免疫系への影響をみた実験によれば、免疫系の発育を遅延させていると考えられる変化が観察されるという³⁵。またリンパ球のB細胞系については、ノニルフェノール(NP)、BPA、フタル酸ブチルベンジル(BBP)、フタル酸ジブチル(DBP)といった物質の、マイトジェンのIL-2、IL-10、IFN- γ などのサイトカイン産生に対する影響が、低用量域まで観察され、このときBPAでは、細胞内カルシウムイオン濃度が上昇し、タンパク質のチロシンリン酸化が併行して起こっていることが確認されている³⁶。

神経系では、神経幹細胞にER α 、ER β などが発現していることが従前より報告されている。これを用いて、DES暴露後のその分化・自己複製能が低下している旨の未発表データも見られる。前駆細胞にはオーファン受容体RVR、TR4などの発現が見出されているが生物学的背景は明らかでない。性分化に及ぼす神経内分泌学的な影響研究が進展しているが、用量との関係などはまだ見られない³⁷。

行動に及ぼす影響が注目を集めているが、これらの報告はここ数年内にやっと出始めたところであり、知見は乏しい。Bisphenol A(BPA)に関連した行動関連のデータとしては、Wistar

³⁰ Bruce Blumberg : 未発表データ。

³¹ 厚生科学研究(井上班)報告・未発表データ。

³² 生体個体レベルでの実験。

³³ Utsuyama M, Kanno J, Inoue T, Hirokawa K. Age/sex dependent and non-monotonous dose-response effect of diethylstilbestrol on the immune functions in mice. *Toxicol Lett.* 135: 145-153, 2002.

³⁴ T細胞系機能については、高酸素下器官培養システムにおける、胎児胸腺細胞(CD44⁺CD25⁻)から亜集団(CD44⁺CD25⁺)への分化・増殖が、0.01-1nM程度の低用量のDESやBPAの添加によって抑制されたとされている。

³⁵ 新規未発表データ。

³⁶ Yamazaki T, Ezaki O. Effect of endocrine disruptors on lymphocyte responses. *Organohalogen Compounds.* 56: 107-110, 2002. / Yamazaki T, Okada Y, Hisamatsu Y, Kubota S, Kayama F. Effects of endocrine disrupting chemicals on lymphocyte responses. *Organohalogen Compounds.* 49: 394-396, 2000.

³⁷ レーザー捕捉法による単一ニューロンを同定する方法によって、同定されたGnRHニューロンからtotal RNAを取り、GnRH1およびGnRH3におけるPXRやRXRなどの連絡の検討から、GnRH1およびGnRH3が、PXRによって制御されていることを意味すると考えられ、生殖原器の性分化が、GnRH1によって、生殖行動がGnRH3によって支配されているものと推定している。これらの発現に必要な用量関連のデータは得られていない。(Palhar IS. Gonadotropin-releasing hormone receptors: neuroendocrine regulators and neuromodulators. *Fish Physiol. Biochem.* in press).

系の妊娠ラットへのBPA 1.5mg/kg (NOAELは50mg/kg³⁸) の投与が、仔の成育後の行動様式と、脳の青斑核(locus ceruleus)の小型化などの雌化傾向を惹起したと³⁹、抗男性ホルモン様作用化学物質でも行動変化が見られたとされている⁴⁰。BPA 0.1ppmを出産前1週間投与した妊娠Wistarラットから生まれた仔ラットでは、ストレス対処行動の性差の消失(雌化)が見出されている⁴¹。同様の変化は、嗅覚応答様式でも示唆されたという。

情報関連の成果とその知見：

以上、高次生命系を中心とした事象の他には、リスク評価情報として、BPAの低用量影響についての文献調査が進行中である(報告時までには完成の見通し)⁴²。生体影響の蓋然性が境界領域に位置するものと考えられているBPAについて、2000年から2004年の5年間に報告の見られた168件の文献を対象に、邦文の信頼性を含む内容的検討を行った上で、これらをデータベース化する作業が進行中である。

食物や生体内には、アリアルヒドロカーボン受容体(AhR)⁴³に対してリガンドとなり得る種々の物質が明らかになっており、その作用機構が注目されている⁴⁴。これらの物質は低用量で作用すると考えられるが、詳細は明らかでない⁴⁵。天然のAhRリガンドの存在量と作用メカニズムに関して行われた文献調査によれば、緑茶、ウーロン茶、コーヒー、リンゴジュース、トマトジュースからの抽出物でリガンド活性物質の存在が認められている。発がん一般に関する調査(低用量影響に関する検討を含む)によれば、ジエチルスチルベストロール(DES)の雌雄性器腫瘍や種々の異常発生には閾値が確認できなかつたとされているので、そうした機構が他の内分泌かく乱化学物質といわれる物質にも起こりえるものかどうか今後の調査の課題となる。

発がん性に関する知見に注目すると、低用量発がんに関する実験的検討では、ベンゼンへ

³⁸ US-NTP(1982)ラット(F344)2年間経口投与慢性毒性・発がん性試験併用試験による。尚、別報、古川ら(1994)によれば、13週間反復投与毒性試験では、500mg/kg/day。

³⁹ 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)。

⁴⁰ Hotchkis AK, Ostby JS, Vandenberg JG, Gray LE Jr. Androgens and environmental anti-androgens affect reproductive development and play behavior in the Sprague-Dawley rat. *Environ Health Perspect.* 110(suppl 3): 435-439, 2002.

⁴¹ Kawai K, Nozaki T, Nishikata H, Aou S, Takii M, Kubo C. Fetal exposure to bisphenol A induces aggressive behavior in pubescent male mice. *Environmental Health Perspective* 111, 175-178, 2003.

⁴² 2000年から2004年の5年間に報告の見られた168件の文献について、低用量影響データの有無の確認の上、14名の専門家の協力を得て、レビューとデータベースの作成に着手した。調査に先立って、調査票を作成された調査項目は、著者名、論文原題名、出典、対象生物、影響標的臓器、影響レベル(細胞・組織・個体)、暴露方法、暴露時期(胎生期など)、暴露濃度と用量段階、試験記録信頼性保証、および、論文の概要などからなる。調査対象は、ラット88、マウス53、ヒト27、その他27からなり、標的臓器は、神経系16、免疫系8、生殖系91、その他42、影響生体レベルは、細胞56、組織52、個体63、その他24、暴露期は、胚・胎児期35、周産期22、出生後41、成熟期54、その他株細胞45、などとなっている(集計途中)。

⁴³ 脚注12, 14を参照。

⁴⁴ 脚注12, 14を参照。

⁴⁵ 各種のリガンドは、ダイオキシン型、ベンゾピレン(B[a]P)型、インディルビン型に分類され、前2者は、特有の毒性を示し、インディルビン型の主として食品などに由来する生体内代謝産物リガンドのそれは毒性は低いものと想定されている。

キサクロリド(α BHC)の、ジエチルニトロソアミン(DEN)をイニシエーターとする発がん二段階法を用いた0.01ppmから500ppmまでの用量に対する検討が行われており、35週の実験結果で観察された腫瘍頻度は、0.1ppmに極小値を示す、非線形の、下に凸の頻度曲線が得られている⁴⁶。他方、低用量域での高用量からの外挿を上回る発がん性を肯定する文献は見出されず、既存の発がん性に関する実験結果と符合している。またタモキシフェン(TXP)の高用量はE2アゴニストとして作用していることが知られているが、このことは、作用機作が用量によって異なることがあることを示唆している。周生期暴露の後期発がんに関する調査では、いずれについても、明らかな低用量作用は認められないと判断されている。男性性器がん、乳腺・女性性器癌に関する調査では、Ashbyらの追試によれば、von Saalらの観察した低用量作用の再現性は得られず、見解の統一に至っていない。この乖離について実験に与える影響因子としては、飼育条件、動物の遺伝背景、体重、飼料中の植物エストロジェン量などの要素が指摘されている。

3. 今後必要な調査研究等の課題の提言

本邦における内分泌かく乱化学物質の生体影響研究は、歴史が浅い。そうした相対的に短い研究期間ながら、この期、国際的に注目される知見が得られ、それらの研究が厚生労働科学研究として世界に発信されつつある点は評価されよう。他方、内分泌かく乱研究では、上記に通覧してきた通り、その試験法の面からも、リスクアセスメントの面からも、それぞれに認識の進展は著しいにもかかわらず依然として不明の点が多い。その理由は、この問題の基盤となる知見で新たな知見が集積しつつも、根幹に関わっていて解明されていない事柄にもとづいているように考えられる。従って、今後の課題としては、そうした基盤研究の引き続く重要性を強調せざるを得ない。

以上によりさしあたり以下のような個別的な諸課題が引き続き検討されるべきと考えられる。

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^{47,48}。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も、研究上、注目されるべきと考えられる⁴。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。例えば早発老化(premature ageing)を引き起こす可能性の指摘もあるが、その真偽もそれに対するリスク認識も定まってはいない。但し、実験動物学的には、早発老化は、種々のエピジェネティックな発がん性の上昇や前倒しを引き起こすことが知られている。

高感受性期と低用量問題

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いる⁴⁹。それらを、核内もしくは膜の受容体を介しての生体影響と考える考え

⁴⁶ 6週令の雄性F344ラットを用い、DENを週1回、3週にわたって投与し、 α BHCをプロモーターとして低用量(0.01ppm)から0.05、0.1、1.0、および高用量(50、500ppm)が混餌投与されている。

⁴⁷ 脚注1に同じ。

⁴⁸ 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.

⁴⁹ Rajapakse N et al. Combining xenoestrogens at levels below individual no-observed-effect concentrations

方が示されている⁵⁰。

これに対して、無処置の成体が検知できない用量オーダーにおける“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ことが必要との考え方もある。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、確認や追試の必要の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も必要である。

注) 米国医薬食品局(FDA)^{51,52}や、同じく米国 EPA⁵³の研究者らによって非線形反応性が確認されるとともに、英国の研究者らも低用量域に限局的ながら相加反応について一端の実験的事象を報告している⁵⁴。これは、形態形成期である胎生期に特発的に影響する胎生期ウィンドウ現象とリンクするものと信じられている⁵⁵。

生体影響の焦点－高次生命系

EDCs が高次生命系に与える影響は、生体作用影響研究の焦点となりつつある⁵⁶。生理学的な知見に関しても未知の点が多く、しかも端緒的に明らかになっているこれまでに明らかになりつつある EDCs 関連の知見から見れば、引き続き、免疫系、甲状腺-中枢神経系・行動などの領域についてのさらなる検討を進めることが必要と考えられる。

注) グローバルアセスメントの免疫系の記載は不十分であり、補充の必要がある。併せて、各種受容体結合域上流のスズやヒ素などによる xenobiotic element を介した免疫系シグナルへの修飾が、これらの複合作用の背景にあるものと考えられている。

ゲノミクス手法による内分泌かく乱化学物質影響研究

バイオマーカーとなる遺伝子プロファイルの抽出の試みが進んでおり、これを更に進めてプロテオミクスを基礎としたバイオマーカーを同定することには、行政上のメリットが少なくない⁵⁷。具体的手法としては、想定される EDCs で引き起こされ得る生体障害マーカー

dramatically enhances steroid hormone action. *Environ Health Perspect*, 110: 917-921, 2002. 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不可逆反応としての変化が観察されている。

⁵⁰ 厚生科学研究（井上班）報告参照

⁵¹ Guo TL, White KL Jr, Brown RD, Delclos et al. *Toxicol Appl Pharmacol*. 181: 219227, 2002.

⁵² 脚注 29 参照。

⁵³ G. Ankley: Personal communication.

⁵⁴ Rajapakse N et al. *Environ Health Perspect* 110: 917-921, 2002./ Silva E et al. *Environ Sci Technol* 36: 1751-1756, 2002.

⁵⁵ 脚注 46 参照。厚生科学研究（井上班）報告。新生児期マウスの膈のエストロジェン作用臨界期は生後 3 日にあり、この時点での DES 投与後の影響がマイクロアレイ法を用いて解析されている。DES の投与により、上皮組織でのエストロジェン応答遺伝子(ER) のリン酸化を介した EGF 様成長因子-erbB 受容体系の活性化、引き続く MAPK や Akt などの系のリン酸化とそれに伴う AF-1 領域のリン酸化に至るエストラジオール非依存性のアクチベーションループが形成されることが、受容体阻害剤などを用いて示されている。

⁵⁶ ホルモン概念は、すでに生物学的には細胞によって血中に放出されるサイトカインを含む生体内すべての細胞機能に拡張されており、その受容体を有する組織は、EDCs の対象となる蓋然性をもつ。高次生命系は総じて記憶の仕組みを含む情報伝達システムを保持しており、免疫系の影響、神経・行動系への影響が焦点となるものと認識される。異物代謝との複合影響なども、取り残された研究課題である。

⁵⁷ Watanabe H, Suzuki A, Mizutani T, Kohno S, Lubahn DB, Handa H, Iguchi. *Genome-wide analysis of changes in early gene expression induced by estrogen*. *Genes Cells*, 7: 497-507, 2002.

ーに特化したチップの構築⁵⁸と、専ら遺伝子発現そのものを表現型として取り扱う（リバース・サイエンス法）方法⁵⁹などが考えられる。

上記は、それぞれ用途に応じて有効性と考えられ、併せて以下の諸点の留意が必要である。

- ① 初期変化による長期変化の予測性の如何
- ② 用量相関に対する方法論と、用量特異的遺伝子プロファイリング
- ③ 複合効果の予測性（有力手段と考えられつつある）
- ④ 動物種間外挿性（相同表徴系に対応する遺伝子プロファイリング）
- ⑤ 試験管内細胞・組織と個体レベルでの遺伝子発現の相互相関性など⁶⁰。

これらはとりもなおさず先の低用量問題であげた課題と重なり合う部分が少なくない。

ゲノミクス手法とともに、インフォマティクスの果たす今後の役割の重要性が焦点になっている。これら Omics 手法の導入については、WHO/IPCS がすでにベルリンにて⁶¹、また OECD が京都にて⁶²ワークショップを開催し、留意すべき諸点などをまとめつつある。

以上、引き続き低用量問題を巡る(高)感受性問題の検討が必要である。特に低用量問題と関連した試験系については、ヒトの受精を人為的に抑制するような adverse effect を引き起こす用量での影響が、通常の実験動物の試験法で検知できないという、根本問題の解明が進んでいない。子宮腫大試験系が取り入れられた原点に立ち返って検討を進める必要がある。

第2にマイクロアレイ法などを用いたゲノム発現解析による今後の内分泌かく乱化学物質試験法の解明が必要となっている。マイクロアレイなどを用いたゲノム発現解析は、多くのマイクロアレイが背景メカニズムの解析に用いられるのに対して、むしろ遺伝子発現パターンを表現型として取り扱う、いわば現象論的な試験系であるが、相乗効果や用量特異的遺伝子発現にリンクしたバイオマーカー解析の有力手段になるものと考えられている⁶³。

第3に、これらとの対比の中で、相対的に作用の弱い多くの一般化学物質での、実験報告に即したプライオリティ設定などによるプラクティカルな対応の可能性が伺われる。

⁵⁸ ChineChip^{TR} Probe Array Technology, Copyrihgt 2000, Affymetrix, Inc.

⁵⁹ T. Inoue & W.D.Pennie (eds) Toxicogenomics. Springer, Tokyo, Berlin 2003, pp.3-11.

⁶⁰ Inoue T, Igarashi K, Sekizawa J. JMAJ (Japan Medical Association Journal) 46: 97-102, 2003.

⁶¹ 2003年11月17-19日ドイツ連邦リスク評価研究所、ベルリン：Proceedings は印刷中。

⁶² 2004年10月13-15日国立京都国際会館、京都：Proceedings は印刷中。

⁶³ 脚注60参照。