

ミニレビュー

哺乳動物に対する生殖毒性の評価[#]青山 博 昭^{*}

財団法人残留農薬研究所毒性部生殖毒性研究室

(平成 18 年 8 月 20 日受理)

Keywords: endocrine disruptors, low dose effects, pesticides, enhanced one-generation reproductive toxicity study.

はじめに

農薬やその代謝産物の中にはエストロゲン様作用や抗アンドロゲン作用に代表される内分泌活性をもつものがあり、それらの一部（DDT など）が野生生物に有害な影響を及ぼしている可能性は 1960 年代から指摘されていた。その後、1990 年代になって「化学物質の内分泌かく乱作用」が注目を集めるようになり、農薬に限らず身の回りに存在するさまざまな化学物質について、同様の有害性（潜在的な内分泌かく乱作用をもつ可能性）が懸念されるようになった。さらに、ひとたび何らかの内分泌活性が検出された化合物については従来の毒性試験で得られた無毒性量より遥かに低い用量域においてもその活性に基づく有害作用を示すのではないかとの疑いがかけられ、わが国では内分泌かく乱作用が疑われる化学物質のリスクに関してややヒステリックな議論が巻き起こった。

われわれは、環境省に協力して、内分泌かく乱作用が疑われるとされるさまざまな化合物の低用量影響を、ラットを用いた改良型の 1 世代繁殖毒性試験により評価した¹⁻³⁾。このプロジェクトでは、わが国で使用実績のある農薬（登録抹消となった化合物を含む）やそれらの代謝物も評価の対象となった。本稿では、化学物質の低用量影響に関する概念や問題点を簡単に紹介するとともに、一連の試験で明らかになった事実に基づいて、この問題にどのように対処すべきかを議論する。

1. 低用量影響の概念とリスク評価上の問題点

ここで取り上げる「低用量影響」とは、ヒトが現実には暴

露されるような用量（通常は何ら有害作用を及ぼさないと考えられている）や、標準的な毒性試験で調べられる用量よりも低い用量で化学物質の暴露を受けた動物に観察される何らかの生物学的変化（有害な変化とは限らない）を指す。内分泌かく乱物質の低用量影響に対する懸念は、合成エストロゲンである DES や弱いエストロゲン活性をもつビスフェノール A を投与した妊娠マウスから生まれた雄の児の前立腺重量を測定すると、極めて低い用量群でのみ重量の増加が観察されるとの報告^{4,5)}に端を発する。その後、これらの実験の追試や類似の実験が世界中で実施され、このような結果を再現したとの報告と再現されなかったとの報告がそれぞれいくつも公表された⁶⁾。しかし、低用量影響そのものや、多くの矛盾する実験結果を統一的に説明する合理的な仮説はいまだに提唱されておらず、観察された低用量影響が“悪影響”であるか否かの議論も結論を得るには至っていない。

仮にある種の化学物質に低用量影響があると仮定すると、環境中に存在する農薬やその他の化学物質のリスク評価に関して、厄介な問題が生ずる。すなわち、暴露用量と暴露を受けた動物（ヒトを含む）の示す反応との間にはほぼ直線的な用量反応関係が成り立つことを前提に、動物実験で確認された無毒性量より十分に低い用量（通常は無毒性量の 1/100 以下の用量）であればリスクは存在しないとの概念や、このような概念に基づいて実施されてきたこれまでのリスク評価は、低用量影響の存在が証明された途端に破綻するのである。しかし、ラットやマウスなどの実験動物を用いたこれまでの研究で、リスク評価の根幹を揺るがすような化学物質の低用量影響が本当に正しく検出できているのであろうか？

2. 実験動物の遺伝的多型に起因する実験誤差

これまで、農薬のヒトに対する生殖毒性は、農林水産省、US EPA あるいは OECD のガイドラインに沿って実施された 2 世代繁殖毒性試験の結果に基づいて評価されてきた。

[#] 第 31 回大会シンポジウム講演者による解説。

^{*} 〒 303-0043 常総市内守谷町 4321

E-mail: aoyama@iet.or.jp

©Pesticide Science Society of Japan

この試験は、被験物質を2世代にわたってラットに投与して、親動物の生殖機能と出生児の生育に及ぼす影響を調べるものである。2世代繁殖毒性試験では、ヒトの集団が遺伝的に均一でなく極めて多様性に富むことを念頭において、他の一般的な毒性試験と同様に、ある程度の遺伝的多型性を保ったアウトブレッッドストック（いわゆるクローズドコロニー）に由来する実験動物をモデルとして使用する。このような動物をモデルとした繁殖毒性試験は、これまでの膨大なデータの蓄積から、被験物質の高用量域における生殖毒性の有無と用量反応関係に基づく無毒性量の把握には十分な検出感度をもつと考えられている。

一方、一般にラットは多産であり、1産当たりの産児数は標準的な系統でも12~16匹に上るため、通常の2世代繁殖毒性試験では哺育4日に一部の哺育児を淘汰して一定数の児動物（原則として雌雄各4匹）のみを哺育させることにより、児動物の発育に及ぼす同腹児数の多寡による影響を排除している。しかし、この戦略を採用すると、内分泌かく乱物質などの低用量影響を厳密に調べる際には却って生物学的誤差が大きくなり、誤った結果を得る恐れも生ずる。例えば、遺伝的多型性を保持した集団に由来する動物を試験に用いると、低用量群では感受性の高い個体が比較的多く選ばれ、高用量群では逆に感受性の低い個体が多く選ばれるような事象が偶然生じて、見かけ上の用量反応関係が非直線的になるような現象が理論的には起こり得る。また、性成熟後のF1個体を対象にしたさまざまな検査指標（精子検査、繁殖成績など）に関して、後に異常が顕在化する個体を哺育期間中に淘汰したために被験物質の有害作用を見落とししたり、遺伝性の異常を誘発性の異常と誤解したりする可能性も生ずる。われわれの研究室でも、マウスの毛色を支配するA遺伝子座に関して、突然変異型であるA^y/a個体（毛色は黄色）はa/a個体（毛色は黒色）よりグルココルチコイド（副腎皮質ホルモン）に対して高感受性であり、母動物または胎児のいずれかまたは両者の遺伝子型がA^y/aであった場合は両者がa/aであった場合と比較して口蓋裂（実験動物においては致死奇形と考えられる）の出現率が上昇することを確認した⁷⁾。また、動物生産コロニーで自然発生したと考えられる劣性突然変異に関して、表現型が正常であるにもかかわらず変異遺伝子をヘテロにもつラットを生殖・発生毒性試験に使用したために、胎児や哺育児に遺伝子異常による先天奇形が出現したというトラブルも経験した^{8,9)}。いずれの実験結果も、動物実験の結果を評価するに当たって用いた動物の遺伝的背景に十分な注意を払う必要のあることを示唆するものであろう。

3. 実験動物に潜在する遺伝的統御が困難な誤差

繁殖毒性試験で調べるさまざまな指標には、動物の遺伝子型を均一にしても制御しきれない変動も存在する。例え

ば、動物の行動に関する種々の指標、ある種のホルモンの血中濃度、精子数、1腹当たりの産児数や出産児の性比などに関しては、例え近交系の動物を実験に用いたとしても、得られるデータはある程度分散する。したがって、これらの指標には対照群といずれかの投与群との間で偶発的な差が見られることがしばしばあり、被験物質の影響を正しく評価するには細心の注意を要する。繁殖毒性試験を実施する際には、十分な例数のデータを採取すること、関連する指標に見られる変化との整合性を十分に考慮すること、および必要に応じて追加実験を実施して再現性の有無を確認することなどを常に心がけるべきであろう。

4. 環境要因に起因する実験誤差

毒性試験に限らずあらゆる動物実験では、動物に給与する飼料や飲料水に内分泌活性物質を含むさまざまな汚染物質（コンタミナント）が混入していると推測される。また、ラットやマウスに与える基礎飼料には蛋白源として大豆類が含まれるため、これらに由来する植物エストロゲンも相当量含まれている。そこで、環境省プロジェクトで実施した一連の1世代繁殖試験に用いた飼料を分析してみたところ、内分泌かく乱作用が疑われるとされるフタル酸エステル類をはじめとするさまざまな物質が、調べたすべての飼料で1kg中に数百μg含まれていた³⁾。さらに、ダイジンやゲニスチンなどの植物エストロゲンの総量は飼料1kg当たり100mg以上であり、それらの濃度は飼料のロットによってまちまちであった。これらの物質について、ラットを例にして体重（約250g）と1日当たりの摂取量（約20g）から摂取量を計算すると、対照群の動物であってもDEHP（内分泌かく乱作用が懸念されている代表的なフタル酸エステル）を10~30μg/kg/day、その他の汚染物質を数μg/kg/dayずつ複合摂取していることとなり、コンタミナントフリーの条件で動物実験を実施することは事実上不可能であると考えられた。動物に与える基礎飼料の汚染は、厚生労働省の研究班によっても確認されている¹⁰⁾。したがって、いかなる動物実験においても対照群の動物がすでに植物エストロゲンやさまざまな内分泌活性物質を相当量摂取していると考えるべきであり、このような条件下で弱い内分泌活性をもつ化合物の低用量影響を評価できるか否かは甚だ疑問である。

5. 改良型1世代繁殖毒性試験

化学物質の低用量影響を厳密に調べるには、コンタミナントフリーの条件下に、遺伝的な変異をもたない動物を十分な数を用いた試験を実施することが理想である。しかし、現実にはさまざまな制約があって理想的な試験は実施できないため、環境省プロジェクトでは可能な限り厳密な試験の実施を心がけた。すなわち、動物の個体差に起因する誤

表 1. 環境省プロジェクトで実施した 1 世代試験の対象物質と投与用量^{a)}

化合物名	投与用量		化合物名	投与用量	
	μg/kg/day (低用量群)	mg/kg/day		μg/kg/day (低用量群)	mg/kg/day
Aldrin	0, 0.1, 0.5, 2.5, 12.5	1	Dipentyl phthalate	0, 2, 10, 50, 250	1000
Amitrole	0, 0.5, 5, 50	100, 1000	Dipropyl phthalate	0, 2, 10, 50, 250	2000
Benzophenone	0, 2, 10, 50	20, 100	Endrin	0, 0.2, 1, 5, 25	0.4
Bisphenol A	0, 0.473, 2.24, 11.8, 53.8	500	Heptachlor	0, 0.05, 0.5, 5	1, 3
Butylbenzyl phthalate	0, 2, 12, 60, 300	500	Hexachlorobenzene	0, 0.04, 0.4, 4, 40	40
cis-Chlordane	0, 0.1, 0.5, 2.5, 12.5	10	beta-Hexachlorocyclohexane	0, 0.1, 0.5, 2.5, 12.5	5
p,p'-DDD	0, 0.2, 1, 5, 25	300	Malathion	0, 1, 5, 25, 125	300
p,p'-DDE	0, 0.03, 0.3, 3, 30	50	Mirex	0, 0.02, 0.2, 2, 20	2
o,p'-DDT	0, 0.2, 1, 5, 25	50	4-Nitrotoluene	0, 1, 5, 25, 125	100
p,p'-DDT	0, 0.2, 1, 5, 25	10	trans-Nonachlor	0, 0.05, 0.5, 5, 50	10
Di-n-butyl phthalate	0, 31, 63, 125, 250, 500	250	4-Nonylphenol (branched)	0, 6.9, 23.2, 70.9, 234	—
2,4-Dichlorophenol	0, 0.8, 4, 20, 100	400	Octachlorostyrene	0, 2.4, 12, 60, 300	50
Dicyclohexyl phthalate	0, 1.6, 8, 40, 200	500	4-t-Octylphenol	0, 3, 10, 30, 100	—
Dieldrin	0, 0.1, 0.5, 2.5, 12.5	1	Pentachlorophenol	0, 0.5, 5, 50, 500	30
Di-2-ethylhexyl adipate	0, 15, 150, 1500, 15000	600	Permethrin (mixture isomer)	0, 0.5, 5, 50, 500	100
Di-2-ethylhexyl phthalate	0, 10, 50, 250, 1250	100	Tributyltin chloride	0, 10, 30, 100, 300	2
Diethyl phthalate	0, 0.4, 2, 10, 50	2000	Triphenyltin chloride	0, 1.1, 11, 107, 370	1.117
Dihexyl phthalate	0, 2, 10, 50, 250	500	4-t-butylphenol	0, 1, 60	23, 78, 218

^{a)}上記 36 試験のうち、28 試験の結果は 2005 年 3 月に公表された。¹⁾

差を極力小さくして被験物質投与の影響を感度良く検出するために哺育児数の調整を行わない 1 世代繁殖試験法を採用し、動物に給与した飼料、飲料水および被験物質の希釈に用いた溶媒のすべてのバッチについて植物エストロゲンの含有量と被験物質を含む種々の汚染物質の混入量を精密に分析して、それらの影響を考慮しつつ試験結果を評価することとしたのである¹⁻³⁾。一連の試験では、被験物質を妊娠 0 日から哺育 21 日まで母動物に投与して、それぞれの解剖時期に割り当てられたすべての F1 動物を対象に、全試験に共通する基礎的検査（体重測定、主な臓器の重量測定、性成熟の検査、雌の性周期検査、雄の精子検査など）と、被験物質の作用特性に応じて追加した指標の検査（遺伝子発現量の解析、行動検査、離乳児の生殖器官の重量測定と病理組織学的検査など）を実施した。これらの試験には原則として 1 群当たり 12 匹以上の母動物を用意し、対照群（1 群）、試験群（原則 4 群）および陽性対照群（原則 1 群）の合計を 6 群とした。したがって、1 試験当たり 800~1000 匹の児ラットをすべて精査したこととなる。このような大規模実験は外に類を見ないので比較が難しいが、少なくともこれらの試験で調べた検査項目については、十分信頼に値するデータが得られたものと考えられる。

環境省プロジェクトでは、「内分泌攪乱化学物質問題への

環境庁の対応方針について—環境ホルモン戦略計画 SPEED'98—」¹¹⁾に「内分泌攪乱作用を有すると疑われる化学物質」として取り上げられた物質を中心に、36 物質を選んで 1 世代試験を実施した（表 1）。これらの試験結果は、2005 年 3 月現在で 28 物質について公表されている¹⁾。一連の結果をみると、ほとんどの試験の高用量群（陽性対照として設定した群）でさまざまな毒性が検出され、それらの中には被験物質の内分泌かく乱作用を示唆するものも含まれていたが、調べたいずれの物質についてもヒト推定暴露量を考慮した低用量群では明らかな内分泌かく乱作用は認められていない。また、一部の試験では特定臓器の重量や生化学的検査における一部の指標にわずかな変化がみられることもあったが、それらは被験物質の暴露用量にも他の指標にも無関係な変動（背景データの範囲から逸脱する統計学的有意差ではあっても、因果関係について科学的に説明することもできない）であり、これらが被験物質の投与によるものと断定することのできないものであった。したがって、現在の技術水準として最善の試験を実施しても、調べた化合物のいずれにも低用量域における内分泌かく乱作用は検出できなかったと結論される。

表 2. 学究の科学 (Academic science) と規制の科学 (Regulatory science)^{a)}

	学究の科学 (Academic science)	規制の科学 (Regulatory science)
研究機関	大学	政府・企業
目的	疑問、仮説、検証、反論により自然界の理解と知識を深めるための科学者の独創的な研究	政策と規制策決定のための情報収集：政治・行政が課題を提示：最終目的は公開の議論による利害と価値観の調整
不確実性の取り扱い	不確実性を許容、次の研究課題とする	政治的・法的措置のために不確実性を確率的予測で補うことが求められる
結果	研究論文、学会発表	Gray literature (非公開論文)、基礎データ、監視データ、規制文書
期限	期限はない	規制、政治的判断等で期限を決定
政治の影響	直接の影響はない	リスク評価以外は直接影響 ^{b)} ：人事は政府、予算は議会、最終判断は裁判所
説明責任	専門家の検証 (ピアレビュー)	議会、裁判所、国民、ピアレビュー
動機	科学者・大学教員としての地位向上	法律に準拠
関連科学 ^{c)}	医学、トキシコロジー、病理学	疫学、公衆衛生学

^{a)} 唐木英明博士のご好意により、博士が <http://sciencepolicy.colorado.edu> 等を参考に作成した表を示す。

^{b)} 食品安全基本法：リスク評価は科学的知見に基づいて客観的かつ中立公正に行う。

^{c)} 食品分野の場合。

6. アカデミックサイエンスとレギュラトリーサイエンス

化学物質の内分泌かく乱作用に関しては、1世代繁殖毒性試験により可能な限り精密に調べても、ヒトが実際に環境からの暴露を受けている程度の濃度（低用量域）における悪影響は確認できなかった。したがって、レギュラトリーサイエンス（規制の科学）の立場（表2）からすれば、現行の規則に従って化学物質を管理する限り現実的なリスクは存在しないと結論できる。今後は、適切なリスクコミュニケーションにより、一般市民の不安を解消する努力が必要となろう。

一方、内分泌かく乱作用が疑われるさまざまな物質の低用量影響に関しては、残念ながらまだそれらが存在しないと証明されたわけではない。今回のプロジェクトにおいても、試験系の有効性を検証するためにエチニルエストラジオールを用いて実施した実験では、比較的低用量（0.01 µg/kg/day）の暴露であっても動物の遺伝子発現量に有意な変化が観察された^{2,3)}。この事実は、合成ホルモンのような強いエストロゲン様作用物質に関しては、これまでの毒性試験で調べられていなかった遺伝子のレベルで動物が反応していることを示唆していると解釈できるものである。一方、動物に給与する飼料の分析から、これまで無処置であると信じてきた対照群の動物であっても、わずかながら

餌（食物）を経由してさまざまな化学物質の暴露を受けていることが明らかとなった。したがって、化学物質の真の低用量影響はコンタミネントフリーの環境を整えない限り正確に評価できないことも示唆された。

今回のプロジェクトを実施することによって生じた新たな疑問や課題については、今後もアカデミックサイエンス（学究の科学）の分野で研究を進めるべきと思われる。しかし、これまでのように動物の遺伝的統御について配慮を怠った実験や、対照群の動物の汚染状況を見逃した低用量影響実験を無闇に繰り返していたのでは、内分泌かく乱作用の本質に迫ることができない。この分野の研究に取り組む研究者の新たな発想が期待される。

謝 辞

環境省プロジェクトを実施するに当たり、ご協力いただいた皆様に心より感謝する。また、アカデミックサイエンスとレギュラトリーサイエンスの役割について、唐木英明博士（東京大学名誉教授）の助言を得た。記して感謝の意を表する。

引用文献

- 1) <http://www.env.go.jp/chemi/end/extend2005/index.html>
- 2) 青山博昭：動物遺伝育種研究 **32**, 93-103 (2004).
- 3) 青山博昭：保健医療科学 **54**, 29-34 (2005).

- 4) S. C. Nagel, F. S. vom Saal, K. A. Thayer, M. G. Dhar, M. Boechler and W. V. Welshon: *Environ. Health Perspect.* **105**, 70–76 (1997).
- 5) F. S. Vom Saal, B. G. Timms, M. M. Montano, P. Palanza, K. A. Thayer, S. C. Nagel, M. D. Dhar, V. K. Ganjam, S. Parmigiani and W. V. Welshons: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2056–2061 (1997).
- 6) <http://ntp-server.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/liason/LowDosePeer-FinalRpt.pdf>
- 7) N. Hatakenaka, H. Aoyama, M. Kaneda and S. Teramoto: *Con-genit. Anom. Kyoto* **36**, 21–27 (1996).
- 8) H. Aoyama, S. Teramoto and Y. Shirasu: *Teratology* **37**, 159–166 (1988).
- 9) M. Kaneda, S. Teramoto and Y. Shirasu: *Teratology* **40**, 77–84 (1989).
- 10) <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2005/03/dl/s0331-9a.pdf>
- 11) <http://www.env.go.jp/chemi/end/endindex.html>

略 歴

青山博昭

生年月日：1954年7月16日生

最終学歴：名古屋大学農学部畜産学科卒業(家畜育種学専攻),
博士(農学, 名古屋大学大学院)

研究テーマ：哺乳動物の内分泌機能, 生殖および発生に関する基礎的研究と, これらに及ぼす化学物質の影響評価に従事している.

趣味：特にないが, 強いて言えば林道ドライブ.