

本稿は1999年5月28日、東京の日本薬学会 長井記念館で開催された日本環境変異原学会主催の第10回公開シンポジウム「内分泌攪乱物質の作用機序と後世代影響—環境変異原研究との接点—」(企画: 菊川清見, 渋谷 徹, 藤川和男)で発表された(座長: 太田敏博)

内分泌攪乱とホルモン様化学物質

井上 達

国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター毒性部 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

Chemicals potent to have hormone-like actions and their possible endocrine disruptions

Tohru Inoue

Cellular & Molecular Toxicology Division, Biological Safety Research Center,
National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku,
Tokyo 181-8501, Japan

Summary

Chemicals having hormone-like actions are suspected of inducing possible disruptions in the endocrine tissues and organs, thus the chemicals are called possible endocrine disrupting chemicals (EDCs). Their possible consequent hazards such as developmental/repro-toxicological anomalies and carcinogenicities are reviewed, together with any relevant data from mutagenicity testing. The actions of EDCs appear to be receptor-mediated. Four major subjects to be focused on are; first, the threshold issue, because of their potent activity at low doses, specifically in *in vitro* tests; second, possible redundant action, which may induce an equivocal non-linear dose-response curve; third, unknown additive/synergistic effects in combinations of chemicals, possibly due to interacting co-factor(s) and/or signal transducer(s); and, fourth, the "fetal window" known as a period of greater sensitivity during the developmental stages. By means of available data-bases, special interest has been given to the potential repro-toxicity, carcinogenicity, and mutagenicity of possible EDCs as listed by U.S.-EPA. Lastly, as a theoretical risk-analysis, discussion is made on the possible impact of EDCs on life span, applying data on EDC-mediated hazards to the Risk Factor-Multiplication Theory of Aging.

(This paper, chaired by Toshihiro Ohta, was presented to the 10th Annual Symposium, "Endocrine Disruptor Mechanism and Posterity Effects-Concern with Environmental Mutagen Research", organized by Kiyomi Kikukawa, Tohru Shibuya, and Kazuo Fujikawa, sponsored by the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at The Pharmaceutical Society of Japan, Nagai Memorial Hall, May 28, 1999.)

Keywords : chemicals having hormone-like action, endocrine disruptors, non-linear dose-response curve, the fetal window, the risk factor-multiplication theory of aging

結 言

—ホルモン様の作用を持つ化学物質の影響について—

医薬品はもとより、農薬や工業用化学物質などの中に

は、明らかに内分泌ホルモン様の生体内作用を持つ物質が少なくない。それらはしばしば蓄積性を示し、しかも環境中でも実際に検出されることがあるなど、いわゆるホルモン様作動性化学物質の存在はいわば既知の事実である。問題は、それらが(その定義はさておいて)“内分泌攪乱”を起こすかどうか、また、起こすとすればそれはどのような機構に即して起こるのか、という点にある。

受付: 1999年8月4日 受理: 1999年8月18日

©日本環境変異原学会

ホルモン様作用化学物質の同定はさして困難ではないが、それらが“内分泌攪乱”を生ずるかの如何の同定は難しく、とりわけそのものへの挿入は難しい。多くの混乱もこの点に起因している点が少ない。

当該の物質は、内分泌攪乱化学物質 (EDCs) と呼称されるが、これは、もとより“内分泌ホルモン様作用を持つ化学物質”が内分泌系統に起こす障害を念頭に置いた概念である。ただしその捉え方は単純ではない。たしかにピルに用いられる ethynyl estradiol (EE) のように 17 β -estradiol に近似した作用物質でも、投与の時期と方法によっては、後述するようなウィンドウ効果として知られる神経発達障害を引き起こす (Hambergh, 1969; Gomes et al., 1999)。むしろそうしたことは、estradiol でさえも起こしうる。しかし他方 EDCs では、ホルモン作用を持つかにみえて障害性を引き起こすような、いわばホルモンらしからぬ点にその物質が特徴づけられる面がある。むしろこの問題では、estradiol のようなホルモンそのものの投与によって引き起こされる反応ないしは障害の研究と、EDCs のような物質が非生理的に引き起こすであろう障害性 (adverse effect) を明らかにする研究をそれぞれ分けて取り扱うことが問題の整理の仕方として重要なのではないかと考える。

1991年7月、米国 Wisconsin 州の Wingspread に集まった環境医学生物学領域の専門家達は、各地の野生生物の生態に観察される群集規模の縮小や異常についての討議の末、これらが EDCs に起因する可能性を危惧して政府への詳細な調査研究を求めた。そうした背景を読みもの風にとめた“*Our Stolen Future*” (邦題は「奪われし未来」) が Theo Colborn らによって 1996年3月に出版され、EDCs 問題が社会問題へと発展する契機となった。1995年に至り大統領府は、環境自然資源委員会 (CENR) を設置して EDCs に関する総合的な研究推進計画を開始した。1997年1月には大統領府科学技術政策室が諸外国から専門家を招き、環境防護庁 (EPA) と共同でいわゆるスミソニアン・ワークショップを開催した。ここでの考え方は、EDCs に関するその後の研究の方向性を明らかにした (U.S.EPA, 1997)。

ちなみにこの時のワークショップではその定義について「生体の恒常性・生殖発生あるいは行動に参与する生体の種々の性ホルモンの合成、分泌、体内輸送、受容体結合そしてそのホルモン作用そのもの、あるいはそのクリアランスなどの諸過程を阻害する性質を持つ外来性の物質」と定めている。かくしてこうした諸過程に沿ったきわめて多岐にわたる試験系が研究の対象となることになる。実際的にはこれらの中から主なバッテリー試験を選び出す形で、受容体原性のシグナルの伝達プロセスを測定するレポータ遺伝子アッセイをはじめ、子宮肥大試験 (Gray et al., 1997) や Hershberger 試験 (Hershberger et al., 1953) などの個体レベル反応が検討の対象と

なるに至った。

こうした背景に対して、次に問題となるは、EDCs の生体作用、なによりもその特徴そのものである。

1. 内分泌攪乱物質 (EDCs) の生体作用の特徴

EDCs の生体作用の特徴をまとめると、例外はあるにせよ、その基本点を一言でいえば受容体原性のホルモン (様) 作用を反応の入り口としている、ということではないかと思われる。生殖腺などに直接作用する化学物質なども少なくないが、単に内分泌機能に影響があっても受容体を介さないものについては、その影響の特徴に従来の化学物質と比較したときのユニークな点はないからである。ホルモン受容体はホルモンの種類に相応して種々存在する。同一ホルモンに対しても、いくつかの異なる機能を示す複合ドメイン構造 (Schwabe et al., 1993) や α とか β といった受容体アイソフォームが異なったライガンドに異なった親和性で結合する反応様式 (redundancy) が知られており (Kuiper et al., 1997) これにいわゆるコ・アクチベーターなどが反応を修飾するうえ (Norris et al., 1998)、スプライシング・バリエーションなども数多く知られている (Pfeffer, 1996; Leygue et al., 1996; Hirata et al., 1995)。したがって作用は自ずと多様にならざるを得ないが、そのことを前提として整理するとその特徴には、次の4点があげられる。第1に、作用がプレイオトロピズム、つまり多臓器で種々の異なる生理活性を発揮する傾向を持つこと。エストロゲン・レセプター (ER) ひとつをとっても、各種内分泌臓器のほとんどに分布しているほか、胎生期では形態形成などをも制御し (Brandenberger et al., 1997)、非内分泌系臓器でもその発現が知られている。第2に、これに引き続く二次性伝達物質としての細胞増殖因子などを介した種々の組織、とくに神経系、免疫系などのいわゆる高次系と呼ばれる諸組織に対する作用がしばしば認められる (Shughrue et al., 1997) ことである。これらのことと関連して、例えば子宮は、インターリューキン 6 (IL-6) や顆粒球・マクロファージ系コロニー刺激因子 (GM-CSF) などと呼ばれる免疫担当細胞増殖因子の産生母地であり (Kover et al., 1995)、エストロゲンはこれを制御する (Robertson et al., 1992)。これは、神経系や免疫系の機能状態によって EDCs の影響が変化する可能性を意味している。第3点は、これはアッセイ系の性質にもよるが、反応様式にしばしば直線的な用量反応関係がみられないことである。しばしば指摘されるいわゆる“逆U字型反応曲線” (vom Saal et al., 1997, 1998) も、これに相当する。こうした現象と併せて受容体の不活性化のような一連の受容体原性反応は、高用量反応から低用量反応を予測する根拠を危うくしている。第4点目は受容体シグナルが正確に反応しさえすれば、1分子の化学物質の反応に至るまで反応は連続的となるので、恐らく反応

に閾値がないという点である。このことは必ずしも個体レベルでの閾値の有無の問題に繋がらないが、相乗性および相加性の如何によってはこれも無視できないことになる (Arnold et al., 1996; Ashby et al., 1997)。これらはいずれも、理論問題としても実際問題としても解決の求められている主要点である。つまり、EDCs 問題では、個々の物質の問題の解決もさることながら、こうした普遍的影響に係わることがらを総体として解明してゆかなくてはならない。

さて、そのような受容体原性作用の結果、具体的にはどのようなことが想定されるかについては、わからない点が少ないので戯画的になるが、1) 受容体に対する生体内ホルモンの結合の阻害、2) 疑似ホルモンとしての受容体への結合と、その結果としての異常シグナル、3) 受容体過剰発現の惹起とその結果としての異常な機能亢進状態、4) 生体内ホルモンの相互作用と、その結果としてのホルモン作用の機能変異、5) ホルモン類の産生障害などをあげることができる。

ところで本稿は、EDCs の環境変異原物質としての可能性を検討の対象としている。EDCs は、内分泌様の性質を持つ化学物質の“種の保存”に対する危惧を、催奇形性などの発生異常と、内分泌・性腺関連諸臓器での発がん性の双方の面から投げかけるものとして注目されてきた。そうした意味で、本質的にこのものの変異原性の如何が注目される理由である。しかしながらこれら物質の作用機構からみたときの多様性、その結果に一般性が見い出されないことと相俟って、変異原性についても一般則のようなものがないものとして必ずしも十分な検討がなされないままに今日に至ったことは否めない。これは EDCs の実際上の影響の如何はともかくとして、それらの発生・生殖障害性の面と発がん性の面の双方をカバーする視点が従来のトキシコロジー(毒性学)に乏しかったことによる。この視点の新たな構築のために、変異原性の検討に求められている課題は大きいと思われる。

2. 検討対象となる化学物質

内分泌系に作用する種々の化学物質が存在すること自体は、以前から指摘されていた。事実、化学物質のアンドロジェン受容体(AR)への作用をみる試験のひとつ Hershberger 試験は、1953 年という年代物の報告 (Hershberger et al., 1953) であるし、文献が見い出されないで Earl Gray の論文 (Gray et al., 1997) を引用して済ませているが子宮肥大試験 (Uterotrophic assay) に至っては多くの著作はその原法が 1930 年代に遡ると記載している。

EDCs の中には、有機塩素系化合物の殺虫剤 (Bitman et al., 1968; Velsicol Chem Corp., 1983 b; Hodge et al., 1952)・抗真菌剤 (BASF Wyandotte Corp., 1982)、工業用化学物質としてのビスフェノール A (Dodds et

al., 1938; Krishnan et al., 1993)、あるいはフタル酸類 (Carpenter et al., 1953) などがあげられるほか、さらに医療用薬剤としてのビル (ethynyl estradiol) のようなものなどがあり、このほか、一部の黴毒・マイコトキシン類、あるいは豆科のイソフラボン類に含まれるジェニスタイン、また赤葡萄の皮に含まれるリグナン類などいわゆる植物性のホルモン (phytoestrogens: PEG) がある (Verdeal et al., 1985; Bradbury et al., 1954)。少なくとも 20 数種類知られる PEG 類は、イソフラボン類がエストロジェンに似た構造を示す反面、リグナン類には共通性はむしろ乏しい。これら物質は基本的にはエストロジェン作用を持つが、環境化学物質と同様、種々の条件によってアゴニストとしてもアンタゴニストとしても作用することが知られている。

3. 発生と形態形成への影響—マウスの胚形成と window 問題—

エストロジェンの胚形成への関与が知られている中で、発生経過中の受容体の発現が観察されている (Lemmen et al., 1999)。これによれば、 α 受容体と β 受容体は、胎生 9.5 日目から 14.5 日目までにかけて、中腸、中腎管、ミューラー管、脳、などに発現を始めるが、前述の通りこの時、 α 受容体の発現と β 受容体の発現は、決して併行してはいない。これら双方が出そろうのは、体生 16.5 日過ぎのことであり、それ以後でも膀胱、前立腺、大腿骨軟骨などでは α 受容体のみ発現している。神経形成を中心としたエストロジェン受容体発現についても視床下部や特定の皮質領域で調べられている (Friedman et al., 1983)。

Lemmen ら (1999) は母体に [^3H] moxestrol を投与して、このものの分布がエストロジェン受容体の発現と並行する (Gerlach et al., 1983) との前提にたつて、その胎生期間中の分布を経時的に調べ、前頭葉での [^3H] moxestrol の結合が胎生 15—18 日より生後 18 日前後までに、20 数倍まで急速に増加することを観察した。しかもこれに対して、帯状回皮質や側頭葉、後頭葉では、生後 1 週をピークにして以後、単位 DNA 量あたりの結合が減少していた。こうした変化の意味は未知であるが、胎生期曝露による特定時期での高感受性問題なども以上のような発達過程にリンクするものと理解される。このような胎生期曝露は、また、生後、思春期を迎えた後、あるいはさらに時間を経た後にその影響を顕わすことがあることが知られている。安田ら (Yasuda et al., 1988) は、ICR 系妊娠マウスへ胎生 11 ないし 17 日の時点で ethynyl estradiol (EE; 0.02 mg/kg) を投与し、その仔が 20—22 ヶ月齢に達した時点の精巣を観察した。興味深いことに、それらの精巣では、睾丸あたりの testosterone の産生が対照の 84 ng から 27.5 ng に激減していた。さらにそれらでは組織学的にも対照に較べて精子形成の退縮が著し

く、細胞はアポトーシス(apoptosis)を起こしており、また、Leydig細胞の過形成(hyperplasia)が認められたという(Yasuda et al., 1988). 著者らは、これをこの決定的な時期における胎児の精巣でのtestosteroneの減少と、17 β -estradiolへの置き換え(conversion)が生じた結果によるものと考えている。

EDCsの中で、胚形成への影響の知られているものに、polychlorinated biphenyl(PCBs)や、dichlorodiphenyldichloroethylene(DDE)などがある。PCBsでは、“Yusho”や“Yu-Cheng”(いずれも油症の意)の名で知られるヒトへの影響も知られている。胎生期のこれらの曝露により、生下時体重の減少、早産などが観察されている。実験室レベルでは、methoxychlorやbisphenol Aのほか、octylphenolなどのphenol類、butyl benzyl phthalate(BBP)、dibutyl phthalate(DBP)などのphthalate類、さらに、vinclozolinchlordeconeなどでは、生殖管への影響が知られている。

胎生期ウィンドウの問題は単純でない。Diethylstilbestrol(DED)(3 μ g/30 mg.BW)が胎生期ウィンドウをもって特異的に膈上皮の可逆的過形成を生ずることは知られるが、井口らによれば、これがビスフェノールA投与(胎生10日目より9日間、1 mg/10 mg.BW)では、観察されなかったという(Iguchi et al., 1999)。

EDCsにおける胎生期ウィンドウ問題を含めた発生と形態形成への影響は、そこで惹起される遺伝子レベルでの可逆的・不可逆的变化の研究と、これら物質の変異原性との関連リンクがあるかどうかに関心があるが、この点を明らかにする十分な報告は出そろっていない。これはゲノム解析の一分野として、分子発生・形態形成領域の研究に対する未曾有の強化方針が出されつつも、その体制が十分に整っていないことを意味している。

4. 動物実験における発がん性

“Our Stolen Future”は、EDCsの前立腺癌への影響をヒト影響の一つとして取り上げた。そのような事実を裏付ける疫学的データは存在しないが、実験的検証を求める声は高い。ホルモンを用いた実験研究は、用量の高低によりしばしば結果が逆転するなど、実験の計画そのものも、結果の解釈も難しいことが少なくない(Maekawa et al., 1999)。白井らは、0.75 ppmのEEを混餌により3週間投与し、2週間の休薬をおいた後、50 mg/kg.bwのdimethyl amino-biphenyl(DMAB)をs.c.で投与した(Shirai et al., 1986)。結果としてDMAB単独投与に較べて、高度の前立腺癌の亢進をみた。この結果を単純に解釈すればEDCsの無意識な摂取は、自然発生性の前立腺癌の亢進を来す結果になる可能性を導き出すが、白井らのその後の研究によれば、先の投薬期間を1週間に短縮するだけで、DMAB単独との差は消失してしまうという(Shirai et al., 1990)。

このように内分泌腺の発がん性試験は、ホルモンそのものを取り上げてすらも結果の評価がきわめて難しい。これに加えて、EDCsも実際にEDCsかどうかを検討の対象となっているものも、その作用機構や、化学物質としての物理化学的性質がまさに多様である。比較的はつきりしていることは、多くのEDCsや実際にEDCsかどうかを検討の対象となっている物質のうち、いわゆる化学物質の二段階発がん性生物試験でいうところのイニシエーター物質に相当するものが、数えるほどしかないという点である。

多くは発がん性があってもプロモーターの性質にとどまり、標的臓器も多くは内分泌臓器とはなっていないことが指摘される。とくに有機塩素系の殺虫剤の中にはそうした意味での発がん性プロモーター作用物質は少ない。DDE, DDT, TCDDあるいはendrinなどはこれに含まれる。他方、未知の点の少ない核内受容体系のシグナル連絡が、そうした非内分泌臓器を連絡する可能性は否定できないので、現時点では包括的に取り扱う必要がある。

以下にまず造腫瘍性の知られる物質をいくつかのカテゴリ別にわけて作用の特徴を通覧する(Keith, 1997)(なお、物質の区分けには、東京都立衛生研究所毒性部によってまとめられた二次資料「内分泌かく乱作用が疑われる化学物質の生体影響—データ集」を参考にした)。

① Chlordane関連物質(Keith, 1997): testosteroneの低下、エストロゲン受容体(ER)結合性などでEDCsとしての性質が早くから想定されてきた物質であるが、多くで肝や甲状腺に腫瘍誘発を起こすような薬物代謝の亢進が示唆されている(NCI, 1997; Becker et al., 1979)。腫瘍発生そのものは、報告により異なるが、前述のホルモン腫瘍背景を反映していると思われる。[Chlordane(trans-, cis-), Heptachlor, Heptachlor epoxide, Nonachlor(trans-), Oxychlordaneなど。]

② 有機塩素系殺虫剤 DDT類: 肝や甲状腺で薬物代謝酵素の亢進を惹起する傾向がみられ、腫瘍発生はこれに関連したプロモーター作用性の肝、甲状腺の腫瘍からなる。1例を除き、BALB/c, CF-1, A系, Swiss/Bombay, BC 3/AKRで調べられたすべてで造腫瘍性が陽性になっている(Thorpe et al., 1973; NCI, 1978)。ただしこれらの結果のヒトへの外挿性には疑問もある。[p,p'-DDT, p,p'-DDD, p,p'-DDE]

③ Aldrin/Dieldrin類: Testosterone産生に作用したり、ARやER結合性がみられるので、これを介した発がんプロモーター作用が示唆されている(Georgian, 1978)。しかし造腫瘍性の如何はマウスでは陽性(Davis et al., 1962)、ラットでは概ね陰性(Deichmann et al., 1983)となっており、用量によっても異なる。

④ その他の有機塩素系化学物質: 甲状腺ホルモン産生への影響やER, AR, PRなどへの結合性による“推定

EDCs 物質”。多くが肝癌や甲状腺腫瘍など齧歯類腫瘍を発生。例によって用量相関がはっきりしない(NCI, 1977) [Hexachlor cyclohexan (Lindane), kepone, methoxychlor, mirex, toxachene など(なお、有機塩素系化学物質の中で Endosulfan は実験腫瘍の発生がみられない。また、Endrin については8項の AhR 結合性陽性物質を参照).]

⑤その他の農薬関連化学物質のうち、推定 EDCs 物質で実験的に腫瘍発生の認められるもの(いずれもいわゆるプロモーター作用と判断される): 甲状腺; alachlor (Wilson et al., 1996), および amitrole (Tsuda et al., 1976). 肝腫瘍; kelthane (Dicofol) (IARC, 1983), malathion, nitrofen, および pentachlorophenol. (このほかに弱い肝腫瘍原性? の示唆される trifluralin, dibromochloropropane (Saegusa et al., 1986), 線維肉腫の報告が確認される dibromochloropropane など).

⑥ Chlorotriazin 系除草剤: Atrazine や Simazine では ER や AR への結合性, Metribuzin では甲状腺機能亢進がみられる。Atrazine では PR 結合性もみられる。[Atrazine (乳腺腫瘍) (Stevens et al., 1999) (Metribuzin では甲状腺機能亢進が認められるが, Metribuzin も Simazine も実験動物での発がん性はみられない (Keith et al., 1997; IARC, 1991)).]

⑦ジチオカルバメイト系の野菜・果樹用殺菌剤: 甲状腺ホルモンの産生に作用したり甲状腺ペルオキシダーゼの上昇もしくは低下を引き起こし、これらを通じて造腫瘍性プロモーター作用のポテンシャルがあるものと考えられる。[Mancozeb (Hurley, 1998), Zineb, Ziram (IARC, 1983)に弱い造腫瘍性作用。ただし類薬の Maneb (FAO/WHO, 1993), Metiram (FAO and WHO working group, 1994)での実験腫瘍は陰性。]

⑧ AhR を介する物質: AhR 結合性が陽性で、これを介して T_3T_4 の低下などを引き起こす特異な EDCs 物質。ホルモン受容体結合性はみられない。EDCs としては作用機構上、特異な一群を構成する。その他に有機塩素系殺虫・殺菌剤の endrin, 弱い造腫瘍性の hexachlorobenzene など。変異原性は PCB と dioxins に単鎖切断がみられる程度で、いずれも薬物代謝酵素の CYP1A1 の惹起を介して代謝を亢進し、発がんプロモーターとして作用する。(ただし周知の通り, benzo (a) pyren は, Ames の復帰突然変異など種々の変異原性試験についても陽性の物質。発がん性バイオアッセイでのいわゆるイニシエーター作用も陽性) [芳香族塩素化合物のうち, Benzo (a) pyren (Sjogren et al., 1996), polybrominated biphenyls (PBBs) (Safe, 1984), polychlorinated biphenyls (PCBs) (Safe, 1984), polychlorinated di-benzo-p-dioxins (dioxins) (Huff et al., 1994; IARC, 1997), poly-chlorinated di-benzofurans (PCBF) (IARC, 1997) など。]

他方, EPA の“推定 EDCs 物質”の多くでは、いわゆるプロモーター作用も見い出されず、発がん性のないものが少なくない。それらの主なものには、次のようなものがある。

⑨カーバメイト系殺虫剤: ER や AR などホルモン受容体への結合性を持つか、もしくは甲状腺ホルモンの変化を惹起することで知られる。いずれも造腫瘍性をみない (IARC, 1991)。[Aldicarb, Benomyl, Carbaryl, Methomyl, Vinclozolin。]

⑩ピレスロイド系の殺虫剤: AR 結合性や甲状腺機能亢進を来すことをもって EDCs の可能性が想定されている。これらの中で実験的に弱い造腫瘍性がみられるのはアルカリフォスファターゼを惹起することが知られる Fenvalerate のみ (IPCS, 1989; IARC, 1991; IARC, 1991)。ほか, Cypermethrin, Esfenvalerate, Permethrin では神経障害, 免疫能低下, 成長遅延などが観察される。なお, このものの神経障害がナトリウム・チャンネルを標的とした脱分極異常に基づくこと, ヒトと昆虫とでその感受性がさまざまに異なっていることなどが知られている (Nakanishi, 1996)。

⑪プラスチック可塑剤: MCF 7 への増殖活性などにより EDCs として取り扱われているもの、あるいはその候補物質 (Phthalate 類や alkylphenol 類の大部分)。Diethylhexyl phthalate (DEHP) (Huber et al., 1996) や diethylhexyl adipate (DEHA) (NTP, 1982) などの peroxisome 増殖剤^(*) (Takagi et al., 1990) を除き、多くは動物実験による発がん性は陰性 (Catharine et al., 1997): Butyl benzyl phthalate, dibutyl phthalate, dicyclohexyl phthalate, dihexyl phthalate, di-n-pentyl phthalate, dipropyl phthalate, bisphenol A, alkylphenol, nonylphenol, p-octylphenol, styrenes, styrene dimers, styrene trimers など^(*) diethylhexyl phthalate (Huber et al., 1996), diethylhexyl adipate (NTP, 1982) は実験的肝腫瘍を誘発)。

以上通覧してきたとおり, EDCs における変異原性と発がん性のリンクは、前項にみた発生・形態形成の障害との関連に較べれば、よいといってよい。しかし、ここでも EDCs では主としてその造腫瘍性がいわゆる発がんプロモーター作用に基づくことと相俟って詳細な検討に乏しい。とくに変異原性の強さの問題や, EDCs の相互作用との関連などは比較的データの古いものもありはつきりしないことが少なくない。

5. 内分泌攪乱化学物質の変異原性

前項で発がん性と併せてみてきたとおり, 内分泌攪乱化学物質と考えられる物質がその内分泌“攪乱性”の様式そのものの多様性と相俟って、それらの物質の変異原性も多種多様である(なお, ○印を付した番号は、前項のそれと物質グループを合わせてある)。

① Chlordane 関連物質では前項でみたとおり薬物代謝の亢進を通じた発がん性が示唆されている (Becker et al., 1979; Thorpe et al., 1973). 関連化合物の中では, Chlordane で突然変異と染色体異常の双方が示されている (Sobti et al., 1983; Sarkar et al., 1993) が, それ以外の物質では変異原性はみられない (Marshall et al., 1976).

② 有機塩素系殺虫剤 DDT 類. 同じく肝や甲状腺で薬物代謝酵素の亢進を惹起する傾向がみられる DDT 類では, Ames 試験などが陰性 (Sobti et al., 1983; Rashid et al., 1986). なお, このグループの中に染色体異常が認められるものが散見される (Lessa et al., 1976; Mahr et al., 1976).

③ Aldrin/Dieldrin 類. 発がんプロモーター作用が示唆されてきた (Georgian, 1978; Davis et al., 1962). 催奇形性も陽性 (Meisner et al., 1992). 変異原性では, 染色体異常陽性 (Georgian, 1975; Majumdar et al., 1976). Dieldrin では突然変異も陽性 (McGregor et al., 1991).

④ その他の有機塩素系化学物質 (Hexachlorocyclohexan, Kepone, methoxychlor など). 比較的高い用量での長期試験で肝癌や甲状腺腫瘍などを産生. 催奇形性や精子形成障害が散見される (Hoffman et al., 1982). これに対して (toxachene を除いて) 復帰突然変異は陰性 (Moriya et al., 1983) だが, 染色体異常が種々の試験系で陽性 (Kumar et al., 1995), Hexachlorocyclohexan では小核試験も陽性 (Bhunya et al., 1992).

⑤ 農薬類では, Alachlor は変異原性が既知の物質で, いずれの変異原性試験も陽性 (Georgian et al., 1983; Lin et al., 1987). そのほか Dibromochloropropane や, Kelthane, Malathion で姉妹分体交換 (Loveday et al., 1989) や染色体異常が陽性 (Salvadori et al., 1988). 他方, pentachlorophenol には周知のとおりいずれの試験でも変異原性は認められない (Kappas, 1988).

⑥ Chlorotriazin 系除草剤の Atrazine の乳腺腫瘍をはじめとする造腫瘍性 (IARC-class III) が知られているが, 変異原性試験では, Ames 試験は陰性 (Moriya et al., 1983), ショウジョウバエなどによるそのほかの突然変異では陽性 (Torres et al., 1992) のほか, 小核試験 (Gebel et al., 1997), 姉妹分体交換 (Ursini, 1998), 染色体試験 (Infurna et al., 1988) などですべて陽性. Atrazine の EDCs としての作用標的は下垂体と考えられている. これに基づく乳腺腫瘍などの発現機構が研究対象となっている. また, 繁殖試験での交配率の低下が報告されているが, 催奇形性はみられない (Infurna et al., 1988).

この類薬の Metribuzin と Simazine では実験発がん性はみられない (Stevens et al., 1999; Keith et al., 1997) が, 同時に双方とも変異原性陰性となっている (Moriya et al., 1983; De Veer et al., 1994).

⑦ ジチオカルバメイト系殺菌剤での変異原性は Ames の復帰突然変異が Ziram を除いて陰性である (Moriya et al., 1983; De Veer et al., 1994) (ただし Ziram での実験動物での造腫瘍性は陰性と報告されている) (IARC, 1991). 小核試験や姉妹染色体分体交換が散発性に陽性の物質がみられるがこれらとリンクする造腫瘍性や奇形発生はいずれもみられない.

⑧ AhR 結合性を介する芳香族塩素化合物のうち, Benzo [a] pyren は, 変異原性がすべて陽性の genotoxic carcinogen に相当する物質である (Sjogren et al., 1996). また有機塩素系ドリン剤の Endrin では姉妹分体交換も染色体異常もみられ (Dikshith et al., 1973), これを反映するものと考えられる甲状腺癌, 肝癌, 乳腺癌の発生がみられるほか, 催奇形性も知られている. そのほかの物質では, 変異原性は PCB と dioxins に単鎖切断がみられる程度であるが, いずれも薬物代謝酵素の CYP 1A1 の惹起を介した造腫瘍プロモーター作用が知られる.

つぎに前章と同様に, EPA の EDCs リストの物質で発がん性を示す文献のない物質の方について変異原性を通覧する.

⑨ カーバメイト系殺虫剤. ER や AR などホルモン受容体への結合性を持つか, もしくは甲状腺ホルモンの変化を惹起することが知られる. 造腫瘍性は観察されないが, 精子形成障害が benomyl, carbaryl, vinclozolin などに観察される (Keith et al., 1997). カーバメイト系殺虫剤ではいずれも Ames の復帰突然変異試験は陰性 (Marshall et al., 1976; Sarrif et al., 1994). ただし, 突然変異 (Cid et al., 1984), 小核試験 (Wei et al., 1997), 姉妹染色体分体交換 (Cid et al., 1984; Dolara et al., 1992) および染色体異常 (Gonzalez et al., 1987) などが散見される.

⑩ ピレスロイド系の殺虫剤. AR 結合性や甲状腺機能亢進を来すことにより EDCs との可能性が想定されているもので, 突然変異, 小核試験, 姉妹染色体分体交換などの陽性結果や染色体異常が散見される (Dianovsky et al., 1995) が, Ames の復帰突然変異試験はいずれも陰性 (Herrera et al., 1990). Cypermethrin で観察されている奇形胚 (ICI Americas, Inc., 1978 b), esfenvalerate で観察される魚類の成長遅延など (Tanner et al., 1996) と, 散見される変異原性陽性所見とがリンクするのかどうかは, 文献上の検討の範囲では明らかでない. fenvalerate や permethrin で観察される神経障害 (Cavaliere et al., 1990) は本剤固有の薬効がほ乳類に及ぶ可能性を示唆したものであり今後の進展を注視する必要がある.

⑪ フェノール類のようなプラスチック可塑剤およびフタレートなどの樹脂関連物質では, ペルオキシゾーム増殖剤の DEHP や DEHA のようなものを除くと, 発がん

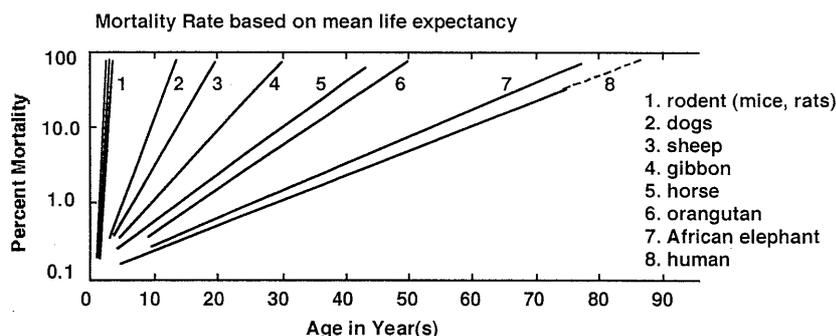


Fig. 1 各種ほ乳類の死亡曲線 (Trosko, J. E. and T. Inoue 1997).

データの出典：齧歯類およびイヌのデータは、筆者原著より、ヒトのデータは、厚生省人口動態統計をもとに筆者が算出、その他の動物は、Cutler, R.G. (1984)のデータより外挿した(筆者原図)。

性が見い出されない(Catharine et al., 1997). 催奇形性(Yagi et al., 1980)や繁殖毒性(IARC, 1982)などの可能性についてはデータが十分に存在しない傾向はあるが、調べられている限りでは支持データはみられない(Keith et al., 1997). 変異原性についてもこれと符合して(?)調べられている限りのAmes復帰突然変異は認められない(Seed, 1982). スチレンについてはホルモン受容体との結合反応がまったくみられないが、モノマー代謝産物でのAmes試験や姉妹染色体分体交換などは陽性である(Tomita et al, 1982; Milvy et al., 1976; Lee, et al., 1995). Bisphenol Aの変異原性試験はこのグループの中ではよく調べられている方の部類に属するが、何れの資料でもすべて陰性(NTP, 1982; NTP, 1985 a; NTP, 1986 a, Schweikl et al., 1998; Ivett et al., 1989). またフタレート類では報告がみられない。

以上にみたような変異原性の消長とEDCsとしての性質がどこまでリンクしているのかについては未検討である。核内受容体のシグナルのリンク関係の充分明らかでない現状にあってはこの面からも多分にはっきりしないことが少なくない。

6. 環境化学物質と生命系

EDCsが生態系に対する種の絶滅を生ずる危惧によって注目されたことと関連して、このものの生命体の寿命に与える影響にも関心が高まっているが、まとまった検討はなされていない。胎児期に暴露されて神経形成なりに生ずる不顕性の遺残性の障害があった場合、これを顕在化する因子として、老化による神経細胞の脱落とこれに伴う機能相補の不全が想定される。Weiss(1988)は、この立場からパーキンソン病での神経細胞消失と同様の事柄がEDCsで生ずる可能性を考察しているが、推論にとどまっており、証左を得るには至っていない。

老化の発現機構と種々の毒性物質による細胞・組織障害の発現機構との間には密接な関係がある。寿命の短い生物は一般論としては、毒性物質に対する感受性が高いことが通念だからである。悠久の昔、生物が発生して以来、生物の寿命が外界の放射線あるいは紫外線、そして強烈な活性酸素に抗して、進化してきたことを考えるならば、これは当然のことでもある。そしてそのことは、毒性物質による生体への細胞・組織障害を、寿命に対するリスクとして理解することの意義を意味していると考えられる(Trosko and Inoue, 1997). すべてではないが多くの生物には固有の自然寿命がある。生物の発生・成長過程と同様に、寿命は個々の生物固有の長さにプログラムされているものと信じられている。かつてSacher(1959, 1978)は、種々の動物の自然寿命が“脳重量”や“脳重量を体重で割った値(脳の比重量)”の関数で表わされることを見出した。生物の死亡率は年齢とともに指数関数的に増加するので、縦軸に対数目盛で単位時間あたりの死亡率をとり、横軸に年齢をとると、その死亡率の変化は右上がりの直線関係をとる(Fig. 1)(Trosko and Inoue, 1997). この寿命曲線の変化をみると、齧歯類からヒトに至るまで急峻な傾きが、急速に平坦化していることがわかる(Aimes, 1973; Cutler, 1984).

年齢に対して死亡率の変化を対数で表したときに、ヒトの寿命曲線がFig. 1でみたようにほぼ直線関係をとることは、Gompertz(1825)によって150年以上も前に発見された。このものの生物学的な意味は、生物が死に向かう際、そのリスクは多数の因子の“積”の形をとって表現される一連の関数関係に収束しているということである(老化の多因子乗算論)^{脚注1}。

EDCsがそうしたファクターの一つになり得るとすれば、タバコのリスクでも試算が示されると同様、先のFig. 1で示した寿命カーブの傾きが急峻なカーブを描く

脚注1 ただしこのカーブは、ほ乳類の中でも純系の実験動物のように近交化がすすみ、比較的均一な死因スペクトルをとって死亡するような動物種では、その死亡期分布はむしろ正規分布に近くなり、死亡曲線もガウス分布を反映した単純なものへと収束する。

方に立ち上がるものと予測される。先に述べた Weiss の推論では, McGeer et al. (1988) のパーキンソン病における大脳基底核の細胞喪失速度を示している。基底核の細胞数の変化が脳重量のそれに平衡するかの如何についてはここでは立ち入らないが, Weiss の推論は, Fig. 1 の寿命カーブが急峻に傾くという推論と同じ意味を持っている。すなわち EDCs でも早期加齢を促す可能性を意味していることになる。既知の強い EDCs を実験動物に投与してこのことを確かめることはそれ程困難なことではないであろう。

結 語

ホルモン様の作用を持つ化学物質の影響の特徴を、もう一度整理しておこう。このものは、基本的には転写因子である受容体と結合して、当該受容体を活性化し、標的遺伝子のプロモーター部位に結合して、転写調整を障害するという性質に由来する。ある意味で、通常の化学物質作用の中では特異な反応性の化学物質と考えるべきだと思う。こうした受容体との結合には種間交差性が強く、低容量、極微量の作用性を持っていて、またホルモン構造の類似性とも相俟って、さまざまな受容体に同時に働くことが少なくないことがある。

内分泌系は、下垂体、副腎、性腺、といった系や、甲状腺、ランゲルハンス島だけでなく腸管、肺、肝臓といったあらゆる臓器の中に内包されるような構造になっていることが知られている。他方、免疫系や中枢神経系でも、相互に内分泌系と似た分子機能を持ったシグナル伝達系が発達しており、これらは相互の細胞内シグナル・クロストークを持つ高次機能調節系として働いている。たとえば、エストロゲン受容体の転写活性化部位にはセリンリン酸化部位があり、このセリンを膜結合型受容体の細胞内シグナルを司る MAPK がリン酸化することでエストロゲン受容体の転写活性が上昇するという報告がある (Kato et al., 1998)。つまり、上皮増殖因子 (EGF) をエストロゲンと同時に加えることで、エストロゲン反応が増強されることを意味する。内分泌系はホメオスタシスのいわば平衡機能を担っていると考えられる。ホルモン様の作用を持つ化学物質の中には、当然こうした系全体に作用するものが含まれている可能性がある。これら高次系調節そのものに与える影響といった視点も合わせて今後の研究を進めていくことが重要であろうと考えられる。

謝 辞

本稿の基礎は、平成 11 年度厚生科学研究・生活安全総合研究事業研究費、平成 11 年度科学技術振興調整費における生活・社会基盤研究のうちの生活者ニーズ対応研究“内分泌攪乱物質による生殖への影響とその作用機構に関する研究”、ならびに平成 11 年度国立医薬品食品衛生

研究所特定研究費などによって得られた結果に基づいている。また、ご校閲戴いた変異遺伝部長・林 真先生 (国立医薬品食品衛生研究所)、本稿の作製作業にご協力戴いた北條美伸氏 (国立医薬品食品衛生研究所) に衷心よりお礼を申し上げます。

参考文献

- Aimes, B.N. (1973) Cancer, aging, and endogenous DNA damage. In: "DNA damage and repair", Castellani A. Ed. Plenum Press, NY, pp. 291-298.
- Arnold, S.F., D.M. Klotz, B.M. Collins, et al. (1996) Synergistic activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals, *Science*, 272, 1489-1492.
- Ashby, J., P.A. Lefevre, J.O. Dum, et al. (1997) Synergy between synthetic oestrogen? *Nature*, 385, 494.
- BASF Wyandotte Corporation (1982) MRID No. 00110446; HED Doc. No. 002214. Available from EPA. Write to FOI, EPA, Washington DC. 20460.
- Becker, F.F., S. Sell (1979) Fetoprotein levels and hepatic alterations during chemical carcinogenesis in C57BL/6N mice, *Cancer Res.*, 39, 3491-3494.
- Bhunya, S.P., G.B. Jena (1992) Genotoxic potential of the organochlorine insecticide lindane (gamma-BHC): an in vivo study in chicks, *Mutat Res*, 272, 175-181.
- Bitman, J., H.C. Cecil, S.J. Harris et al. (1968) Estrogenic activity of *o,p'*-DDT in the mammalian uterus and avian oviduct, *Science*, 162, 371-372.
- Bradbury, R.B., D.E. White (1954) Oestrogens and related substances in plants, *Vitamins, Hormones*, 12, 207-233.
- Brandenberger, A.W., M.K. Tee, J.Y. Lee et al. (1997) Tissue distribution of estrogen receptors alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the midgestational human fetus, *J Clin Endocrinol Metab.*, 2, 3509-3512.
- Carpenter, C.P., C.S. Weil, H.F. Smyth (1953) Chronic oral toxicity of di (2-ethylhexyl) phthalate for rats and guinea pigs, *Arch Indust Hyg Occup Med.*, 8, 219-226.
- Catharine, A.H., H. Pirkko, G.P. Malcolm et al. (1997) The estrogenic activity of phthalate esters *in vitro*, *Environ Health Perspect*, 105, 802-811.
- Catharine, A.H., H. Pirkko, G.P. Malcolm et al. (1997) The estrogenic activity of phthalate esters *in vitro*, *Environ Health Perspect*, 105, 802-811.
- Cavaliere, M.J., M.Y. Maeda, L.W. Shih et al. (1990) Changes in myelinated nerve fibers and skeletal muscle of rats exposed to high doses of permethrin, *Biomed Environ Sci*, 3, 139-145.
- Cid, M.G., E. Matos (1984) Induction of sister-chromatid exchanges in cultured human lymphocytes by Aldicarb, a carbamate pesticide, *Mutat Res*, 138, 175-179.
- Cutler, R.G. (1984) Antioxidants, aging, and longevity, In: "Free Radicals in Biology", Vol.6, W.A.Pryor, Ed., Academic Press, N.Y.
- Davis, K.J., O.G. Fitzhugh (1962) Tumorigenic potential of aldrin and dieldrin for mice, *Toxicol Appl Pharmacol*, 4, 187-189.
- Deichmann, W.B., M. Keplinger, F. Sala et al. (1983) Synergism among oral carcinogens. IV. The simultaneous feeding of four tumorigens to rats, *Toxicol Appl Pharmacol.*, 11, 88-103.

- De Veer, I., H.J. Moriske, H. Ruden (1994) Photocyclical decomposition of organic compounds in water after UV-irradiation: investigation of positive mutagenic effects. *Toxicol Lett*, 72, 113-119.
- Dianovsky, J., K. Sivikova (1995) *In vivo* and *in vitro* cytogenetic effect of supermethrin, *Biomed Environ Sci*, 8, 359-366.
- Dikshith, T.S., K.K. Datta (1973) Endrin induced cytological changes in albino rats, *Bull Environ Contam Toxicol*, 9, 65-69.
- Dodds, E.C., W. Lawson (1938) Molecular structure in relation to oestrogenic activity. Compounds without a phenanthrene nucleus, *Proc Royal Soc Lon B.*, 125, 222-232.
- Dolara, P., M. Salvadori, T. Capobianco et al. (1992) Sister-chromatid exchanges in human lymphocytes induced by dimethoate, omethoate, deltamethrin, benomyl and their mixture, *Mutat Res*, 283, 113-118.
- FAO/WHO (1993), Pesticide Residues in Food-1992 Evaluation. Part II (Toxicology), World Health Organization, WHO/PCS/93, 34.
- FAO and WHO working group (1994) Metiram. Pesticide Residues in Food-1993. Toxicology Evaluations, 311-331.
- Friedman, W.J., B.S. McEwen, C.D. Toran-Allerand et al. (1983) Perinatal development of hypothalamic and cortical estrogen receptors in mouse brain: Methodological aspects, *Develop Brain Res*, 11, 19-27.
- Gebel, T., S. Kevekordes, K. Pav et al. (1997) *In vivo* genotoxicity of selected herbicides in the mouse bone-marrow micronucleus test, *Arch Toxicol*, 71, 193-197.
- Georgian, L. (1978) The comparative cytogenic effects of aldrin and phosphamidon, *Mutat Res*, 31, 103-108. NCI (National Cancer Institute). Bioassays of aldrin and dieldrin for possible carcinogenicity. DHEW Publication No. (NIH) 78-821. NCI Carcinogenesis Tech Rep Ser. No. 21. NCI-C6-TR-21.
- Georgian, L. (1975) The comparative cytogenetic effects of aldrin and phosphamidon, *Mutat Res*, 31: 103-108.
- Georgian, L., I. Moraru, T. Draghicescu et al. (1983) Cytogenetic effects of alachlor and mancozeb, *Mutat Res*, 116, 341-348.
- Gerlach, J., B.S. McEwen, C.D. Toran-Allerand et al. (1983) Prenatal development of estrogen receptors in mouse brain assessed by radioautography, nuclear isolation and receptor assay, *Develop Brain Res*, 11, 7-18.
- Gomes, F.C., C.G. Naia, J.R. de Menezes, V.M. Neto (1999) Cerebellar astrocytes treated by thyroid hormone modulate neuronal proliferation, *Glia*, 25, 247-255.
- Gompertz, B. (1825) On the nature of the function expressive of the law of human mortality and on a new mode of determining life contingencies, *Philos Trans Royal Soc. (London)*, 115, 513.
- Gonzalez, Cid, M., E. Matos (1987) Chromosomal aberrations in cultured human lymphocytes treated with aldicarb, a carbamate pesticide, *Mutat Res*, 191, 99-103.
- Gray Jr., L.E., W.R. Kelce, T. Wiese et al. (1997) Endocrine screening methods workshop report: Detection of estrogenic and androgenic hormonal and anti-hormonal activity for chemicals that act via receptor or steroidogenic enzyme mechanism, *Reprod Toxicol*, 11, 719-750.
- Hamburgh, M. (1969) The role of thyroid and growth hormones in neurogenesis, *Curr Top Dev Biol*, 4, 109-48.
- Herrera, A., E. Laborda (1990) Mutagenic activity in synthetic pyrethroids in *Salmonella typhimurium*, *Mutagenesis*, 3, 13-18.
- Hershberger, L., E. Shipley, R. Meyer (1953) "Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method", *Proc Soc Exp Biol Med.*, 83, 175-180.
- Hirata, S., N. Yamada-Mouri, M. Nara et al. (1995) Presence of alternatively spliced-estrogen receptor mRNA variants in normal human uterine endometrium and endometrial cancer, *Endocr J.*, 42, 289-293.
- Hodge, H.C., E.A. Maynard, H.J. Blanchet Jr (1952) Chronic oral toxicity tests of methoxychlor (2,2-Di-(p-methoxyphenyl)-1,1,1-trichloroethane) in rats and dogs, *J Pharmacol Exp Ther.*, 104, 60-66.
- Hoffman, D.J., W.C. Eastin Jr. (1982) Effects of lindane, paraquat, toxaphene, and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid on mallard embryo development, *Arch Environ Contam Toxicol.*, 11, 79-86.
- Huber, W.W., B. Grasl-Kranpp, R. Schulte-Hermann (1996) Hepatocarcinogenic potential of di(2-ethyl-hexyl) phthalate in rodents and its implications on human risk, *Crit Rev Toxicol*, 26, 365-481.
- Huff, J., G. Lucier, A. Tritscher (1994) Carcinogenicity of TCDD experimental, mechanistic, and epidemiologic evidence, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 34: 343-372.
- Hurley, P.M. (1998) Mode of carcinogenic action of pesticides inducing thyroid follicular cell tumors in rodents, *Environ Health Perspect*, 106, 437-45.
- IARC (1982) Some Industrial Chemicals and Dyestuffs, di(2-ethylhexyl) phthalate. International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, 29.
- IARC (1983) Dicofol. International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, 30, 87-101.
- IARC (1991) Fenvalerate. International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 53.
- IARC (1991) Occupational exposures in insecticide application, and some pesticides Permethrin. International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, 53.
- IARC (1991) Occupational exposures in insecticide application and some pesticides, Aldicarb. International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 53.
- IARC (1991) Simazine. International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, 53, 495-513.
- IARC (1991) Ziram. International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. 53, 423-438.
- IARC (1997) Polychlorinated dibenzo-para-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. International Agency for Research on Cancer Monographs on Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 69.
- ICI Americas, Inc. (1978b) Accession No. 099855. Available from EPA. c/o FOI, EPA, Washington D.C. 20460.
- Iguchi T, et al. (1999) Unpublished data.
- Infurna, R., B. Levy, C. Meng et al. (1988) Teratological

- evaluations of atrazine technical, a triazine herbicide, in rats and rabbits, *J Toxicol Environ Health*, 24, 307-319.
- IPCS (1989) Cypermethrin. International Program on Chemical Safety Environmental Health Criteria 82.
- Ivett, J.L., B.M. Brown, C. Rodgers et al. (1989) Chromosomal aberrations and sister chromatid exchange tests in Chinese hamster ovary cells *in vitro* IV. Results with 15 chemicals, *Environ Mol Mutagen*, 14, 165-187.
- Kappas, A. (1988) On the mutagenic and recombinogenic activity of certain herbicides in *Salmonella typhimurium* and in *Aspergillus nidulans*, *Mutat Res*, 204, 615-621.
- Kato, S., H. Endoh, Y. Masuhiro et al. (1998) Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen activated protein kinase, *Science*, 270, 1491-1494.
- Keith, L.H., Metribuzin. (1997) In: *Environmental Endocrine Disruptors: a Handbook of Property Data*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 870-895.
- Keith, L.H. (Ed) (1997) *Environmental Endocrine Disruptors: a Handbook of Property Data*. John Wiley & Sons, Inc., New York, p. 1232.
- Kover, K., L. Liang, G.K. Andrews et al. (1995) Differential expression and regulation of cytokine genes in the mouse uterus, *Endocrinol.*, 136, 1666-1673.
- Krishnan, A.V., P. Starhis, S.F. Permuth et al. (1993) Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving, *Endocrin.*, 132, 2279-2286.
- Kuiper, G.G., B. Carlsson, K. Grandien et al. (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinol*, 138, 863-870.
- Kumar, D., P.K. Khan, S.P. Sinha (1995) Cytogenetic toxicity and no-effect limit dose of pesticides, *Food Chem Toxicol*, 33, 309-314.
- Lee, S.H., H. Norppa (1995) Effects of indomethacin and arachidonic acid on sister chromatid exchange induction by styrene and styrene-7,8-oxide, *Mutat Res*, 348, 175-181.
- Lemmen, J.G., Broekhof J. LM, Kuiper GGJM, et al. (1999) Expression of estrogen receptor alpha and beta during mouse embryogenesis, *Mechan Develop*, 81, 163-167.
- Lessa, J.M., Becak, W. Nazareth M. Rabello et al. (1976) Cytogenetic study of DDT on human lymphocytes *in vitro*, *Mutat Res*, 40, 131-138.
- Leygue, E.R., P.H. Watson, L.C. Murphy (1996) Estrogen receptor variants in normal human mammary tissue, *J Nat'l Cancer Inst.*, 88, 284-290.
- Lin, M.F., Wu, C.L., T.C. Wang (1987) Pesticide clastogenicity in Chinese hamster ovary cells, *Mutat Res*, 188, 241-250.
- Loveday, K.S., M.H. Lugo, M.A. Resnick et al. (1989) Chromosome aberration and sister chromatid exchange tests in Chinese hamster ovary cells *in vitro*: II. Results with 20 chemicals, *Environ Mol Mutagen.*, 13, 60-94.
- Maekawa, A., M. Takahashi, J. Ando et al. (1999) Uterine carcinogenesis by chemicals/hormones in rodents, *J Toxicol Pathol*, 12, 1-11.
- Mahr, U., H.G. Miltenburger (1976) The effect of insecticides on Chinese hamster cell cultures, *Mutat Res*, 40, 107-118.
- Majumdar, S.K., H.A. Kopelman, M.J. Schnitman (1976) Dieldrin-induced chromosome damage in mouse bone-marrow and WI-38 human lung cells, *J Hered*, 67, 303-307.
- Marshall, T.C., H.W. Dorough, H.E. Swim (1976) Screening of pesticides for mutagenic potential using *Salmonella typhimurium* mutants, *J Aric Food Chem*, 24, 560-563.
- McGeer, P.L., S. Itagaki, H. Akiyama et al. (1988) Rate of cell death in Parkinsonism indicates active neuropathological process, *Ann Neurol*, 24, 574-576.
- McGregor, D.B., A.G. Brown, S. Howgate et al. (1991) Responses of the L5178Y mouse lymphoma cell forward mutation assay. V: 27 coded chemicals, *Environ Mol Mutagen*, 17, 196-219.
- Meisner, L.F., D.A. Belluck, B.D. Roloff (1992) Cytogenetic effects of alachlor and/or atrazine *in vivo* and *in vitro*, *Environ Mol Mutagen.*, 19, 77-82.
- Milvy, P., A.J. Garro (1976) Mutagenic activity of styrene oxide (1,2-epoxyethylbenzene), a presumed styrene metabolite, *Mutat Res*, 40, 15-18.
- Moriya, M., T. Ohta, K. Watanabe et al. (1983) Further mutagenicity studies on pesticides in bacterial reversion assay systems, *Mutat Res*, 116, 185-216.
- Nakanishi, T. (1996) Neuronal ion channels as the target sites of insecticides, *Pharmacol and Toxicol*, 78, 1-14.
- NCI (National Cancer Institute) (1977) Bioassay of chlordane for possible carcinogenicity. NCI Carcinogenesis Tech. Rep. Ser. No. 8. US DHEW Publ. No. (NIH) 77-808. Bethesda, MD.
- NCI (1977) Bioassay of lindane for possible carcinogenicity. National Cancer Institute Carcinogenesis Technical Report Series No. 14.
- NCI (National Cancer Institute) (1978) Bioassays of DDT, TDE and p,p'-DDE for possible carcinogenicity. NCI Report No. 131. DHEW Publ. No. (NIH) 78-1386.
- Norris, J.D., D. Fan, M.R. Stallcup et al. (1998) Enhancement of estrogen receptor transcriptional activity by the coactivator GRIP-1 highlights the role of activation function 2 in determining estrogen receptor pharmacology, *J Biol Chem*, 273, 6679-6688.
- NTP (1982) Carcinogenesis bioassay of di-(2-ethylhexyl) adipate in F344 rats and B6C3F1 mice. National Toxicol Program Technical Report Series, No. 212.
- NTP (1982) (National Toxicology Program). NTP Technical Report on the carcinogenesis bioassay of bisphenol A in F344 rats and B6C3F1 mice (feed study), NTP-80-35. NIH Publ. No. 82-1771.
- NTP (1983) Carcinogenesis Bioassay of Ziram. National Toxicology Program Technical Report Series, No. 238.
- NTP (National Toxicology Program) (1985a) Teratologic evaluation of bisphenol A in F344 administered to CD-1 mice on gestational days 6-15, NTP, NIEHS, Research Triangle Park, NC.
- NTP (1986a) (National Toxicology Program). Teratologic evaluation of bisphenol A administered to CD9R rats on gestational days 6-15, NTP, NIEHS, Research Triangle Park, NC.
- Ottolenghi, A.D., Haseman, J.K., Suggs, F. (1988) Teratogenic effects of aldrin, dieldrin, and endrin in hamsters and mice, *Teratology*, 9, 75-81.
- Pfeffer, U. (1996) Estrogen receptor. mRNA variants. Do they have a physiological role? *Ann N Y Acad Sci*, 784, 304-313.
- Rashid, K.A., R.O. Mumma (1986) Screening pesticides for their ability to damage bacterial DNA, *J environ Sci Health [B]*, 21, 319-334.

- Robertson, S.A., G. Maryhofer, R.F. Seamark (1992) Uterine epithelial cells synthesize granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 in pregnant and non-pregnant mice, *Biol Reprod.*, 46, 1069-1079.
- Sacher, G.A. (1959) Relation of lifespan to brain weight and body weight in mammals. In: Ciba Foundation Colloquia on Ageing. Vol 5, The Lifespan of Animals. (Eds.) G.A.W. Wolstenholme and M. O'Connor, Churchill, London.
- Sacher, G.A. (1978) Longevity and aging in vertebrate evolution, *Bioscience*, 28, 497-501.
- Saegusa, J., K. Kawai (1986) Fibrosarcoma induced by repeated administration of 1,2-dibromo-3-chloropropane (DPCP), *Toxicol Letters*, 31(Suppl), 202.
- Safe, S. (1984) Polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated biphenyls (PBBs): biochemistry, toxicology and mechanism of action, *Crit Rev Toxicol*, 13, 319-395.
- Salvadori, D.M., L.R. Ribeiro, C.A. Pereira et al. (1988) Cytogenetic effects of malathion insecticide on somatic and germ cells of mice, *Mutat Res*, 204, 283-287.
- Sarkar, D., A. Sharma, G. Talukder (1993) Differential protection of chlorophyllin against clastogenic effects of chromium and chlordane in mouse bone marrow *in vivo*, *Mutat Res*, 301, 33-38.
- Sarrif, A.M., G.T. Arce, D.F. Krahn et al. (1994) VL. Evaluation of carbendazim for gene mutations in the Salmonella/Ames plate-incorporation assay: the role of aminophenazine impurities, *Mutat Res*, 321, 43-56.
- Schwabe, J.W., L. Chapman, J.T. Finch et al. (1993) The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: How receptors discriminate between their response elements, *Cell*, 75, 567-578.
- Schweikl, H., G. Schmalz, K. Rackebandt (1998) The mutagenic activity of unpolymerized resin monomers in Salmonella typhimurium and V79 cells, *Mutat Res*, 415, 119-130.
- Seed, J.L. (1982) Mutagenic activity of phthalate esters in bacterial liquid suspension assays, *Environ Health Perspect*, 45, 111-114.
- Shirai, T., S. Fukushima, E. Ikawa et al. (1986) Induction of prostate carcinoma *in situ* at high incidence in F344 rats by a combination of 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl, *Cancer Res*, 46, 6423-6426.
- Shirai, T., A. Nakamura, S. Fukushima et al. (1990) Different carcinogenic responses in a variety of organs, including the prostate, of five different rat strains given 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl, *Carcinogenesis*, 11, 793-797.
- Shughrue, P.J., M.V. Lane, I. Merchenhaler (1997) Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and-beta mRNA in the rat central nervous system, *J Comp Neurol*, 388, 507-525.
- Sjogren, M., L. Ehrenberg, U. Rannug (1996) Relevance of different biological assays in assessing initiating and promoting properties of polycyclic aromatic hydrocarbons with respect to carcinogenic potency, *Mutat Res*, 358, 97-112.
- Sobti, R.C., A. Krishan, J. Davis (1983) Cytokinetic and cytogenetic effect of agricultural chemicals on human lymphoid cells *in vitro*. II. Organochlorine pesticides, *Arch Toxicol.*, 52, 221-231.
- Stevens, J.T., C.B. Brechenridge, L. Wetzel (1999) A risk characterization for atrazine: oncogenicity profile, *J Toxicol Environ Health*, 56, 69-109.
- Takagi, A., K. Sai, T. Umemura et al. (1990) Relationship between hepatic peroxisome proliferation and 8-hydroxydeoxyguanosine formation in liver DNA of rats following long-term exposure to three peroxisome proliferators: di (9-ethylhexyl) phthalate, aluminium clofibrate and simfibrate, *Cancer Lett*, 53, 33-38.
- Tanner, D.K., M.L. Knuth (1996) Effects of esfenvalerate on the reproductive success of the bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus* in littoral enclosures, *Arch Environ Contam Toxicol*, 31, 244-251.
- Thorpe, E., AIT. Walker (1973) The toxicology of dieldrin (HEOD). II. Comparative long-term oral toxicity studies in mice with dieldrin, DDT, phenobarbitone, beta-BHC and gamma-BHC, *Food Cosmet Toxicol*, 11, 433-442.
- Tomita, I., Y. Nakamura, N. Aoki et al. (1982) Mutagenic/carcinogenic potential of DEHP and MEHP, *Environ Health Perspect*, 45, 119-125.
- Torres, C., Q. Ribas, N. Xamena et al. (1992) Genotoxicity of four herbicides in the Drosophila wing spot test, *Mutat Res*, 280, 291-295.
- Trosko, J.E., T. Inoue (1997) Oxidative stress, signal transduction and intercellular communication in radiation carcinogenesis, *Stem Cells.*, 15(2), 59-67.
- Tsuda, H., M. Hananouchi, M. Tatsumatsu et al. (1976) Tumorigenic effect of 3-amino-1H-1,2,4-triazole on rat thyroid, *J Natl Cancer Inst*, 57, 861-864.
- United States Environmental Protection Agency (1997) Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis: EPA/630/R-96/0112, Risk Assessment Forum, US Environmental Protection Agency, Washington, D.C. 20460.
- Ursini, M.V. (1998) Cytogenetic damage and induction of pro-oxidant state in human lymphocytes exposed *in vitro* to glyphosate, vinclozolin, atrazine, and DPX-E9636, *Environ Mol Mutagen*, 32, 39-46.
- Velsicol Chemical Corporation (1983b) MRID No. 00138591. Available from EPA. Write to FOI, EPA, Washington, D.C. 20460.
- Verdeal, K., D.S. Ryan (1985) Naturally-occurring oestrogens in plant foodstuffs-a review, *Food Add Contam*, 2, 73-106.
- vom Saal, F.S., B.G. Timms, M.M. Montano et al. (1997) Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses, *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 2056-2061.
- vom Saal, F.S., P.S. Cooke, D.L. Buchanan et al. (1998) A phylogenetically based study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior, *Toxicol Ind Health*, 14, 239-260.
- Wei, L.Y., J.S. Chao, C.C. Hong (1997) Assessment of the ability of propoxur, methomyl, and aldicarb, three carbamate insecticides, to induce micronuclei *in vitro* in cultured Chinese hamster ovary cells and *in vivo* in BALB/c mice, *Environ Mol Mutagen*, 29, 386-393.
- Weiss, B. (1998) A risk assessment perspective on the neurobehavioral toxicity of endocrine disruptors, *Toxicology & Industrial Health*, 14, 341-359.
- Wilson, A.G., D.C. Thake, W.E. Heydens et al. (1996) Mode of action of thyroid tumor formation in the male Long-Evans rat administered high doses of alachlor, *Fundam*

Appl Toxicol, 33, 16-23.

Yagi, Y., Y. Nakamura, I. Tomita et al. (1980) Teratogenic potential of di-and mono-(2-ethylhexyl)phthalate in mice, J Environ Pathol Toxicol, 4, 533-544.

Yasuda, Y., I. Ohara, H. Konishi et al. (1988) Long-term effects on male reproductive organs of prenatal exposure to ethynyl estradiol, Am J Obstet Gynecol, 159, 1246-1250.