

特集：化学物質の内分泌かく乱作用（いわゆる環境ホルモン）に関する対策の現状と今後

哺乳類における内分泌かく乱作用に関する試験法の実際と限界

青山博昭

(財) 残留農薬研究所 毒性部 生殖毒性研究室

Applications and Limitations of *In Vivo* Bioassays for Detecting Endocrine Disrupting Effects of Chemicals on Mammalian Species of Animals

Hiroaki AOYAMA

Laboratory of Reproductive Toxicology, Toxicology Division,
Institute of Environmental Toxicology

抄録

内分泌かく乱作用が疑われる化学物質の低用量影響を評価するため、哺育児数の調整を行わない改良型の1世代繁殖毒性試験を設計した。この試験では、各試験群の半数の腹から得られたF1児を離乳時に屠殺し、全例について、剖検、生殖器官の重量測定、前立腺および子宮におけるエストロゲン応答遺伝子の発現量の測定、および病理組織学的検査を実施する。また、残りの腹から得られたすべての児動物について、離乳後の性成熟過程や性周期を観察した後に12週齢で屠殺し、精子検査を実施するとともに、離乳児と同様の検査を実施する。この試験は、実際に参照エストロゲンであるエチニルエストラジオール (EE) の繁殖毒性を0.3および1.0 mg/kg/dayの用量で検出することが確認されことから、子宮肥大試験 (Uterotrophic assay) とほぼ同等の検出感度を有することが示唆される。この試験では、妊娠・哺育期間を通じてEEを0.01-0.1 mg/kg/dayの用量で暴露した群のF1児動物において、いずれの指標にも形態学的または生理学的な変化が認められなかったにもかかわらず、いくつかのエストロゲン応答遺伝子の発現量が変化した。このことは、F1児動物の遺伝子発現量が、内分泌かく乱作用が疑われる物質の低用量影響を調べるための高感度な指標になることを示唆するものと考えられる。

我々は、内分泌かく乱作用が疑われる22物質について、この試験法により低用量影響の有無を調べた。それぞれの試験では、およそ800匹にのぼるF1児を精査した。しかし、時として体重増加量、臓器重量または遺伝子発現量などの指標に背景データの範囲を上回る変動が被験物質の投与用量とは無関係に観察されたものの、調べたいずれの化合物にも明らかな低用量影響は認められなかった。さらに、動物に給与した飼料の化学分析では、基礎飼料中に植物エストロゲンが豊富に含まれ、フタル酸類などの汚染物質も検出されることが明らかになったことから、通常環境では動物実験により内分泌かく乱作用が疑われる化学物質の低用量影響を正確に検出することは極めて困難であると考えられる。

キーワード：内分泌かく乱作用が疑われる物質、低用量影響、改良型1世代試験、mRNAの発現、飼料中の汚染物質、エチニルエストラジオール (EE)

Abstract :

An enhanced one-generation reproductive toxicity study in rats without adjusting a litter size was proposed as a rapid and reliable screening assay for predicting low-dose effects of suspected endocrine disruptors. This protocol includes detailed examinations (full necropsy, determinations of sex organ weights and mRNA expressions of estrogen-responsive genes in the prostate and uterus, and histopathological examinations of major sex organs) of all F1 pups in a half of litters in each group at weaning. All the remaining weanlings are observed for their sexual maturation and estrous cyclicity until terminal sacrifice at 12 weeks of age, which is followed by sperm analysis and the same examinations as those of pups at weaning. The assay has successively detected adverse reproductive effects of ethynylestradiol (EE), a reference estrogen, on dams at

〒303-0043 茨城県水海道市内守谷町4321番地
Uchimoriya-machi 4321, Mitsukaido-shi, Ibaraki 303-0043, Japan.

dose levels of 0.3 and 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$, suggesting that the sensitivity of this assay is equivalent to that of uterotrophic assay. The exposure of EE at dose levels of 0.01-0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ during the gestation and lactation periods also induced modified expressions of several estrogen-responsive genes in F1 offspring without exhibiting any morphological and physiological alterations. These results suggest that the mRNA expression in treated F1 offspring may be a sensitive marker for monitoring low-dose effects of suspected endocrine disruptors.

We further studied low-dose effects of 22 suspected endocrine disruptors by this assay, in which approximately 800 F1 offspring per each study were examined in detail. However, none of these chemicals showed apparent low-dose effects, although deviations beyond the historical control range were occasionally found in some endpoints such as body weight gains, organ weights and gene expression of certain gene(s) accompanied by no clear dose-response relationship. As the detailed chemical analysis revealed that the basal diet for experimental animals abundantly contains phytoestrogens and was contaminated by several environmental contaminants such as phthalates, accurate detection of low-dose effects of chemicals by in vivo assays is suggested to be almost impossible under the conventional environment.

Keywords : suspected endocrine disruptors, low-dose effects, enhanced one-generation reproductive toxicity study, mRNA expression, contaminants in a diet, and ethynylestradiol (EE)

はじめに

内分泌かく乱物質問題の本質や現状分析に関する議論は本特集に掲載される他の論文に譲るとして、ここではエストロゲン様作用物質に代表される内分泌活性物質に懸念される低用量影響の可能性について、環境省プロジェクトとして実施された一連の1世代繁殖毒性試験の結果を参照しつつ議論する。

低用量影響とは、ヒトが現実暴露されるような用量や、標準的な毒性試験で調べられる用量よりも低い用量で引き起こされる生物学的な変化を指す。この問題は、合成エストロゲンであるDiethylstilbestrol (DES)や弱いエストロゲン様作用をもつビスフェノールA (BPA) を様々な用量で妊娠マウスに投与して生まれた雄の前立腺重量を測定すると、極めて低い用量 (DESでは0.02 - 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$, BPAでは2および20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) で重量の増加が観察されるとの報告 (Nagel et al., 1997; vom Saal et al., 1997) に端を発する。その後、世界中でこれらの実験の追試や類似の実験が行なわれ、特にBPA

の低用量 (通常の毒性試験で無毒性量とされる50 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ の数十分の1から数万分の1の用量) 影響に関しては、Nagelらの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数多くなされた (NTP 2001)。しかし、互いに相矛盾するこれらの実験結果を統一的に説明する合理的な仮説は未だに提唱されておらず、これらの低用量影響が“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。

ところで、悪影響か否かも断定できないような低用量影響に関して、この問題が毒性学分野では何故にこれほど重要視されるのであろうか? これまで、化学物質のリスクは、その物質の暴露用量と暴露を受けた動物の示す反応との間にほぼ直線的な関係 (反応が用量に依存して単調に増加したり単調に減少したりする関係) が成り立つ (Fig. 1) ことを前提にして評価されてきた。すなわち、ある化学物質について動物実験で得られた無毒性量 (No Observed Adverse Effect Level, NOAEL) を一定の安全係数 (通常は100とする) で除した値を求めて1日当たりの許容摂取量 (Accepted Daily Intake, ADI) とし、ヒトに対する推定暴露量がそれ以下であれば安全であるとの判断が下されてきたのである。しかし、仮に内分泌かく乱物質のようなある特定の化学物質の暴露を受けた場合にはこのような用量反応関係が成り立たず、Fig. 2に示す如く、比較的低用量では動物にある反応 (例えば重量の増加) がみられ、それより用量が高くなると見かけ上の無毒性量を経て低用量における反応とは逆方向の反応 (重量の低下) を示すこと (このような反応は“逆U字現象”と呼ばれる) が事実であるならば、見かけ上の無作用量や無毒性量を基準にしたこれまでのリスク評価ではヒトの安全がまったく担保されないこととなる。何故ならば、高用量域における毒性量 (中毒量) と見かけ上の無毒性量を実験的に確かめることができたとしても、それらの数十分の1から数万分の1の用量のどこかに存在する言わば“第二の毒性用量”を確認しない限り、危険な用量を知ることとそれを避けることもで

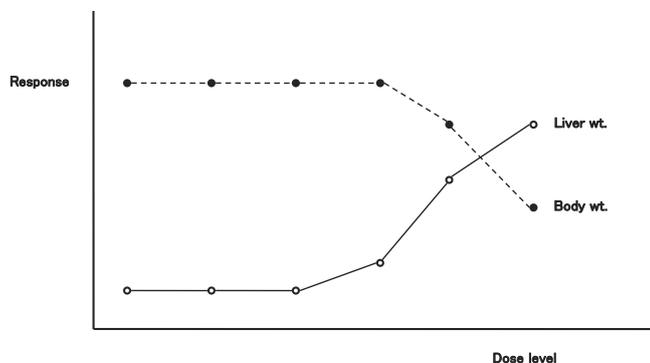


Fig 1 Schematic dose-response curves of body weights and liver weights in animals treated with a usual endocrine inactive toxicant.

きなくなるからである。しかし、これまでの動物実験で、果たして本当に低用量影響の有無が評価できているのであろうか？

本稿では、動物実験実施時に生ずる避けられない誤差に注目して、まず動物実験の精度、検出力および限界などについて考察する。ついで、これらの誤差を極力排した精密な動物実験の結果に基づいて、低用量影響の本質について議論する。

**動物実験を実施する際に観察される誤差
動物に起因する誤差**

言うまでもないことであるが、様々な動物実験で観察される指標（体重、摂餌量、臓器重量、産児数など）にはすべて個体差が存在する。我々の研究室におけるデータを見ても、同じ系統のラットであっても1腹当たりの出産児数は決して一定でなく、出産時における新生児の体重は同腹の兄弟でも僅かながら互いに異なる。また、これらのデータに関して、ロット毎の平均値も僅かにずれるし、ラットの系統が異なれば様々な指標に系統間で微妙な差も観察される（Aoyama et al., 2002；青山と寺本, 2004）。さらに、動物の体重と同腹児数の間には相関関係があり、1匹の雌が哺育する児の数が一定（通常は哺育4日の時点で雌雄4匹ずつ合計8匹となるように調整する）である場合にはどの腹の児の体重も比較的良く揃うが、哺育児数を調整しない場合は同腹児数が多くなるに連れて児の体重が小さくなる傾向が明らかである。生殖・発生毒性試験で通常使用される系統のラットでは、哺育児数を調整した場合は体重や臓器重量といったデータの分散が比較的小さくなり、10%前後の変動係数（標準偏差/平均値）が得られる。また、動物の扱いに十分習熟した研究者や技術者が試験を担当すると、産児数や哺育児の生存率に関してもほぼ同じ程度の変動係数が得られる。

一方、出産児の性比などは往々にして理論値（雄：雌 = 1：1）から著しくずれることがあり、精子数、動物の行動量（例えばオープンフィールドテストと呼ばれる行動試験における動物の立ち上がり回数や移動区画数）、種々のホルモン

の血中濃度などの指標については、対照群のデータであっても変動係数がしばしば50%を超え、場合によっては標準偏差が平均値を上回ることもすらある。さらに、いかなる系統の動物を用いてもその系統特有の自然発生奇形や変異が様々な頻度で観察される（Aoyama et al., 2002; Nakatsuka et al., 1997）し、動物生産業者のコロニーに一定の頻度で奇形を誘発する劣性遺伝子が保持されていて、生殖・発生毒性試験を実施する過程で得られた児動物でそれらの遺伝子がホモとなって顕在化することもある（Aoyama et al., 1988; Kaneda et al., 1989）。

毒性学領域の研究に携わる研究者は、実験動物に内在するこれらの生物学的誤差を十分に考慮した上で実験計画を立て、単に統計学的検定結果（有意差の有無）にばかり気を取られず、それぞれの指標の信頼度を考慮しつつ客観的にデータを解析する必要がある。

飼育環境や実験手法に起因する誤差

通常の動物実験では、動物に給与する飼料や飲料水に、内分泌活性物質を含む様々な汚染物質（コンタミナント）が混入している。また、雑食性の動物であるラットやマウス用の飼料には蛋白源として大豆類が含まれているため、これらに由来する植物エストロゲンが相当量含まれる。例えば、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ると、ダイジンやゲニスチンなどの植物エストロゲンが飼料1 kg当たり合計で100 μg以上含まれており、その組成や濃度は飼料のロットによってまちまちであった（Table 1）。汚染物質に関しても、内分泌かく乱作用が疑われるフタル酸ジ-2-エチルヘキシル（DEHP）は調べたすべての飼料で1 kg中に数百 μg含まれており、低濃度ながらその他の物質による汚染が認められるロットもあった。これらの物質について、ラットを例にして体重（約250 g）と1日当た

Table 1 Phytoestrogens and major contaminants in basal diets (CE-2) used in enhanced one-generation reproductive toxicity studies.

No. of lots	Concentrations
Analyzed compounds	analyzed (Range)
Phytoestrogens (mg/kg)	
Daidzin	7 62-120
Daidzein	7 ND (<5) -19.0
Genistin	7 83-170
Genistein	7 ND (<5) -32.0
Coumestrol	7 ND (<1) -2.2
Majorcontaminants (μg/kg)	
Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)	5 130-380
Di-n-butylphthalate (DBP)	5 ND (<25) -55
Nonylphenol	3 ND (<15) -22
p,p'-DDE	2 0.09-0.52

ND : Notdetected.

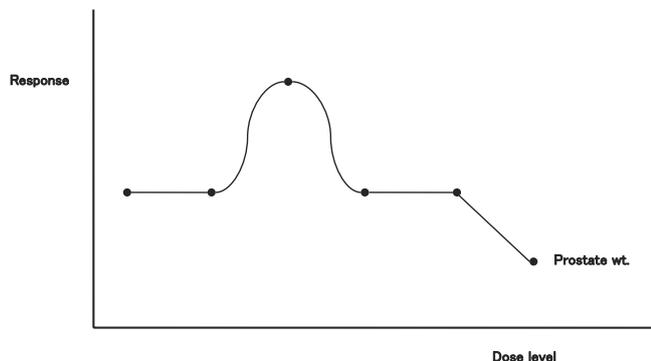


Fig 2 A schematic inverted U-shape dose-response curve in prostate weights of male mice obtained from dams treated with a certain estrogenic endocrine disruptor during pregnancy.

りの摂取量（約20 g）から摂取量を計算してみると、飼料中における植物エストロゲンの総量を100 mg/kgと仮定しても8 mg/kg/day（8000 μ g/kg/day）となって、相当量のエストロゲン様作用物質を摂取していることが理解できる。さらに、DEHPの摂取量は同様に10~30 μ g/kg/day、その他の汚染物質についても場合によっては様々な物質を数 μ g/kg/dayずつ複合摂取していることとなり、コンタミネーションフリーの条件下で動物実験を実施することは事実上不可能であると結論することができる。したがって、いかなる実験においても対照群の動物が既にエストロゲン様作用物質を含む様々な内分泌活性物質を相当量摂取していると考えべきであり、このような条件下で弱い内分泌活性を持つ物質の低用量影響を評価することは極めて困難であることが示唆される。

一方、飼料の汚染とは別に、動物実験では実験手技により引き起こされると考えられる誤差も必ず生ずる。生殖・発生毒性試験で最も深刻な問題は、哺育児数調整の有無に伴う誤差に関するものである。先に述べたように、哺育児の平均体重と1腹当たりの哺育児数との間には負の相関があるので、児動物の体重や臓器重量に関して個体差（誤差）をなるべく小さくして被験物質の影響を検出する感度を高めようとするれば、哺育期間中に哺育児数を調整することとなる。しかし、哺育期間中に一定の数の児動物だけを残して他を淘汰してしまうと、性成熟や生殖機能などのように離乳後のある時期や成熟後にならなければ調べられないような指標については、淘汰した個体について検査することができなくなる。このような場合（通常の動物実験では、1腹当たり雌雄各1匹の離乳児について検査が実施される）は、選抜による偶然の偏りが往々にして生じ、低頻度で引き起こされる異常の発生を見落とし、逆にある群では偶然に自然発生した異常を持つ個体の頻度が高くなったりして、被験物質の影響を正確に評価することが困難となる。

これらの問題とは別に、データ評価に用いる統計学にも様々な問題が付きまとう。一般に、標本数が大きいほど統計学的検出感度は高くなり、検定結果の信頼性も増す。したがって、各群の標本数（観察数）が10に満たないような小規模の実験では対照群と投与群との間にしばしば偶発的と推測される生物学的に無意味な統計学的有意差がみられ、被験物質の影響を過大評価する事態に陥る。また、統計学的検出力が低いために、被験物質の毒性を見落とす場合もある。いずれにせよ、小規模な実験の結果は必ずしも再現性が高くはないと考えられるので、動物実験から得られるデータを評価する際には、このような誤差についても正しく実体を理解し、信頼性の高い結論を得よう心がける必要がある。

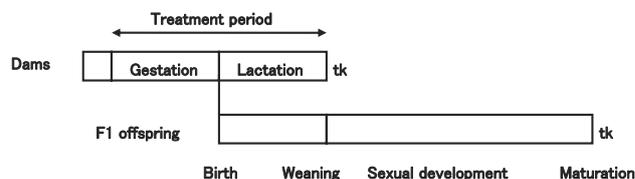
化学物質の低用量影響を正確に検出するための改良型1世代繁殖毒性試験

我々は、上述の如き現状を十分に解析した上で、内分泌かく乱作用が疑われる化学物質の低用量影響評価を目的とした環境省プロジェクトに取り組んだ。すなわち、今日では内分泌かく乱作用が疑われる様々な化学物質の低用量域における

影響に国民の関心が高いこと、動物の生殖や発生に及ぼす影響が最も深刻に懸念されること、および生体の恒常性を維持するフィードバック機構が未熟な胎児や乳幼児が最も感受性が高いと考えられることを念頭において、環境省がSPEED'98（環境省、2000）にリストした内分泌かく乱作用が疑われる様々な化学物質について、ラットを用いた改良型の1世代繁殖毒性試験により低用量影響の有無を評価したのである。今回のプロジェクトでは、先に述べた如く化学物質の低用量影響に関してはNOAELに基づく従来型のリスク評価法が適用できず、これに代わる手法も存在しないことから、敢えてリスク評価を目的とはせず、ヒトが実際に暴露される濃度近傍で生物学的な変化が起こるか否かについて精密な動物実験により検証することを目的とした。

試験法の概略を、Fig. 3に示す。今回のプロジェクトでは、動物の個体差に起因する誤差を可能な限り小さくして被験物質の投与に起因する影響の検出力を高めるため、哺育児数の調整を行わない1世代繁殖試験を採用した。また、原則として動物の最終解剖時期を離乳時（すべての試験で21日齢に統一）または性成熟後（試験ごとに10~12週齢のいずれかに設定）のいずれかと規定し、それぞれの解剖時期に割り当てられたすべての動物について、すべての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）を実施した。さらに、通常の繁殖毒性試験では調べられないことのない指標（遺伝子発現量の解析、行動検査、離乳児の生殖器官と内分泌器官の重量測定と病理組織学的検査など）についても、被験物質の作用特性に応じて適宜検査項目に追加した。

一連の試験では、1群当たりの母動物数を12匹以上と規定し、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。用いた系統のラットの平均産児数が1腹当たり約12匹であることから、1試験当たり800~1000匹（1群当たり150匹前後）の児ラットをすべて精査したこととなる。限られた数とは言えある特定の遺伝子の発現



Endpoints to be examined in F1 offspring:

- Ano-genital distance (AGD)
- Sexual development
- Weights of sex organs including the uterus and prostate
- Sperm analysis
- Necropsy
- Histopathology
- Expression of mRNA (ERs, AR, early responsive genes)

Fig 3 Schematic explanation of an enhanced 1-generation reproductive toxicity study.

量を1000匹近い個体について調べたり、同様の規模で行動検査や病理組織学的検査を実施したりする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。

今回のプロジェクトでは、動物に給与した飼料と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た。その一部を、Table 1に示す。また、それぞれの試験施設で使用する飲料水を、試験開始時と試験終了時に分析した。これらの分析データは、試験結果の評価に際して十分に考慮した。

プロジェクトの開始に先立って、この試験系の検出感度と有効性を確認するため、陽性対照物質としてエチニルエストラジオール (Ethinylestradiol, EE) を用いた検証試験を実施した (Aoyama and Suzuki 2003)。この試験では、試験設計の有効性を詳細に検証するため、遺伝的な変異を持たないことが保証できる近交系ラットを用いた。また、同様の理由から、植物エストロゲンを含まない飼料を給与した。

試験の結果、最高用量群である $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群では妊娠動物が1匹も得られず、 $0.3 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群では出産児数が著しく低下した。これらの結果は、我々の設計した1世代試験により、検出感度が最も高い *in vivo* assay の一つである Uterotrophic assay (Kanno et al., 2002) とほぼ等しい検出感度で母動物に対するEEの生殖毒性を検出することが可能であることを意味する。一方、母動物の生殖機能に影響を及ぼさない用量である $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 以下の用量についてみると、児動物の発育や生存率に変化は何も認められず、性成熟検査、精子検査、および病理学的検査 (生殖器官や主要臓器の重量測定や病理組織学的検査) においても異常は何も検出されなかった。したがって、最も強いエストロゲンの一つと考えられるEEであっても、ある用量未満では動物に表現型として目に見えるような変化は引き起こさないと考えられる。

一方、前立腺と子宮からmRNAを抽出してReal time PCR法により幾つかのエストロゲン応答遺伝子の発現量を定量的に解析したところ、離乳児の前立腺ではER β とARの発現量がすべての投与群で有意に低下しており、子宮ではIGF-1の発現量がすべての投与群で有意に増加していた。これらの結果は、重量や形態などを指標とした場合はそれらに変化のみられない $0.01 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ の用量においても、動物は投与したEEに遺伝子レベルで反応していることを示唆するものと解釈される。成熟後の検査では、雄の前立腺においてER β の発現量が離乳児とは逆に有意に増加しており、ARの発現量にも同様の傾向が認められた。したがって、これらの遺伝子の発現量は常に微妙な調節を受けており、一過性に発現量が低下した遺伝子のあるものについては代償性に発現量の増加が起こることを示唆するものかもしれない。さらに、雌の子宮におけるIGF-1遺伝子については、 $0.01 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群では対照群と同じ水準まで発現量が低下したものの0.03

mg/kg/day以上の投与群では離乳児と同様に高い発現量が維持されていたことから、遺伝子によっては発現調節に時間がかかったり非可逆的な変化が起こったりする可能性を示唆するものかもしれない。

EEを用いた試験により、改良型1世代繁殖毒性試験の実用性と検出感度が十分であると判断されたので、引き続き内分泌かく乱作用が疑われる化学物質の低用量影響評価に着手した。但し、ヒト集団には遺伝的な多型が存在することと、豆類に含まれる植物エストロゲンは栄養素としてヒトも日常的に摂取していることを考慮して、一定の水準で遺伝的多型性が保持されている系統のラットを用いて、飼料中の植物エストロゲンを制限しない条件で試験を実施した。このプロジェクトは現在も継続されており、環境省が選定した優先物質 (原則として単年度当たり約8物質) について、順次評価が進んでいる。

環境省では、これまでに得られた1試験当たり800匹を超える数の児動物の詳細な観察結果を親動物に関するデータとともに取りまとめ、22物質について評価結果を公表している (環境省, 2004)。この内容をみると、p,p'-DDT、ビスフェノールAおよびフタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP) を含む10物質については、環境濃度近傍の低用量暴露では動物に何も変化が起こらなかったか、動物の体重、摂餌量、行動量、特定臓器の重量または血中ホルモン濃度などの指標の一部に生理学的変動の範囲内と考えられる変化 (統計学的検定により対照群との差が有意と判定されたものの、用いた動物の背景データの範囲内に収まる程度の僅かな変動) が観察されたに過ぎなかった。一方、残る12物質については、一部の低用量群において、現在の科学水準では毒性学的意義を判断しかねるような変化がみられている。しかし、それらは生化学的検査における一部の指標や脾臓重量などにみられた被験物質の暴露用量にも他の指標にも無関係な変動 (因果関係について科学的説明が不可能であり、背景データの範囲からも逸脱する統計学的有意差) 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もできない。また、4-ノニルフェノールや4-t-オクチルフェノールなどのように弱いエストロゲン様作用を持つことが確認されている物質については、児動物の子宮や前立腺でEEを用いた検証試験で観察されたような遺伝子発現量の変化が観察された群もあり、このような現象の生物学的または毒性学的意義が明らかではないために、それらの解釈は今後の検討課題とされている。

上述の如く、これまでに終了した試験のうちのほぼ半数 (12/22) で、直ちに科学的な説明がつかないような変化が1試験当たり数項目の割合で観察された。このような変化については、これまで一過性の偶発的な変動に過ぎないと考えるのが一般的であった。統計学は確率論に過ぎず、一定の確率で結論を誤る (有意水準を5%に設定しているのであれば、1/20の確率で結論を誤る可能性が存在する) ことが明らかであるからである。しかし、環境省の議論においては敢えて根拠が明らかでない推論をせず、説明のつかない現象はありのままに報告するという姿勢で対応している。但し、少なくと

も目下のところこれらの変化に有害性があるとは考えられず、したがって、我々が最善を尽くして調べた範囲ではこれらの物質の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。

おわりに

ラットを用いた改良型1世代試験により、内分泌かく乱作用が疑われるとされる様々な化学物質の低用量影響を可能な限り精密に検討した結果、調べたいずれの化合物についても、環境濃度近傍の用量域（ヒトが実際に環境からの暴露を受けている濃度）では明らかな内分泌かく乱作用は確認できなかった。しかし、この結果によって、内分泌かく乱物質には低用量影響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、EEを用いた検証試験では、極めて低用量の暴露であっても動物の遺伝子発現量が変化していた。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、試験に用いる動物用飼料の分析から、無処置であると信じてきた対照群の動物であっても僅かながら餌（食物）を経由して様々な化学物質の暴露を受けていることが明らかとなり、弱い内分泌活性が推測される化学物質については、コンタミネーションフリーの環境を整えない限り真の低用量影響を検出し得ないことも示唆された。

逆説的ではあるが、この事実は、同時に我々には弱い内分泌活性を持つ物質の低用量影響について過度に心配する必要のないことを示唆すると思われる。なぜならば、仮にこれらの物質に低用量影響があったら既に対照群（無処置と信じている）の動物にも影響が及んでいることとなるが、それにもかかわらず、これまで低用量影響を検出したとされるいずれの実験においても対照群の動物に異常は検出されていないからである。

内分泌かく乱物質の低用量影響に関しては、今後も様々な角度から研究が進むものと思われる。しかし、これまでのように対照群の動物の汚染状況を無視した実験では核心に迫ることはできないことが明白であり、研究者の新たな発想が期待される。また、これらの研究がどのように進展しようとも、我々が直ちに危機に晒されることはないと考えて、冷静な対応を取ることが肝要であると考えられる。

謝辞

ここに紹介した内容は、環境省プロジェクトとして実施された一連の試験結果に基づくものである。これらの試験を実施した10を超える研究機関の試験担当者、試験結果の解釈に有益なご助言を賜ったりリスク評価検討会（環境省）の諸先生、および環境省の担当職員の皆様に、心から感謝する。

引用文献

1) Aoyama H, Teramoto S, Shirasu Y. Heritable pulmonary

lobation anomaly in rats. *Teratology* 1988;37:159-66.

- 2) Aoyama H, Kikuta M, Shirasaka N, Hojo H, Takahashi KL, Shimizu N, Harigae M, Taguchi F, Teramoto S. Historical control data on reproductive abilities and incidences of spontaneous fetal malformations in Wistar Hannover GALAS rats. *Cong Anom.* 2002;42:194-201.
- 3) Aoyama H, Suzuki K. Enhanced one-generation reproductive toxicity study in rats for detecting endocrine-disrupting effects of chemicals. *Pure Appl Chem.* 2003;75:2497-501.
- 4) 青山博昭, 寺本昭二. 生殖・発生毒性学から見たクローズドコロニーラット. *アニテックス* 2004;16:17-21.
- 5) Kaneda M, Teramoto S, Shirasu Y. Anatomical features associated with preaxial duplication (pd): a recessive mutation in the rat. *Teratology*, 1989;40:77-84.
- 6) 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 I. *Environ Health Perspect* 2001;109:785-94.
- 7) 環境庁. 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－. 2000年11月版. 東京：環境庁；2000.
- 8) 環境省. 哺乳類を用いた人健康への内分泌攪乱作用に関する試験結果まとめ表. 2004. <http://www.env.go.jp/chemi/end/speed98/speed98-19.pdf>
- 9) Nagel SC, vom Saal FS, Thayer KA, Dhar MG, Boechler M, Welshons WV. Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environ Health Perspect* 1997; 105:70-76.
- 10) Nakatsuka T, Horimoto M, Ito M, Matsubara Y, Akaike M, Ariyuki F. Japan pharmaceutical manufactures association (JPMA) survey on background control data of developmental and reproductive toxicity studies in rats, rabbits and mice. *Cong Anom* 1997; 37:47-138.
- 11) NTP (National Toxicology Program). National Toxicology Program Report of the Endocrine Disruptors Low Dose Peer Review. 2001.
- 12) Vom Saal FS, Timms BG, Montano MM, Palanza P, Thayer KA, Nagel SC, Dhar MD, Ganjam VK, Parmigiani S, Welshons WV. 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* 1997; 94:2056-61.