農薬の内分泌攪乱作用検出のためのアプローチ

青 山 博 昭*

(財)残留農薬研究所 毒性第一部 生殖毒性研究室

(平成 13 年 6 月 20 日受理)

An Approach for Predicting Endocrine Disrupting Activities of Pesticides

Hiroaki AOYAMA

Laboratory of Reproductive Toxicology, Toxicology Division I, Institute of Environmental Toxicology, Ibaraki 303-0043, Japan

Key words: エストロゲン様作用 (estrogenic effects), 抗アンドロゲン様作用 (anti-androgenic effects), 内分泌活性物質 (endocrine active compounds), スクリーニング試験 (screening assay), 確定試験 (definitive study), 2 世代繁殖試験 (two-generation reproductive toxicity study).

はじめに

我々は、農薬の生殖・発生毒性検出を主たる業務としている関係上、農薬の内分泌活性や内分泌攪乱作用に基づくと考えられる生殖毒性との関わりも比較的長い。本稿では、我々の研究室における農薬のヒトに対する内分泌攪乱作用検出（あるいは予測）のための戦略を簡単に説明する。本稿では内分泌攪乱作用の検討を含む安全性評価の実際を解説することに主眼を置くため、内分泌攪乱物質 (Endocrine Disruptors, EDs または Endocrine Disrupting Chemicals, EDCs) の定義や作用機序の解説については、我々の戦略を説明するための最小限の記載に止める。それらの詳細については、OECD や米国 EPA の関連文書あるいはそれらの解説を参照されたい¹⁻⁵⁾。また、この分野における最新の科学的知見を紹介することもまた本稿の目的ではないため、これらに関する論文についても多くを引用しない。読者の興味に従って、それぞれの分野の専門誌に掲載された個々の論文を参照されたい。

1. 内分泌攪乱物質と内分泌活性物質

内分泌攪乱物質の定義はいくつも存在するが、信頼できる機関が提唱する定義は、細かな表現の違いを除けば概ね

共通している。それらによれば、内分泌攪乱物質とは「内分泌系の形態あるいは機能を変化させ、結果として動物に悪影響を及ぼす化学物質もしくはそれらの混合物」を指す。また、これらの悪影響は「特別な処置を施さない (intact な) 個体を用いた実験・観察により、個体またはそれ以上 (集団、亜集団) のレベルで確認されなければならない」とする点についても、今や世界的に共通した認識となっている。

一般に、ある化学物質が内分泌活性を持つか否かの判定は、それ程困難ではない。例えば、ホルモン受容体と化学物質との親和性を受容体結合試験 (Receptor Binding Assay) で直接測定したり、化学物質をある種のホルモンの感受性を示す細胞に暴露して反応 (例えば増殖活性) を調べたりすることにより、化学物質が天然ホルモンと類似した作用を持つか否かを容易に判断することができる。しかし、上述の例の如く *in vitro* である種の化学物質に天然ホルモンと類似した作用が検出されたとしても、その活性は極めて低い場合もあり、そのような化合物については *in vivo* 実験で同様の作用を確認することはしばしば困難である。さらに、仮に卵巣あるいは精巣などの内分泌器官を摘出してホルモン産生能を奪った動物を用いた実験では陽性反応が得られたとしても、このような処置を施さない (intact な) 動物を用いた実験で悪影響を検出することは容易ではない。

最近では、内分泌系に対する何らかの作用は認められる

* 〒 303-0043 水海道市内守谷町 4321

ものの、それらの作用に基づく悪影響が引き起こされるか否かの確認はなされていないような化学物質に対して、内分泌活性物質 (Endocrine Active Compounds, EACs) という用語を当てはめる事例がしばしば見受けられる。本稿においても、無処置の個体に何らかの悪影響 (生殖毒性や発癌性など) が引き起こされることが確認された化学物質については「内分泌攪乱物質」、*in vitro* 試験を含む何らかの実験で内分泌系に対する何らかの関与が認められるものの、それが悪影響であると断定できない場合は「内分泌活性物質」と記載する。

2. 内分泌攪乱物質検出のための一般的なアプローチ

今までに人類が作り上げてきた人工的化学物質の数は、10万種類を越えると言われている。したがって、もしもこれらの化学物質すべてについて内分泌攪乱性の有無を調べるとすると、膨大な時間と労力が必要となる。例えば、現在のところ内分泌攪乱作用による生殖毒性をもっとも確実に検出できると期待されているラットを用いた2世代繁殖試験は、どんなに急いでもその実施に約1年を要する。仮にこの手法で化学物質の生殖毒性を評価することができる世界中の研究室が協力して年間100試験を実施するとしても、すべての化合物を調べ終わるまでに1000年という単位の時間がかかる。無論、その間にも新たな化学物質が合成され続けるであろうから、当面のところ残念ながらこのような戦略は成り立たない。そこで、既存のデータを利用して何らかの方法で検査対象とすべき化学物質を選別し、優先順位の高い化合物から順に試験を実施する必要がある。

現在提唱されている一般的な戦略を、図1に示す。まず、それぞれの物質ごとに生産量や毒性に関するデータを整理し、優先的に検査対象とすべき物質を選抜する (Priority

setting)。この過程では、生産量の多い物質、既存のデータや構造活性相関 (QSAR) による解析結果から、毒性 (内分泌攪乱性) の懸念される物質に高い優先順位が付けられる。この段階で除外された物質については、現在の科学水準では直ちに確定試験を実施する必要はないと判断されたのであって、内分泌攪乱性がないと結論されたわけではない。したがって、科学の進歩により将来新たな疑いが生じた場合は、その時点で次のステップ (スクリーニングあるいは確定試験) に進むこととなる。

スクリーニングを実施すべきと判断された物質については、表1に示すような方法にしたがって、調べるべき作用の有無について順次検討する。表1に掲げた試験法のうち、いくつかの方法については既に国際的な検証試験が進んで

図1 化学物質の内分泌攪乱性を調べるための戦略
すべての化学物質について直ちに確定試験を実施することは事実上不可能なので、優先順位付け、スクリーニングにより化合物を順次ふるいにかけ、確定試験を実施すべき化合物を絞り込む。内分泌攪乱性の有無については、確定試験の結果に基づいて最終判断を下す。

表1 主なスクリーニング法

検査対象	<i>In vitro</i> 試験	<i>In vivo</i> 試験
エストロゲン作動系	ER receptor binding assay Reporter gene assay E-screen	Uterotrophic assay
アンドロゲン作動系	AR receptor binding assay Reporter gene assay	Hershberger assay
甲状腺ホルモン作動系	Reporter gene assay	Frog metamorphosis assay Enhanced TG 407
ステロイド代謝・合成系	Steroidogenesis assay with minced testis Placental aromatase assay	Enhanced TG 407

スクリーニングとしてどのような方法を組み合わせるかについては、様々な考え方があ。例えば、性ホルモン (エストロゲンおよびアンドロゲン) 受容体に対する親和性の有無に着目して最小限の労力で化学物質を振り分けたいのであれば、エストロゲンおよびアンドロゲン受容体を用いた受容体結合試験のみから大きく分類することも可能である。ただし、見落としの危険性も同時に高くなる。

表2 動物の生殖に及ぼす影響を評価する主な確定試験法

調べる影響	試験法	試験に使用する動物種
ヒトに対する影響	2世代繁殖試験 発生毒性（催奇形性）試験	ラット ラット/ウサギ/マウス
野生生物に対する影響	1世代繁殖試験 鳥類繁殖試験（1世代/2世代） 魚類の Life cycle test 両生類の生殖・発生毒性試験 甲殻類の Life cycle test	ラット/マウス（？） 日本ウズラ/Bobwhite quail メダカ/Fathead minnow/Zebra fish アフリカツメガエル America mysis（アミ）

おり⁶⁾、今後は検証試験による有効性の確認を経て、世界的に広く利用されるようになって考えられる。これらの試験法の詳細については、文献を参照されたい^{1,2,7)}。

現在のところ、化学物質のエストロゲン様または抗アンドロゲン様作用が注目を集めていることから、エストロゲンまたはアンドロゲン受容体との親和性の有無を *in vitro* で調べた実験結果の報告が数多くみられる。しかし、前述した如く *in vitro* で検出された受容体との弱い親和性が *in vivo* では検出されない場合もしばしばあるため、*in vitro* 試験の結果だけに基づく優先順位付けを実施すると、確定試験を実施すべき化合物の絞り込みが不十分となる可能性が高い。このような事態を回避するためには、*in vivo* 試験として Uterotrophic assay（子宮肥大試験）や Hershberger assay（雄の副生殖器肥大試験）を同時に実施することにより、化学物質の作用強度をより正確に予測することが肝要であろう。

一方、エストロゲンまたはアンドロゲン受容体との親和性が陰性であるにもかかわらず、生体におけるステロイドホルモンの合成や代謝に拘わる酵素の活性を修飾することにより、二次的にこれらのホルモン作動系に影響を及ぼす化合物も存在することが知られている。また、甲状腺ホルモン作動系に影響を及ぼす化合物についても、生後の知能あるいは行動発達との関連から、このような作用の毒性学的意義を明らかにする必要性が指摘されている。したがって、確定試験を実施すべき化学物質を選抜するためのスクリーニングを実施する際には、表に挙げた試験法を組み合わせることで実施することにより、これらの作用を持つ化合物を漏れなく検出するよう努力することが望まれる。

表に掲げた一連のスクリーニング試験の結果がすべて陰性であった場合は、その化合物を保留扱いとして、確定試験の対象からひとまず除外する。しかし、現在提唱されているスクリーニング試験ではあらゆる内分泌活性が検出できるわけではないことから、この段階で除外された物質が内分泌攪乱性を有しないと結論されるわけではない。この段階で陰性結果の得られた化合物は、あくまで現時点ではこれ以上の試験の実施を保留しても良いと判断されたに過ぎないことを忘れてはならない。

スクリーニング試験で陽性結果が得られた化合物については、*in vivo* 確定試験を実施して、内分泌攪乱性の有無を最終的に評価することとなる。有効性が期待されている試験法を、表2に示す。表に示した方法は、いずれも化学物質の内分泌攪乱性を検出するために設計されたものではない。しかし、これらの試験法は、作用機序の如何を問わず生殖毒性を鋭敏に検出することができるように設計されたものであることから、適切な検査項目を適宜追加することにより、化学物質の内分泌攪乱作用に基づく生殖毒性を検出することができるものと考えられている。これらの試験と共に発癌性試験や発達神経毒性試験などを組み合わせて実施し、さらには暴露評価を加えることにより、現在の科学的知見に基づいたリスク評価がなされる。

内分泌攪乱物質の極低用量影響については、現在のところその存在の有無すら科学的に定まらない（この問題に関する最新の知見は、文献⁸⁾を参照されたい）。したがって、これらの問題が未解決のまま実施される現在のリスク評価は、残念ながら必ずしも完全であるとは言い切れない。しかし、内分泌攪乱物質の作用について未知の部分が残されているとはいえ、それらの高用量影響については現在の方法でも検出（予測）することが可能である。また、リスク評価は本来科学の進歩に伴って繰り返し実施されるべきものであると考えられることから、現時点で最新の科学的知見に基づいたリスク評価を早急に実施することが我々の務めであると考えられる。

3. 農薬の内分泌攪乱作用検出法

我が国では、少なくとも食用農薬については登録に際して催奇形性試験（発生毒性試験）や2世代繁殖試験の実施が義務づけられており、発癌性についても十分な検討が要求されている。したがって、最新のガイドラインに沿ってこれらの試験が実施してあれば、内分泌攪乱性の有無についても最善の方法（現在もっとも有効な確定試験と考えられている方法）で検査が実施されていると考えられる。しかし、仮にこれらの試験で何らかの生殖毒性や発癌性が検出されたとしても、それだけではその作用機序を明らかにすることが困難な場合が多い。そこで、そのような農薬に

については、一般化学物質の内分泌攪乱作用を調べる際に優先順位付けのために実施する各種のスクリーニング試験を繁殖毒性や発癌性の機序を調べるためのメカニズム解析試験として用いて、観察された毒性が内分泌攪乱性に基づくものか否かを検討することとなる。

我々の研究室における基本的戦略を、図2に示す。何らかの生殖・発生毒性が検出された場合や、あるいはそれらを疑うような変化がみられた場合、それらが被験物質とエストロゲンまたはアンドロゲン受容体との相互作用を介し

図2 農薬の内分泌攪乱性を確認する戦略

催奇形性試験や2世代繁殖試験で何らかの生殖・発生毒性がみられた場合に、それらの毒性が内分泌攪乱作用に基づくものか否かを検討する。

て引き起こされたものであるか否かを、まず *in vitro* の Receptor binding assay または Reporter gene assay で調べる。Reporter gene assay は、ホルモンと農薬を同時に暴露することにより拮抗作用の有無を調べることができる長所がある。しかし、酵母に受容体と応答遺伝子(reporter gene)の両者を導入した系などでは、化学物質の膜透過性が動物細胞とは異なる場合があることや、そもそも人工的に組み込んだ応答系では真の作用はみられないとの批判もあって、それらの試験系を用いた解析には注意を要する。我々は、受容体を発現するヒト由来細胞に応答遺伝子を導入した系⁹⁾を用いて解析を実施している。

これらの *in vitro* の試験系でアンドロゲン受容体との相互作用が認められた場合は Hershberger assay を、エストロゲン受容体との相互作用が認められた場合には Uterotrophic assay を実施して、*in vivo* における作用の有無を確認する。一方、被験物質とこれらの受容体との間に相互作用が認められない場合は、種々のホルモンの血中濃度の変化を検出するために指標を追加した補強28日間試験(Enhanced TG407)を実施して、被験物質のステロイドあるいは下垂体ホルモン合成系に対する影響の有無を評価する。妊娠期間中の母動物では薬物代謝酵素(P450)の活性や血中の性ホルモン濃度が非妊娠期とは著しく異なるため、場合によっては妊娠動物を用いて内分泌系の変化を検討する実験も追加する。細胞増殖試験(E-screen)は、エストロゲン様(あるいは抗エストロゲン様)作用の確認に用いる。

表3 メトキシクロールのラットにおける繁殖試験：親動物に対する影響

検査項目	P世代親動物			F1世代親動物		
	投与用量 (ppm)			投与用量 (ppm)		
	10	500	1500	10	500	1500
親動物に対する一般毒性						
臨床所見	影響なし	影響なし	脱毛↑	影響なし	影響なし	脱毛↑
体重	影響なし	↓	↓↓	影響なし	↓	↓↓
体重増加量	影響なし	↓	↓↓	影響なし	↓	↓↓
摂餌量	影響なし	↓	↓↓	影響なし	↓	↓↓
臓器重量：雄の副生殖器官	影響なし	影響なし	↓	影響なし	影響なし	↓
臓器重量：雌の子宮	影響なし	影響なし	↑	影響なし	影響なし	影響なし
剖検所見	影響なし	影響なし	影響なし	影響なし	影響なし	影響なし
親動物に対する繁殖毒性						
従来からの検査項目						
交尾率	影響なし	影響なし	影響なし	影響なし	影響なし	影響なし
妊娠率	影響なし	影響なし	影響なし	影響なし	影響なし	↓
着床数	影響なし	↓	↓	影響なし	↓	↓
産児数	影響なし	↓	↓	影響なし	↓	↓
新たに追加した検査項目						
性成熟	—	—	—	影響なし	影響なし	やや遅延
性周期	影響なし	影響なし	↑↑	影響なし	↑	↑↑
精子数	影響なし	影響なし	↓	影響なし	影響なし	↓
精子運動性	影響なし	影響なし	影響なし	影響なし	影響なし	影響なし
血中ホルモン濃度測定	影響なし	E2 ↓	E2 ↓	—	—	—

↓：減少，↓↓：著しく減少，↑：増加または延長，↑↑：著しく増加または延長。

表4 メトキシクロールのラットにおける繁殖試験：児動物に対する影響

検査項目	F1児動物			F2児動物		
	投与用量 (ppm)			投与用量 (ppm)		
	10	500	1500	10	500	1500
従来からの検査項目						
臨床所見	影響なし	影響なし	影響なし	影響なし	影響なし	影響なし
生存率	影響なし	影響なし	影響なし	影響なし	影響なし	影響なし
体重	影響なし	↓	↓↓	影響なし	↓	↓↓
新たに追加した検査項目						
臓器重量 (胸腺重量)	影響なし	影響なし	↓	影響なし	↓↓	↓↓
臓器重量 (子宮重量)	影響なし	↑↑	↑↑	影響なし	↑↑	↑↑

↓：減少，↓↓：著しく減少，↑：増加，↑↑：著しく増加。

いずれの世代においても、親動物の体重、体重増加量および摂餌量が、500 ppm 以上の投与群で有意に減少した。これらの影響の程度には、明確な用量反応関係が認められた。児動物に対する毒性は、親動物の一般毒性が明らかな用量でのみ観察された。従来からの検査と新たに追加した検査の間で、被検物質の繁殖障害作用の検出感度に差はみられなかった。

図3 E-screen の結果

メトキシクロール (MXC) には 10^{-6} M 以上の濃度で MCF-7 細胞の増殖活性を増加させる作用があり、この作用は代謝産物である HPTE でより強く認められる。

図4 Uterotrophic assay の結果

100 mg/kg 以上の用量のメトキシクロールを卵巣摘出したラットに経口投与すると、これらの動物の子宮重量を増加させる作用がある。

これら一連の試験を追加することにより、ヒトに対する農薬の内分泌かく乱作用に基づく生殖・発生毒性は、概ね検出できるものと予測している。以下に、これらの戦略の有効性を確認するために実施したメトキシクロールを用いた一連の実験結果と、同様の方法で p,p'-DDT の内分泌攔乱作用を検討した結果を簡単に述べる。

メトキシクロールについては、まずラットを用いて最新の方法による 2 世代繁殖試験を実施したところ、表 3 および 4 に示すような種々の生殖毒性が検出された。すなわち、500 ppm 以上の投与群では、親動物の体重、体重増加量および摂餌量と児動物の体重が、用量反応関係を伴って有意に減少した。また、これらの投与群では着床数や産児数が同様に有意に低下し、1500 ppm 投与群の F1 世代では妊娠率の有意な低下も認められた。これらの結果から、メトキシクロールが繁殖毒性を有することが明らかである。さらに、雌親動物の性周期に延長がみられたこと、エストロゲンの血中濃度が低下したこと、雄親動物の精子数が減少したこと、および雌離乳児の子宮重量が増加したことなどから、

メトキシクロールもしくはその代謝産物にはエストロゲン様作用があることが示唆される。そこで、メトキシクロールとその主たる代謝産物である 2,2-bis(p-hydroxyphenyl)-1,1,1-trichloroethane (HPTE) について、エストロゲン受容体との親和性を Receptor binding assay で確認するとともに、エストロゲンに感受性を持つ MCF-7 細胞株を用いて細胞増殖試験 (E-screen) を実施した。また、メトキシクロールのエストロゲン様作用を *in vivo* で確認するため、卵巣を摘出したラットを用いて Uterotrophic assay を実施した。

Receptor binding assay では、メトキシクロールには 10^{-5} M で、その代謝産物である HPTE には 10^{-6} M 以上で、それぞれエストロゲン受容体との親和性が観察された。また、E-screen では、これらの化合物に細胞増殖活性が認められた (図 3)。Uterotrophic assay では、メトキシクロールを経口投与した場合に明瞭な子宮増殖作用が観察された (図 4)。これらの実験結果はいずれもメトキシクロールとその代謝産物である HPTE にエストロゲン様作用があることを意味するものであることから、2 世代試験でみられた生

表5 p,p'-DDTを用いた一連の試験結果

試験の種類	結果
<i>In vitro</i> 試験	
ER binding assay	受容体との親和性：＋
E-screen	細胞増殖活性：＋＋
<i>In vivo</i> 試験	
Uterotrophic assay	エストロゲン様作用/抗エストロゲン様作用：－
Hershberger assay	アンドロゲン様作用/抗アンドロゲン様作用：－
Enhanced TG 407	ホルモンバランスの変化, 肝重量増加
催奇形性試験	催奇形性：－
2世代繁殖試験	ホルモンバランスの変化, 肝重量増加
	繁殖毒性：－

殖毒性がメトキシクロールまたは HPTE のエストロゲン様作用に基づくものであることが示唆される。したがって、メトキシクロールには内分泌攪乱作用があるものと判断される。

一方、p,p'-DDT については、*in vitro* でエストロゲン様作用が報告されており¹⁰⁾、さらに代謝産物である p,p'-DDE には抗アンドロゲン様作用が指摘されている¹¹⁾。我々の実験でも、*in vitro* ではエストロゲン様作用のあることが確認された(表5)。しかし、一連の *in vivo* 試験では性ホルモンの不均衡(エストロゲン濃度の低下とプロゲステロン濃度の上昇)がみられたものの、催奇形性および繁殖毒性についてはいずれも陰性の結果を得た。これらの結果から、p,p'-DDT には *in vitro* でエストロゲン様作用があり、*in vivo* では動物のホルモン合成・代謝系に影響を及ぼす内分泌活性物質であるが明らかとなった。しかし、これらの作用に基づく明らかな毒性は調べた範囲では認められなかったことから、現時点では内分泌攪乱性は確認されるに至っていない。

おわりに

以上に述べた如く、農薬のヒトに対する影響については、最新のガイドラインに示された方法に沿って幾つかの指標を追加した2世代繁殖試験や催奇形性試験を実施し、何らかの生殖・発生毒性が観察された場合には一連の方法でその機序を調べることにより、少なくともエストロゲン様作用に基づく内分泌攪乱作用の有無は予測できると考えられる。また、抗アンドロゲン様作用に基づく内分泌攪乱作用についても、その検出にこれらの試験が有効であることが示されている^{11,12)}。したがって、発癌性を含めた一連の試験が要求されている農薬については、それらが最新の方法にしたがって適切に実施され、かつ陰性の結果が得られている限り、内分泌攪乱性について重大な見落としは生じないと考えられる。一方、一連の試験で内分泌系に対する作用が疑われた場合や、試験は実施されているもののその手法

が古いために必ずしもすべての生殖・発生毒性が精査されていない場合は、ここで述べたようなメカニズム解析を実施するなどして、さらなる安全性の担保が必要となろう。

野生生物に対する影響に関しては、現在のところ、残念ながらヒトに対する影響評価と比較すると極めて手薄であると言わざるを得ない。これらの点に関しては、今後の課題として取り組んでいかねばならないであろう。

引用文献

- 1) Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee: Final report, Vol. I, 1998
- 2) Environment Directorate, Organization for Economic Co-operation and Development: Detailed review paper, "Appraisal of test methods for sex hormone disrupting chemicals," 2001
- 3) 宮本純之監訳：エンドクリン白書，化学工業日報社，1999
- 4) 内分泌かく乱化学物質問題の現状と今後の取り組み，厚生省生活衛生局食品化学課監修，厚健出版株式会社，1998
- 5) 青山博昭：農薬学事典，朝倉書店，pp. 387-400，2001
- 6) J. Kanno, L. Onyon, J. Haseman, P. Fenner-Crisp, J. Ashby & W. Owens: *Environ. Health Perspect.*, in press
- 7) 内分泌攪乱化学物質の生物試験研究法，井上達監修，シュプリンガー・フェアラーク東京，2000
- 8) National Toxicology Program report of the endocrine disruptors low dose peer review, 2001
- 9) H. Tamura, S. C. Maness, K. Reischmann, D. C. Dorman, L. E. Gray, Jr. & K. W. Gaido: *Toxicol. Sci.* **60**, 56 (2001)
- 10) P. V. M. Shekhar, J. Werdell & V. S. Basrur: *J. Natl. Cancer Inst.* **89**, 1774 (1997)
- 11) W. R. Kelce, C. R. Stone, S. C. Laws, L. E. Gray, Jr., J. A. Kmppainen & E. M. Wilson: *Nature* **375**, 581 (1995)
- 12) L. E. Gray, Jr., J. S. Ostby & W. R. Kelce: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **129**, 46 (1994)