

エストロゲンを超えて - 内分泌攪乱をもたらす複数の機序

ルイス J. ジレット Jr.

米国 フロリダ大学

ありがとうございます。そして、おはようございます。この会議を主催された環境省と、私を講演に招聘してくださった井口先生にお礼申し上げます。

本日は、内分泌攪乱現象の研究、野生生物個体数の研究、私がこれまでに実際に発表してきたものとはかなり異なった異常に関わる可能性のある作用についての研究など、新しい研究のいくつかをお話ししようと思います。全部お話できればいいと思います。

皆さんご存じのように、我々の研究室と共同研究者は過去 10 年間に、フロリダ州の汚染湖のアリゲーター個体群と魚個体群に、さまざまな生殖異常や内分泌異常があることを報告してきました。これらの異常は特に、農業活動や大量の農薬使用によって汚染された湖で見られます。

そうした異常としては、孵化率の変化や幼若個体の死亡率の変化などさまざまな影響が含まれます。雄では、テストステロンが減少してエストラジオールに変化し、ファルス(陰茎)が小さくなっていることが分かりました。雌では、幼若時にはエストラジオールが亢進しますが、成熟するにつれ、エストラジオールは実際に抑制されること、また、卵巣において異常卵胞があることが分かりました。

我々は複数の湖を調査しました。我々がアポプカ湖をウッドラフ湖と比較した研究のことをご存じの方も多いいと思います。また、過去 2 年間には、複数の湖に関するいくつかの調査結果を公表しました。本日は、過去 4 年間に我々がオキチョビー湖とフロリダ南部のエヴァグレイズ湿原で行った研究のデータの一部をお見せしたいと思います。

我々がアポプカ湖を調査したのは、この湖が高度に汚染されており、農薬の流出を受けていたからです。しかし、アメリカワニ(アリゲーター)でテストステロンの減少やファルスの縮小といった我々が観察した影響は、農薬の流出があったアポプカ湖のみに見られるわけではないことを忘れてはいけません。農業活動が盛んなグリフィン湖とオキチョビー湖域でも同様の影響が観察されます。

我々がこれらの動物の調査を継続しており、現在は分子レベルの解析に取りかかろうとしているところです。まずはそのあたりのデータを少しお見せします。ここでも井口泰泉先生にお礼を申し上げます。岡崎の国立基礎生物学研究所と私どもフロリダ大学は共同研究を続けています。これからお見せする研究は、実際には私のところの学生の一人が行ったものです。その学生、ディー・バーミューデスはこの 2 ヶ月間にわたって井口先生とともに研究をしています。ご覧のように「ワニ隊」が作業をしています。

我々が実際に調べていることのの一つは、ステロイドファクター-1 (SF1) とアロマトラーゼの発現です。実作業としては、野外から動物を集めます。その動物にはステロイドの変調が見られました。我々は現在、複数の湖由来の動物における相対発現量を調べていますが、我々が基準湖にしているウッドラフ湖の雄と雌を比較すると、雌は雄よりも SF1 のレベルが高いことが分ります。

哺乳類ではその反対であるとされていますので、哺乳類を対象にしている皆さんにとっては意外かもしれません。しかしこれはワニ、鳥類、アリゲーターにおいては正常なパターンであり、実際に以前に発表されています。これについては、ウェスタンらが 2000 年の「Gene」誌に報告しています。

汚染湖であるオレンジ湖とアポプカ湖での我々の調査では、性的二型性も、さらには逆転した性的二型性も見られませんでした。このことは、SF1 がアロマトラーゼ遺伝子の発現を誘導する働きがあることを示していると、大方考えられています。アロマトラーゼはアリゲーターでクローン化されています。この研究は、ブルース・ブルンバークが行ったもので、我々はその配列情報を利用して、プライマーを作ることができるようになりました。

SF1 活性が正常である基準湖ならば、アロマトラーゼ発現が雌の方で劇的に強く、雄の精巣内では低レベルであることが観察できます。基準湖以外のこれらの湖では、ある程度の性二型性は残ってはいますが、性二型性は抑制されています。

この研究をフロリダ州中央部以外の湖にも拡大しようと、我々はフロリダ州南部のエヴァグレーズで調査を行いました。現在その多くの地点で調査を行っています。我々はオキチョビー湖を調べました。オキチョビー湖はフロリダ州で最大の湖であり、エヴァグレーズ全体の水源になっています。これらの水の大部分は草原を抜けて、最後にはフロリダ湾に注ぎます。

オキチョビー湖には、興味深い場所がたくさんあります。西側のある地点は、基準湖にそっくりで、影響の程度は比較的小さく、土壌中の栄養分や農薬の量は少ないです。それに対して、キシミー川が流入する第2地点と、第3地点のベル・グレードでは、農業活動による汚染が高度になっています。エヴァグレーズ地域はサトウキビ畑が復旧されており、複数の金属や農薬などが複雑に混合した成分を持っています。

これらの地点において、魚とアリゲーターの両方を数多く調べました。本日は、アリゲーターの研究についてお話しします。

ここでよく見られる影響は、フロリダ州中央部で見られた影響によく似ているということが言えます。汚染地域の雄でテストステロンとファルスの大さきの減少が見られました。肝臓のテストステロン代謝に変調が見られましたが、これは EROD、PROD、MROD の誘導とは相関がありません。つまりこれは P450 の総体的な誘導ではなく、アンドロゲン代謝の変調にきわめて特異的なものである、ということです。このことは "Environmental Health Perspectives" 誌の今月号に発表しました。

また、血漿甲状腺ホルモン濃度にも変化が見られました。雌のエストラジオールは低下し、ビテロゲニンの誘導はありませんでした。始めのほうで私が挙げた疑問に戻りましょう。これらの個体が大量の化学物質混合物に曝露したためにビテロゲニンが見られなくなったのは、エストロゲン類だけでなくアンドロゲン類やおそらくプロゲスチン様の物質もあったためであると我々は考えています。

こうした問題の背後にある原因物質は何でしょうか？我々は何年もかけて有機塩素系化合物を調べました。重金属も調べました。しかし本日は、それ以外の2種類の物質について調べたことを述べ、この問題に関する非常に新しいデータをお見せしようと思います。

その第1の問題は、これまで文献に記載があったものです。特に日本、米国、ヨーロッパなどでヒトの健康について何年にもわたって記載されてきた問題、すなわちフタル酸類です。しかし、フタル酸類に関する議論は尽くされたように見えますが、実際には、野生動物の曝露に関するデータは無いに等しいのです。

ヒトに主に曝露する曝露源は可塑剤ですが、フタル酸類は農薬や殺虫剤などの成分の中に、化学安定剤としても使用されています。すでに分っていることの一つは、土壌粒子に対してフタル酸類は強い親和性を持っているということです。また、生態系の中でのこれら物質の化学に関する生態学研究からは、湖沼・河川の生態系、特にこれらの湖に泥や黒泥があるような場合には、フタル酸類の分解が非常に遅くなることも分っています。

また、非常に高濃度の曝露によって生殖への影響があることも知られています。では、我々が見ていたのはどういう種類の曝露なのでしょう？我々は幼若アリゲーターの調査に立ち戻りました。

我々は、5箇所の地点でそれぞれ50頭の動物を捕獲しました。そして尿を捕獲5分間以内に採取しました。尿を調べるのは、代謝産物を調べるためです。また、プラスチック製のシリンジやカテーテルなどからの混入を避ける方法の一つでもあります。この作業は、CDCのジョン・ブロックがEHPに昨年発表したものとほとんど同じですので、彼に協力してもらって作業を進めました。

我々が最初に調べたものは、フタル酸モノ(2-エチルヘキシル)です。この物質は、すでに文献に記載されています。我々が最初に面食らったのは、フロリダ州南部の個体群を調べると、動物の尿中に45 ppmあったことです。思い出してください。こちらは代謝産物ですが、こちらは違います。実際には混入によるもので、動物の肝臓を調べたときに使った製品です。野生動物におけるこれら化合物の代謝については、ほとんど何も分っていません。

フロリダ州南部では顕著な亢進があります。その反対に、アポプカ湖を含むフロリダ州中央部では、比較的低いレベルです。ほんの数 ppm といった程度です。このことを詳しく調べ、フロリダ州南部の地点を実際に調べると、非常に大きなばらつきがありました。一部の個体は非常に高濃度に曝露しています。我々が調べた個体の中には、フタル酸モノ(2-エチルヘキシル)が100 ppm以上あったものもありました。しかし、こちらでは非常に少ない ppm しか見られません。

我々はその他の代謝産物についても調べました。この場合も、フロリダ州南部のほうがフロリダ州中央部よりも高い濃度でした。しかし、これら 2 種類の化学物質の桁の変化に注目してください。数桁の大きさで低下しています。フタル酸類のこうした代謝産物のうち、フロリダ州中央部の個体群のほうが南部よりも濃度が高かったものが、少数ありました。

これらの化学物質の作用とは何でしょうか？それについて私は答えることができません。しかし、実際に我々はたいへんに驚いたのですが、濃度の上昇が見られました。この研究のサンプル数は各地点で 25 個体以上というまったく合理的なものですし、すべて再実行、再評価を行っています。それに既に言いましたように、この研究は CDC で行われたものであり、化学は得意です。ではこれは一体何なのでしょう？

我々が調査したフロリダ州南部の個体において、フタル酸類に対する生物学的反応が有ったのか無かったのを解明するための努力を現在続けています。しかし、本日はもう少し違った事柄についてもお話しします。それは、おそらくこの会議を始めとする内分泌攪乱現象関連の場では、これまで話されたことがないと思いますが、窒素汚染が内分泌攪乱現象かかわっている可能性についてです。

それは、肥料、化石燃料、動物性製品に含まれる窒素汚染です。事実、ちょうど先月の "Science" 誌によると、「もう一つの全地球的汚染物質」なのです。

このことは、肥料をやると作物が良く育つという風に考えるのではなく、窒素による環境汚染はまったく別の懸念事項になりうるのではないかということ、私は言っておきたいのです。今や人間は、これまで自然の大地が産生した量の約 1.5 倍の有機窒素を作り出しています。

その大部分は肥料によるもので、多くの肥料が硝酸塩および亜硝酸塩イオン汚染を生み出す素になっています。水圏のほとんどは、植物マスの主な生産力である藻の大発生を警戒して監視されています。藻の大発生に関しては、酸欠すなわち低酸素状態が心配されています。

米国の飲用水の許容基準は、10 ppm です。この基準を超える農業用井戸は多数あり、多くの開発途上国において淡水系や井戸水や帯水層が実際にこの基準を上回っていることが、世界全体を通じての大きな懸念になりつつあります。

我々が調べた湖のほとんどは、汚染物質の濃度が‰(1000 分の 1)の単位です。これはかなりの富栄養です。我々が行った研究の一つが後ろ向き調査です。これはすべて後向きであることを理解してください。

我々にできたのは、自分たちのデータに立ち戻り、いろいろな湖における血漿テストステロン濃度を調べることでした。フロリダ州の 7 つの湖です。それで 1995 年春に採取した動物を比較することが可能になりました。また、水質管理地域の窒素および硝酸塩のデータを入手することができました。

多項式回帰を行ってみると、面白いのですが、ここで一桁繰り上がって大きくなります。この一桁繰り上がりはウッドラフ湖で見られました。この湖は実は、我々が調べた中で唯一、富栄養湖でなかったところでした。

直線回帰を行ってみると、幼若個体の総窒素量と血漿テストステロン量との間にやはり有意な関係が見られます。これはあまり強くありませんが、それでも変動のおよそ半分を説明できます。しかし、これら 2 つの変数には、湖の平均値と個体群平均値の両方を用いているので、変動の多くの部分が取り除かれていることに留意してください。

ウッドラフ湖を除外して、富栄養化した湖だけを見てみると面白いです。それら富栄養化した湖の個体の血漿テストステロンと、総窒素量との間に、強い連関があることがはっきりと分るようになります。

調査をさらに詳しく行う必要があります。実際我々は実験的な調査をいくつか行って、追跡調査を続けています。最初に行ったもののひとつは硝酸塩の調査です。幼若アリゲーターの精巣を、我々が用いている標準的な *in vitro* 培養条件である 32°C で 5 時間培養し、ステロイド産生の様子を調べました。培養には硝酸ナトリウムを 10 ppm 加えました。ナトリウムが使われましたが、これは問題ありませんでした。10 ppm を選んだのは、これが飲料水における米国の許容基準だからです。

窒素の存在が比較的短い時間であっても、テストステロン産生量が劇的に減少することが分りました。これは今回が初めてのデータではありません。パネサーが 1999 年と 2000 年に発表した 2 本の同様の報告があります。それによると、ラットの精巣といいますが精巣細胞を *in vitro* で曝露させたり、*in vivo* で飲水実験を行うと、テストステロン合成量や、ラット循環血液中のテストステロン濃度が劇的に減少するという同様の影響が見られました。

我々は、*in vivo*での硝酸塩曝露実験も行いました。これはウッドラフ湖の1年齢の個体、すなわち卵から孵って1年経ったものですが、彼らは捕獲後に孵化したので、湖を一度も見たことがありません。この動物たちを10、100、1000 ppmに曝露させました。これらは高濃度であるように聞こえますが、我々が調査した一部の湖で実際にあった濃度です。この実験は毎日水を交換する静止水を用いています。曝露は1ヶ月間行いました。1処理あたり8個体を用いました。

現在、データを完全には取り終えていませんので、分子関連のデータをここではお見せします。SF1について調べると、雌においてSF1が用量依存的に増加しています。これは卵巣内のSF1です。また、アロマトーゼの発現量も同様に用量依存的に変化していました。雄について調べると、中間的用量の100 ppmによって、かなりの量のSF1とアロマトーゼの誘導が見られます。

これがそのモデルです。我々はこの問題についてまだ十分に検討しておりませんが、興味深いことに、医学論文の中でこの5年の間に数を増やしつつある一連の論文があります。それは、食品中の硝酸塩と亜硝酸塩が、消化管内や血液中において、一酸化窒素合成酵素非依存性の経路で一酸化窒素に変換され得るというものです。

一酸化窒素についてよく知られていることの一つに、ステロイド産生を抑制するというものがあります。ステロイド産生経路全体を阻害するポイントとしては、今日までに少なくとも2箇所が知られています。一酸化窒素合成酵素の大部分はミトコンドリアと小胞体で行われます。我々は実際に一酸化窒素を生成させて、精巣と卵巣のステロイド産生を抑制できることがわかっていますし、食物からの硝酸塩摂取によっても可能です。

結論です。内分泌攪乱現象を、子世代が作られる時ではなく、幼若個体もしくは成熟個体における遺伝子発現の時点で考えるというのは、遺伝子の存在そのものではなく、環境と遺伝子との間の相互作用について、それも複雑な相互作用について考えることです。

今日までに、我々と共同研究者は、内分泌攪乱現象とは受容体結合だけではなく、数々のメカニズムを介して起こりうることを、そうした変調をもたらさしめるメカニズムと種々の産生物が増大していることを証明することができました。我々は一丸となって多数のメカニズムに焦点を合わせる作業を続ける必要があると私は思います。本日午前の講演でも、昨日の講演でも話題となっていましたように、我々は、エストロゲン類だけや、1つか2つのメカニズムだけに注目してはいけません。複眼的なアプローチが必要です。

本日私が紹介した研究は、もちろん私だけのものではありません。州の魚類・狩猟鳥獣局のアラン・ウッドワード氏にお礼申し上げます。アリゲーターの研究はどれも、彼の協力のおかげで行うことができました。ジョン・ブロック先生、井口先生、その他多くの協力者の方々がこれ以外のデータに関わってくれました。私のところにいた学生たちは、実に素晴らしいグループでした。分子データを出してくれたディー・バーミューデス氏にも感謝しています。私のところに今いる学生たちも、本当に素晴らしいです。

皆さんにお見せした素晴らしい写真を撮ってくれた、私の2人の親友であるジョン・モラン氏とハワード・スズキ氏に感謝します。研究費については、私の研究の多くに支援してくれた米国魚類野生動物庁、W・オールトン・ジョーンズ氏、米国環境保護庁に感謝申し上げます。

内分泌攪乱現象について考えるというのは、この蓮の花の姿のようなものです。これは蓮の姿の一部でしかありません。内分泌攪乱物質について考える際には、確実に新しい視点を拓いていかなければなりませんし、作業をする際には絶え間なく目を見開いておかなければなりません。ありがとうございました。

質疑応答

井口：ありがとうございました。

ダストン：プロクター・アンド・ギャンブルのジョージ・ダストンです。硝酸塩の研究はたいへん興味深かったです。我々が哺乳類における硝酸塩と亜硝酸塩の毒性について考えているのは、メトヘモグロビン血症です。あなたはこの点を調べることができたのでしょうか？あなたが引用した毒性学の文献は、メトヘモグロビン血症だけを考えるのではなく、その他のヘモの変化も考えることで、説明できるかもしれません。また、一酸化窒素ほどにはしっかりとコントロールがとられてなかったようでもあります。あなたは、これらの動物でのメトヘモグロビンを測定しましたか？

ジレット：いいえ、測定していません。今は素晴らしい質問です。米国を始めとする各国が飲料水中の硝酸塩に基準を設けている理由はメトヘモグロビン血症であり、これは特に粉ミルクに水を用いる新生児にあてはまります。我々はアリゲーターでは調べていませんが、現在、調査を試みているところです。

我々が他に行っていることの1つとして、代謝率などを見ていますが…メトヘモグロビンなどのヘモグロビン変化ははっきりと見ることはできませんが、それ以外にも、酸素輸送やその他の生物学的側面において変化が観察できるかどうかを確かめようとしています。しかしそれは重要なポイントです。

その他に簡単に触れておきたいのですが、我々はアポプカ湖の個体とウッドラフ湖の個体における硝酸塩への反応の比較調査を現在行っているところです。おそらく差があらわれるものと思われます。つまり、アポプカ湖の個体は、非常に異なった風に反応するらしいということです。何らかの適応があるのかもしれませんが、硝酸塩が豊富に存在するもとで生活した後は何か他の奇妙なことが起こっているのかもしれません。

関沢：国立医薬品食品研究所の関沢です。たいへん刺激的な講演をありがとうございました。私は、先生のフタル酸モノエチルエステルの検出にたいへん興味があります。先生がフタル酸モノエチル濃度について報告されたのが、尿中のものだったのか野生生物の環境中のものだったのか、ちょっと忘れてしまいました…

ジレット：尿中です。

関沢：ヒトの尿ですか？

ジレット：いえ、アリゲーターの尿です。

関沢：あ、分りました。私は現在、ヒトおよび動物のフタル酸エチル類への曝露によるリスク評価を行う国際協力研究に従事しています。思い出しましたが、米国市民におけるステロイド・モノエチルエステル類に関するルブランらの論文も読みました。そのデータに基づいて、私は、米国市民と日本市民との間での地域差について評価することができました。米国市民がフタル酸エステルに曝露する量は、日本市民に比べて2桁大きいようです。

米国市民のその汚染の源は何なのでしょう？フタル酸エステル類が農薬に用いられているのを私は知りませんでしたので、特にフタル酸ジエチルの場合は、医療器具や化粧品に使用されていると思いました。しかし、米国環境保護庁が作成しているフタル酸エチルのデータベースには、フタル酸エチルは地表水には非常に低い濃度しか検出されないと記載されているにもかかわらず、先生のデータでは、尿中の濃度がかなり高いものでした。このことについてのお考えをお聞かせ下さい。

ジレット：あなたのご指摘は大変に重要なものです。我々はそのことをアリゲーターで調べました。アリゲーターから尿を集めました。機械で測定した最初のデータの時には、ジョン・ブロックが私と意見を交換した際にこう言いました。「おや、フタル酸類は無いね。フタル酸の心配はいらない。アリゲーターでは考えに入れなくともいい物質の一つだ。」

そうなった大きな理由は、ヒトを調べるときと同じような感覚でその出力を検討していたためです。ヒトで見つかっていたのは、比較的低レベルです。実際、フタル酸モノ(2-エチルヘキシル)はきわめて低レベルでした。あなたが特に指摘された化粧品との関連で、その他にも数種類がありますが、あなたのご指摘のように日本人集団よりも米国人集団において多量に使われている可能性のあるものもあります。

しかし我々が調べたのは野生生物です。私が把握している生態学データは、湖などの水圏の水底堆積物に含まれる物質に関連したものがほとんどです。そうした物質は水底堆積物に残留します。バクテリアによって分解されます。分解はされますが、残留します。

興味深いことの一つとして、私がこれらフタル酸類をもっと詳しく調べようと、有害物質・疾病登録局(ATSDR)と米国環境保護庁(EPA)のドキュメントを調べ始めたところ、フタル酸エチルヘキシルを始めとして、少なくとも報告されているだけのものでも数多くの種類の物質が、農薬や殺虫剤などに普通に使用されていることが分かりました。水中用の除草剤にも使用されているかどうかは、私には分かりません。

これは現在我々が明らかにしようと試みていることの一つです。我々が調査対象とした動物にこのような高濃度で見つかった物質の源は何なのか？化粧品から来たり、プラスチック製品から来たりしたのではないのは確実です。少なくとも、アリゲーターたちが赤ちゃん用のおしゃぶりをしゃぶっているなんてことは考えられませんから。ありがとうございました。

関沢：たいへん興味深かったです。ありがとうございました。

ジレット：こちらこそ。

井口：はい。ありがとうございました。