

第3章 内分泌学と内分泌毒性学

3.1 内分泌系に関する緒言

体内に存在する内分泌系は、短期または長期に渡る代謝過程の調節において、広範かつ必要不可欠な役割を果たしている。成長（骨の成長や形態形成を含む）、内臓機能、心肺機能、腎臓の本来機能及びあらゆるストレス応答がそうであるように、栄養、行動、生殖の過程は、内分泌系によって複雑に調節されている。あらゆる内分泌系の失調（生理活性ホルモンの分泌に過不足が起きるなど）は、必然的に疾病につながり、多くの器官や機能にその有害影響が及び、しばしば機能不全や生命危機を引き起こす。このような一般的観点からは、内分泌活性を有する環境中化学物質（アゴニストもしくはアンタゴニスト）から受ける脅威は、深刻である。だが、ヒトや野生生物が環境中化学物質の曝露を受けているという事実だけからは、臨床上明らかな内分泌系の攪乱が起きると論ずることは必ずしもできない。曝露濃度、曝露持続時間、曝露時期に大きく依存するからである。

3.2 論点と用語

3.2.1 概要

内分泌系は、ホルモン（離れた標的器官に運ばれ、特定の細胞受容体に結合し、特徴的な反応を引き起こす）を血中に分泌する腺のみによって構成されていると当初考えられていた。しかし、その範疇外の調節化学物質の発見によって、今日の一般的「内分泌」概念は、定義が一層広いものになってきた。例えば、ニューロンから血中に分泌される化学物質がそうであり、時としてニューロホルモンと呼ばれている。「サイトクライン」の語は、成長因子を含め、局在性または細胞内在性の調節化学物質の多くに対し用いられてきた。細胞外液を經由して組織内の他細胞に到達する細胞内サイトクラインは、多細胞に作用する場合はパラクライン（傍分泌）調節化学物質、自己細胞に作用する場合はオートクライン調節化学物質として、それぞれ知られている。「イントラクライン」は、セカンドメッセンジャーや転写因子のような細胞間調節化学物質を示す語として提案されている。多くの内分泌系・傍分泌系が機能しているという認識が近年深まった結果、「内分泌学」の複雑性が増してきた。しかし、そのような複雑性が知られる以前から、人体での血圧、円滑な筋肉収縮、液平衡、骨吸収など、様々な過程において制御を担う「古典的」内分泌系が多々認識されてきた。

本章は、内分泌系の全容についての説明を意図したものではなく、その代わりに、生殖系の発

達と機能に影響する主要な 3 つの内分泌軸に着眼している。このような限定を行った理由は、特に有害影響を受けやすい発達期の生殖系において、内分泌攪乱の多くが顕著に認められるからである。本章中、特に網羅した内分泌軸は、HPG 軸、HPT 軸、HPA 軸の 3 つである。この分類は、厳密なものではなく、内分泌系攪乱化学物質が他の内分泌軸に影響しないという意味ではない。更に重要な点は、全内分泌（おそらく旁分泌も）軸が、まず起動し、それから作用する一般機構は、本質的に同一であることから、これから論ずる内容の大部分は、本章で触れない他の内分泌軸にもおよそ該当する。無脊椎動物にはあまり関心が払われず、脊椎動物の内分泌系に重点を置くことにもなる。脊椎動物と無脊椎動物の内分泌機構には多くに共通点があるが、大きな相違点もいくつかある。無脊椎動物の内分泌学については、一般的考察が報告されている（Downer と Laufer、1983、Matsumoto と Ishii、1997、Cymborowski、1992、Nijhout、1994）。この章は、二つの主要部分から成る。3.1 項から 3.11 項では、成熟個体及び発達期個体での正常な内分泌系の働きについて述べる。3.12 項から 3.16 項では、内分泌攪乱化学物質の器官系影響と疾病過程に焦点を絞っている。各項の大部分は、よく解明されたいくつかの事例を実験的文献（MXC、ピンクロゾリン、ケトコナゾール、フタル酸エステル、ダイオキシン類など）から採り上げ、生殖系での発達影響を扱っている。これらを例とすることによって、化学物質と内分泌系の相互作用にかかわる基本的作用メカニズムについて、広い視点を提供した。作用メカニズム以外にも、影響を最も受けやすい時期、用量反応性、結果的に実験モデルに認められる表現型についても言及した。正常内分泌機能を扱った他項と同じく、本項でも主に脊椎動物、特に哺乳類に対する影響を扱う。本項以降では、発がん性及び神経系機能や免疫系機能に関係する内分泌攪乱化学物質関与の作用メカニズム例を提供する。最終項では、研究室、野外、疫学的現場において見出される何らかの特別な影響が EDC 関与の作用メカニズムに関連するかどうか、を判断するための包括的フレームワークを提示している。このフレームワークは、本評価で触れる知見あるいは科学文献で以後報告される知見など、今後の観察事項を、作用メカニズムの確認によって判定する枠組みを提供しようというものである。

3.2.2 恒常性

あらゆる内分泌系の基本的役割は、ある組織からの信号（場合によっては体外からの刺激）に対して、遠くはなれた標的組織に動的かつ統制的な応答をとらせることである。ほとんどの内分泌系にとって最も重要な存在意義は、有害な代謝影響につながりかねないホルモン濃度や応答の激変を避けるべく、何らかの「恒常性」を維持することにある（Norman と Litwack、1998）。血糖値を正常範囲内に維持しているインシュリンの役割が良い例であり、昏倒を引き起こすような低値、無駄な尿中排泄を引き起こすような高値を防いでいる。あらゆる内分泌系は、おおそシーソー機構（図 3.1）によって作動している。この機構において、標的細胞は、制御細胞にフィードバック信号（通常は負のフィードバック）を送っている。その結果、標的細胞刺

激ホルモンの分泌は、標的細胞由来の一種あるいは複数の代謝物によって変化（通常は減少）する（Darlington と Dallman、1995）。だが実際には、この単純構造の内分泌系モデルには、複雑性や精巧性があり、体内のあらゆる内分泌系がクロストークによって統合されている。この理由は明確である。例えば、生殖には年齢、栄養状態、季節（ほとんどの動物において）が勘案される必要がある。同様に、ストレス応答は、危険下においてこそ他の内分泌系よりも強力に作用しなくてはならず、食欲を調節する内分泌系についても同じことがある程度あてはまる。このクロストークは、健全生命活動に不可欠であり、内分泌攪乱化学物質を評価する上で重要な意味をもつ。例えば、エストロゲン様化学物質曝露は、生殖に関連する内分泌系に対してのみでなく、骨、脂肪、心肺系などの内分泌系にも影響する可能性がある。

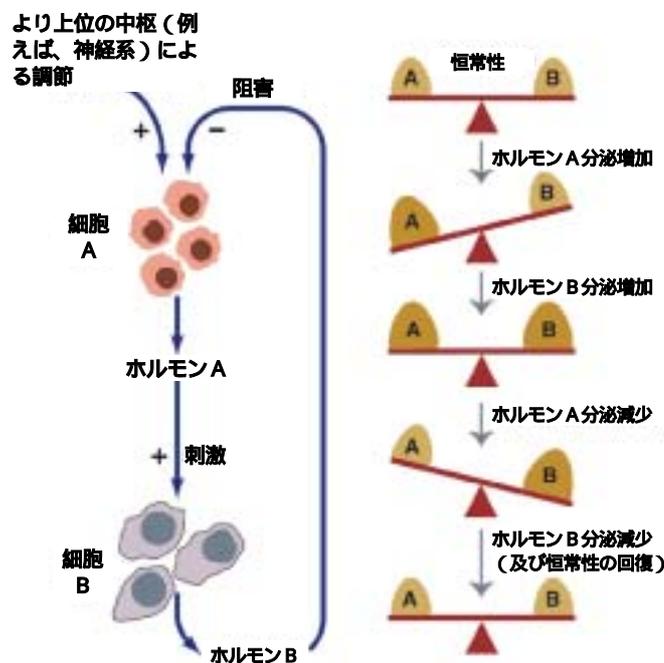


図 3.1 内分泌系が作用する上での基本的なシーソー機構を模式的に図示したもの。細胞 A がホルモン A を分泌し、ホルモン A は、細胞 B によるホルモン B の分泌を抑制する。次いで、ホルモン B は、ホルモン A の分泌を負のフィードバックによって抑制する。このようにしてホルモン A/B の分泌は、恒常性（ホルモン A/B の適正濃度）を維持するため、右図のように相補的に上下する。実際にはホルモン A/B 濃度調節に関与する付加的要因が存在するが、この一般的機構は、ほとんどすべての内・旁分泌系において機能している。

3.2.3 内分泌軸のプログラミング

シーソー機構を介した恒常性は、あらゆる内分泌系の主幹を成す特徴であるが、内分泌系が適正に作動するには、シーソー両端のバランスが適切に起動するようプログラミング

される必要がある。このプログラミングによって、シーソー両端が双方の信号に対し、いったいどの濃度で応答するかを決定する（図 3.1）。多くの内分泌系において、起動プログラムが哺乳類の胎児期や新生児期において決定され、そのようなライフステージにおける異常な環境が不可逆的な誤プログラミングにつながるということが明らかになっている（De Kloet ら、1988、Seckl、1999）。胎児 IUGR の結果として発生する事態が良い例である。このような児動物は、産後に正常な発達を遂げる場合も多いが、高い確率でインシュリン・レジスタンス（インシュリン濃度が正常値よりも高い）が認められ、結果として後半生に糖尿病、肥満、心肺疾患のリスクが増大する。また、早熟の傾向もある。このような変化は、不適切な栄養供給に対する胎児の順応の現れであることが定説化しており、胎児のグルココルチコイド濃度上昇による可能性がある（Philips ら、1998）。正の応答、すなわち卵巢 GnRH が引き起こす LH 上昇によって開始するエストロゲン濃度漸増に対する応答は、雌の視床下部のみにプログラミングされており、雄には認められず性特異的応答の典型例である。哺乳類では、このプログラミングが誕生前に完了しており、雌胎児をある程度の濃度の雄性ステロイドに曝露するとプログラミングが妨害され、雌に不可逆的な無排卵性不妊を引き起こす（Dohler、1991）。対照的に、成熟雌を同濃度の雄性ステロイドに曝露した場合、プログラミングは変化せず、強い負のフィードバックによる一時的排卵障害が起きる可能性がある（図 3.2）。

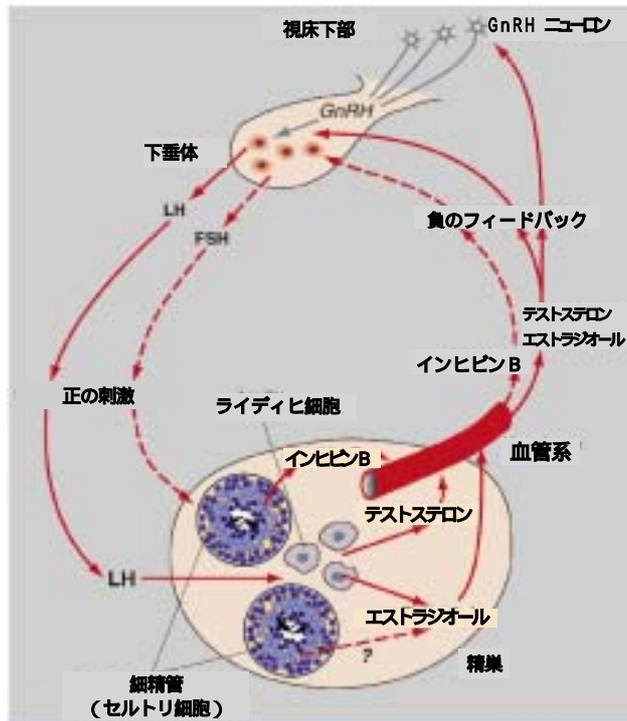


図 3.2 哺乳類の HPG 軸における主要機能因子を模式的に図示したもの。デカペプチドである GnRH は、GnRH ニューロン末端から門脈血系に分泌される。門脈血系は、この信号を視床下部後葉にある性腺刺激ホルモン産生細胞(GnRH 受容体を発現している)に伝達する。GnRH のこれら受容体への結合は、2 種類の性腺刺激ホルモン、LH と FSH の合成と血中分泌を促進する。その後、性腺刺激ホルモンは、循環血液に乗って遠く離れた性腺(例えば、図中では精巣)上の直接的標的細胞に到達する。LH は、ライディヒ細胞に作用してテストステロンの合成と分泌を促進する。次いで、テストステロンは、循環血液の輸送によって視床下部、下垂体後葉に作用して、それぞれ GnRH、LH の作用を抑制する(負のフィードバック)。同様に、FSH は、セルトリ細胞に作用し、PRL ホルモン的一种であるインヒビン B の分泌を調節する。インヒビン B は、循環血液に乗って下垂体に到達し、FSH の合成と分泌を抑制する(負のフィードバック)。テストステロンによる負のフィードバックのいくつかは、精巣(ライディヒ細胞や精原細胞)、視床下部、下垂体におけるテストステロンから E_2 への変換によっても起こり得ることに注意すべきである。テストステロンや E_2 が視床下部と下垂体以外の多くの部位で効力を発揮すること、特に精巣テストステロンのようなホルモンの旁分泌影響が生存に不可欠な重要性をもつこと、にも注意すべきである。ここに示した基本的な系及びここで示し切らなかった緻密性については、本文中にて概略説明する。

3.2.4 内分泌攪乱化学物質の負荷

内分泌攪乱化学物質が体機能に及ぼす潜在的効果について考察する際、以下が論点となる。

- (1) 成熟個体への曝露は、通常の恒常性機能によって補償され、顕著な影響あるいは検出し得るいかなる影響をも引き起こさない可能性がある。
- (2) 内分泌系におけるプログラミングが進行中の時期に曝露すると、促進的や抑制的信号伝達に応答する機能や感受性に不可逆的变化が起きる可能性がある。
- (3) 同濃度の内分泌信号であっても、生活史上の違うライフステージや違う季節に曝露すると、影響に差が生じる可能性がある。
- (4) 内分泌系間にクロストークが存在するため、影響が予想される内分泌系の他、それ以外の内分泌系においも、予想外の影響が起きる場合がある。このことは前述(1)～(3)についても当てはまる。
- (5) (4)の見地から、*in vitro*ホルモン活性測定を *in vivo*条件に外挿する場合、充分注意を払わねばならない。

3.3 哺乳類における HPG 軸

3.3.1 HPG 軸の概要

この軸（図 3.2）は、以下の 3 要素から構成される。

- 1) 大脳視床下部から突出した GnRH ニューロン
- 2) 下垂体後葉の性腺刺激ホルモン産生細胞（性腺刺激ホルモンの LH と FSH を分泌する）
- 3) 性腺体細胞（卵巣の卵胞細胞と顆粒膜細胞、精巣のライディヒ細胞とセルトリ細胞）

GnRH は、GnRH ニューロン末端からパルス的に分泌され（Kimura と Funabashi、1998; Terasawa、1998）、性腺刺激ホルモン産生細胞に作用して LH と FSH の分泌を促進し、次いで生殖腺標的細胞への作用が起きる（LH は卵胞細胞とライディヒ細胞に作用、FSH は顆粒膜細胞とセルトリ細胞に作用）。GnRH 分泌は他のニューロンによっても調節され（Crowley、1999 など）、GnRH が性腺刺激ホルモン分泌に及ぼす影響も、視床下部及び下垂体からの他のペプチドによって調節される可能性がある（Evans、1999）。結果的に、性腺において LH 刺激を受けた性ステロイドと FSH 刺激を受けた蛋白質ホルモン、インヒピン（雌では A 型、雄では B 型）とが循環血中に分泌され、視床下部と下垂体にフィードバックが働いて GnRH、LH、FSH の分泌が低下する。その際、インヒピンは FSH 分泌を、性ステロイドは LH 分泌を

選択的に抑制する (Crowley ら、1991)。以上の記述は、図 3.1 に示す単純な配列に準拠した促進的や抑制的フィードバック循環の配列を表現しているに過ぎない。実際には、この配置はより複雑であり、精巧を極めてしている。例えば、GnRH が LH 分泌と FSH 分泌に及ぼす影響は、極めて異なる。LH 分泌が GnRH パルスによって極めて急激に (パルスの) 刺激されるのに対し、FSH 応答は極めてゆっくりと長時間かけて進行する (Crowley ら、1991; Bousfield ら、1994)。このような差異は、GnRH による LH と FSH の合成、蓄積、放出に大きな差があるためである。同様に、性ステロイド (代表的には雄性のテストステロン、雌性の E_2) は、GnRH 分泌と性腺刺激ホルモン産生細胞機能への影響を経由して LH 分泌をするが、FSH 分泌に対しても負のフィードバックをする。対照的に、インヒピンは、FSH 分泌を選択的に阻害する。

3.3.2 標的細胞の感受性

このような典型的内分泌系の精巧性に加え、他にも考慮せねばならない重要因子が存在する。そのような因子の一つとして、刺激に対する標的細胞の感受性があげられる。性腺刺激ホルモン産生細胞は GnRH 刺激に対して一定不変の応答をするわけではなく、性腺の標的細胞も LH/FSH 刺激に対して一定不変の応答をするわけでもない。刺激物質に対する標的細胞の感受性は、急性的及び慢性的に制御されている (Conn、1994、Erickson と Schreiber、1995)。例えば、GnRH パルスが異常に高頻度であったり、GnRH あるいは GnRH アゴニスト類縁体 (GnRH よりも持続的である) 曝露が慢性的であったりすると、性腺刺激ホルモン産生細胞上の GnRH 受容体において、数の減少や負の制御が起き、GnRH 受容体を更なる刺激に対して一層抵抗性 (非感受性) にする。この現象が数時間に渡る事象として起きてから、更に徐々に「脱感受性化」が完成されていく。「脱感受性化」は、GnRH によって促進される二次メッセンジャー信号伝達メカニズムの変化に関与し、この変化は、性腺刺激ホルモン産生細胞の GnRH 応答性を総合的に減少させる。類似のメカニズムは、性腺細胞にも働いており、性腺細胞の LH 応答性を調節し、FSH 応答性もある程度調節している。言い換えれば、内分泌軸の各標的細胞は、刺激に対する内分泌系そのものの応答性を調節している。この過程には、特に性腺において、隣接細胞間クロストークを経由した更なる精巧性が存在する (Leung ら、1992)。よい例として、精巣セルトリ細胞は、隣接するライディヒ細胞で発現した LH 受容体数を調節する他、ステロイド合成酵素発現を変化させることによってステロイド産生応答性を調節することができる (Sharpe、1993)。逆方向的には、ライディヒ細胞から分泌されるテストステロンは、セルトリ細胞機能に対する重要な旁分泌調節効果を発揮する (Sharpe、1994)。

3.3.3 内分泌ホルモンの代謝

HPG 軸の循環において更なる調節機能を秘める要素は、分泌ホルモンの代謝である。ホルモン半減期を大幅に変化させる代謝の亢進や減少は、ホルモン分泌濃度を変化させることなく、ホルモン効力を変化させるはずである。FSH は LH よりも半減期が長い(代謝が遅い)のが常であり、FSH 濃度変化が LH よりも遅い理由の一つとなっている(Bousfieldら、1994)。更に重要な要素として、性ステロイド結合性蛋白質の役割があげられる。胎児や新生児におけるグロブリンと AFP 及び最も重要なヒト SHBG が該当する。ヒト血液を循環するテストステロンと E_2 の約 97-98% が SHBG に結合し、約 2 - 3% が遊離して生理活性を有する(Moore と Bulbrook、1988、Rosner、1990)。このような仕組みには、2つの重要な意味がある。

- 1) 性ステロイド半減期が大きく延長する。
- 2) 性ホルモン作用を制御する新たな直接的経路が明確になっている。例えば(肝臓による) SHBG 分泌調節は、HPG 軸のどの主要構成素にも影響を与えずに、生理活性を有する性ステロイド濃度を潜在的に変化させる。

実際には、性ステロイドホルモンそのものと、他の内分泌系の構成要素である重要な SHBG 産生調節化学物質が、SHBG 産生に対する主要な調節(促進的)化学物質となっている(Moore と Bulbrook、1988、Rosner、1990)。他の結合蛋白質(AFP など)についても類似の議論が該当するかもしれない。

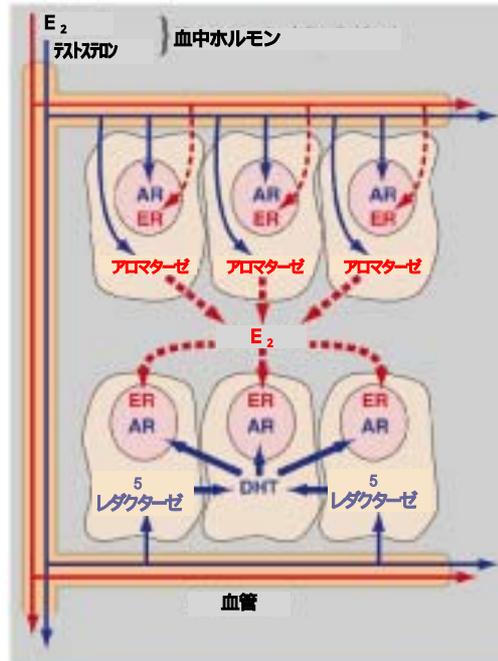


図 3.3 アンドロジェンとエストロジェンを例とした内分泌・旁分泌調節系を模式的に図示したもの。テストステロンと E₂ いずれも内分泌ホルモンとして血流循環するが、特異的な細胞型ではテストステロンから E₂ への変換が起こる(酵素であるアロマトラーゼによる)。E₂ は、ERs に結合するか、もしくは更に強力なアンドロジェンである DHT に変換されて ARs に結合する。このいずれの変換も、比較的微弱な「内分泌」信号を相対的に一層強力な局在標的細胞に作用する「旁分泌」信号に効果的に増幅する。E₂ が循環血液もしくは局在組織に由来するものであっても同一の ERs に結合し、同じく循環血液由来のテストステロンであっても局在組織由来の DHT であっても同一の ARs に結合するので、内分泌系と旁分泌系とが、極めて単純なメカニズムを用いた強力な方法で相互作用しているかを、本図は示している。旁分泌影響を引き出すような高濃度ホルモン濃度を局在的に発生させる現象は、血中ホルモンによって全体的内分泌影響が維持されつつも、対象組織の局在的必要性に応じた標的細胞機能を調節する手段となっている。

3.3.4 HPG 軸の内分泌要素と旁分泌要素の相互作用

ライディヒ細胞が産生するテストステロンは、隣接するセルトリ細胞に作用する(旁分泌影響の一例である)。セルトリ細胞に対するこの影響は、精子形成が行われる上での主経路であることから、テストステロンの雄における最も重要な役割であることにおそらく間違いない(Sharpe, 1994)。卵胞細胞が産生するアンドロジェンの卵巣での影響にも類似

性があり、隣接する顆粒膜細胞に旁分泌効果を及ぼし濾胞形成を促進している (Erickson と Schreiber、1995)。顆粒膜細胞のテストステロン曝露における最重要意義は、顆粒膜細胞が曝露後のアンドロジェンを E_2 に変換し得る点であり、次いで E_2 は、負のフィードバックの役割も含め、子宮その他の体内部位において複数の内分泌効果を発揮している。このテストステロンから E_2 への変換は、雄雌双方において、子宮以外の様々な体内部位で起こる (Simpson ら、1997、Sharpe ら、1998)。細胞のアロマトラーゼや 5 α -レダクターゼの発現能力、ひいては内分泌ホルモン (テストステロン) を局在的作用性の旁分泌ホルモン (E_2 あるいは DHT、図 3.3) に変換する能力は、当初考えられていたよりも (特に雄において) はるかに一般的であった。このような旁分泌ホルモン作用部位は、明らかに基質供給、ひいては主要な内分泌軸に依存している。しかも、旁分泌由来産物の循環血中への「溶出」は、概念上重要性が低く思われるが、負のフィードバックに寄与する可能性がある。図 3.3 に図示した旁分泌メカニズムの片方もしくは両方の構成要素が、雄雌生殖系その他、骨、筋肉、心肺系、脂肪組織、下垂体、脳においても発現していることが今日知られている (Simpson ら、1997、Sharpe ら、1998)。パラクライン系は、主要内分泌軸に局在的付随する存在として作用し、その役割は局在的な要望に答えていると考えられる。

3.3.5 HPG 軸の発達上の役割

これまで強調してきたように、内分泌系の起動は、主に胎児や新生児の発達期において起きる。この期間、性腺からのステロイドに対する視床下部や下垂体における性腺刺激ホルモン産生細胞のフィードバック感受性が完成し、どんな性ホルモン濃度によって GnRH や LH/FSH の分泌低下が開始されるかが決定する。この現象がどのようにして起きるかの詳細は十分に理解されていないが、神経経路のプログラミングが明らかに関与する (Dohler、1991)。同時にフィードバック中心の雌雄差がプログラミングされる (Dohler、1991、Gorski、1996)。雄性生殖が持続的もしくは延長的な非周期性の行動であるのに対し、雌性生殖は、通常、発情周期や月経周期のような生殖周期に沿って働くため、このような雌雄差のプログラミングが必要となる。したがって、性腺でのホルモン産生は、雌では周期性であるのに対し、雄では発情期や非繁殖期以外の期間ではおよそ一定である。雄雌の視床下部における適切な「架線工事」は、成熟雌の下垂体が雄ではなく雌のように応答することを保証すべく、発達期に誘導されなければならない。胎児期や新生児期に産生されたテストステロンは、雄としての視床下部と脳をプログラミングする役割を果たす。この重要時期の雌にテストステロンを投与すると、視床下部機能の雄性化、そしてその結果、成熟後の性周期欠損と無排卵を引き起こす (Dohler、1991、Gorski、1996)。テストステロン、DHT、 E_2 の相対的役割は、種特異的であり、行動毎に異なる。ある動物種では、3 つすべてのホルモンが雄性化の役割を果たす (Cooke ら、1998)。重要なことに、性的二型行動発達の器官形成

上調節と活性化調節には、顕著な動物種間差が存在する (Cooke ら、1999)。例えば、ラットの場合、成熟雌ラットでの雄類似のマウンティング行動の活性化は、出産前の組織形成上のホルモン影響を必要としない。少なくともある系統のラットにおいては、成熟雌ラット内のテストステロンによってこのような行動が活性化される。ラットとは対照的に、ヒト以外の霊長類では、アンドロジェンがマウンティング行動を形成する上で重要な役割を果たしている (Goy、1978、Pomerantz ら、1895)。マウスでの知見をヒトに外挿しようとする場合、このような種間差も考慮せねばならない。ラットとアカゲザルにおける rough and tumble play 行動は、集団的行動の一つであるが、アンドロジェンによって制御されることが判明している (Goy、1978)。

3.3.6 哺乳類の性分化におけるホルモンの役割

出産後における精巣からのテストステロン分泌は、脳の雄性化につながるだけでなく、体全体の雄性化を担っている。このような雄性化には雄性生殖器の形成も含まれるが、この時期には体中の多くの器官に影響が及ぶ (Simpson と Rebar、1995)。性分化におけるアンドロジェンの役割は、よく理解されている。性分化に先立ち、哺乳類の胚には、雄か雌の表現型を発達させる潜在的可能性がある。性腺の性分化に続いて、精巣部分は、雄性管系と外性器への分化を誘導する。表現型上の性の発達には、ウォルフ管系 (雄性) あるいはミュラー管系 (雌性) の維持、外性器の分化が含まれる。一般的には、図 3.3 に示すように、対象組織・器官の雄性化は、循環テストステロンが局部組織や器官にて DHT もしくは E_2 に変換されることによって起きる。しかし、ある組織ではミュラー管阻害物質が関与する。

雌は、卵巣によるテストステロンの分泌スイッチを単に起動させないことによって、雄としての発達することを回避しており、表現型上もしくは内分泌型上の雌性発達が起きるのは、大抵この内分泌信号スイッチの不在が原因である (Simpson と Rebar、1995)。テストステロンが雄性化促進上果す中心的役割には、2つの重要な面がある。第一に、遺伝型上の雄がテストステロンを合成できない場合、雄性化せずに表現型上の雌 (ただし精巣を有する) として発達する。第二に、そして逆に、遺伝型上の雌が充分量のテストステロン (あるいは他のアンドロジェン) に曝露した場合、雄性化 (ただし卵巣を有する) する。このそれぞれについては、最も一般的には不活性化変異 (例えば、AR に発生して雄の雄性化消失につながる) や発達期雌の雄性化を引き起こす母親や雌胎児でのアンドロジェン異常生産 (甲状腺から分泌される場合が多い) によって発生する多くの事例がある (Simpson と Rebar、1995)。重要な点は、これらが必ずしも「全か無か」の現象でないことである。潜在的に極めて微弱な影響も含め、雌の部分的雄性化も雄の部分的雌性化も起こり得る。生

殖器その他の外的表現型（ツノの有無など）に影響が出る場合には発見が容易であるが、影響が脳や他の器官に限定される場合、影響を推測するのは難しい。

脳や生殖腺と同様、肝臓や筋肉のような器官系においても発達期のホルモン環境による「刷り込み」が起こるので、様々なライフステージにおいて、正常な内分泌特性を攪乱する外因性化学物質の標的となり得る。例えば、肛門球海綿状拳筋及びその神経調節は、ラットの性的二型の発生学上、テストステロンが果す組織形成上の役割や活性化の役割のモデルとして採用されている（Breedlove ら、1999）。肛門球海綿状拳筋は、ヒトにおいても性的二型であり、影響の決定的時期が妊娠第 1 三半期に相当する。肛門球海綿状組織の中でも肛門拳筋と脊椎核は、雌ラットよりも雄ラットではるかに大きく、応答には、出産前と発情後のライフステージにおけるテストステロン曝露を要する。肛門筋は 5 α -レダクターゼを欠損しているため、DHT ではなくテストステロンが雄類似の発達型を開始させるホルモンである。

このような種々の「プログラミング」変化において最も重要な局面は、その不可逆性であろう。環境中のホルモン攪乱化学物質に対する最大の懸念は、ある動物が出産期間近に化学物質曝露した場合、一生涯におよぶ有害な（もしくは異常な）変化が起きる可能性にある。すなわち、発達期の決定的な時期に一時的な曝露さえ起きれば、有害影響を起こし得るのに充分であり、ホルモン攪乱化学物質への慢性的曝露の必然性がない点である。この観点においては、懸念が増している。アンドロジェンとエストロジェンとが異なった組織、いわゆる SERMs（Cosman と Lindsay、1999）や SARMs（Negro-Vilar、1999）において、どのように異なって作用するかを示す知見が続々と得られているためである。このような化学物質は、特定組織中でエストロジェン経路やアンドロジェン経路の選択的な活性化や拮抗抑制化が可能であることから、ある種の環境中化学物質については類似した活性が見出されることが予測される。生殖系及び生殖系内分泌軸の発達プログラミングの見地から、このような化学物質影響を予測することは、非常に難しい。

3.3.7 非哺乳類における HPG 軸

哺乳類と哺乳類以外の脊椎動物とでは生殖形態が大きく違っており、哺乳類以外の脊椎動物の間でも生殖形態は大きく違っている。型としては、連続同時進行的な雌雄同体現象、単為生殖、胎生その他、雌雄異体が多く、主な動物において認められる（van Tienhoven、1983）。その上、繁殖頻度は更に限定されており、一回（semelparous）のものと二回以上（iteroparous）のものがある。性腺は一年のほとんどの期間において休止状態を維持し、性腺が活性化する時期は極めて短い。精巣と卵巣の発達が年間の異なった時期に起きる分

断生殖も多くの種類で知られている (Houck と Woodley、1994 など)。だが、これら動物の HPG 軸は、作用や影響、フィードバック様式、関与しているホルモン物質の面で、哺乳類で述べられているものと驚くほど類似している (Norris、1997、Bentley、1998 の総説参照)。

あらゆる非哺乳類における GTH 分泌は、哺乳類と類似した GnRH デカペプチド分子によって制御されている (Sherwood ら、1994、Sower ら、1998)。哺乳類と同じく、この産生細胞は、鼻板で発達し、発達初期に視索前核と視床下部に移動する (DeIlovade ら、1998)。典型的には、少なくとも 2 種類の GnRH が発見されている。しかし、第二の型 (ニワトリから初めて単離された GnRH-II を普通指す) は、本質的に神経伝達化学物質あるいは神経調節化学物として機能しており、HPG 軸に対するよりも生殖行動に影響している可能性が高い。更に、硬骨魚の多くは、脳内に存在する 3 種類の GnRH を有する。硬骨魚の GnRH 輸送は、視床下部 - 下垂体間の視床下部 - 下垂体門脈系が欠落している点で大きく違っており、GnRH 軸索による脳下垂体の直接透過が行われる。拡散輸送方式をとっている無顎綱魚 (ヤツメウナギ類) においても門脈輸送系が欠損している (Gorbman ら、1999)。

哺乳動物の FSH と LH と直接は類似していない 2 種類の異なった GTHs が存在する。第一の GTH は、GTH-I と呼ばれ、性腺発達と配偶子形成を担う。第二の GTH である GTH-II は、配偶子放出に関係する。どちらかの GTH を充分量投与すると双方の影響が発現するが、*in vivo* では順番に分泌されている。四脚動物 (両生類、爬虫類、鳥類、哺乳類) の中では、有鱗爬虫類 (トカゲ類、ヘビ類) のみが単一の FSH 作用的 GTH を有することが判明しており、他の動物は FSH 作用的 GTH と LH 作用的 GTH の双方を産生する。

一般に、テストステロンが全ての脊椎動物によって産生される主要アンドロジェンであり、 E_2 が主要エストロジェンである。多くの雄硬骨魚も 11-ケトテストステロンを産生しており、多くの生物種体内で循環している主要アンドロジェンとなっている。雌硬骨魚もまたテストステロンを産生しており、その循環濃度は E_2 と同等である。硬骨魚は、卵母細胞の成熟完了と排卵を引き起こす重要なプロジェステロン様分子 17,20 -P と 17,20 ,21-トリヒドロキシ-4-プレグネン-3-オンも分泌しており、分泌は GTH-II の影響を受けている。このステロイドは、交尾におけるフェロモンのような役割をももつ可能性がある。ある硬骨魚においては、副腎皮質細胞から産生されるコルチコステロイド、デオキシコルチコステロンが卵母細胞の成熟完了と排卵を引き起こすことが示されている。四脚動物は、テストステロン、 E_2 、プロジェステロンを分泌しており、これらすべては、哺乳類の発達や生殖において認められるのと類似した生殖的役割を果たしている。あらゆる四脚動物から分泌されている第二のアンドロジェンは、DHT である。両生類の雌は、硬骨魚と同様に、繁殖期に

は高濃度のエストロゲンと共に高濃度のテストステロンを体内にもつ。しかし通常は、爬虫類や鳥類の雌の血中アンドロゲン濃度は高くない。ステロイドの標的細胞への作用メカニズムやホルモン特性に関する知見は、哺乳類の系といくつかの違いがあるものの、類似している。例えば、硬骨魚では、ER- α と ER- β 以外にも第3の異なったサブタイプ ER- γ が同定されている (Hawkins ら、2000)。更に、硬骨魚プロジェスチン受容体は、ステロイド結合力が哺乳類とは違っており、哺乳類プロジェスチン受容体に結合する多くの EDCs と結合しない (Pinter と Thomas、1997)。したがって、脊椎動物種間で EDC 影響の外挿を行う場合には、注意を要する。

性腺の完全性転換あるいは部分性転換は、アンドロゲンによる雌性化のような逆説的影響の多くも含めて、卵、幼生、幼動物に対するエストロゲンやアンドロゲンの初期曝露によって引き起こされる (Burns、1961、Hayes、1998a、1998b)。アンドロゲンは雄性管 (ウォルフ管、中腎輸管) 発達を促進しながら雌性管 (ミュラー管) 発達を阻害し、エストロゲンはその逆を行う。アンドロゲンは、MIH や MIS によって引き起こされたミュラー管の退化を助長する可能性がある。エストロゲンは輸卵管を MIH から守ると考えられており (Norris、1997)、アンドロゲンによる逆説的効果も報告されている (Norris ら、1997a、1997b、Clark ら、1998)。エストロゲンに擬似している内分泌攪乱化学物質、抗アンドロゲン様活性を有している内分泌攪乱化学物質は、発達期や幼若期曝露した動物に激しい影響を及ぼす可能性を明らかに秘めている。

エストロゲンは、鳥類輸卵管細胞のオバルブミン合成 (Schlinger と Saldanha、1998) 及び肝臓のビテロジェニン合成 (LeFleur、1998、Meyer、1999) を刺激する。ビテロジェニンは、卵巣が卵の成分となる卵黄蛋白質を合成する際の前駆体である。ビテロジェニン合成 (ビテロジェネシス) は、卵黄を産生する成熟した脊椎動物 (魚類、両生類、爬虫類、鳥類) におけるエストロゲン様活性を検出する際、劇的なバイオマーカーとなる。エストロゲンは、血漿中ビテロジェニン濃度上昇の他、肝細胞に過形成と異常肥大を引き起こす。雄や未成熟雌がエストロゲンに曝露した場合、肝臓は、ビテロジェニン産生誘導を受ける可能性がある (Matthiessen、1998; Matthiessen と Sumpter、1998、LeFleur、1998; Meyer、1999)。すなわち、血漿中ビテロジェニンを環境中エストロゲン曝露のバイオマーカーとしての利用することが可能である。硬骨魚、両生類、鳥類ではビテロジェニンが PRL や GH によって増加するのに対し、軟骨魚、トカゲ、カメでは PRL が阻害的に作用するようである (Grau と Weber、1998)。PRL は、親動物の行動を促進しており、鳥類の抱卵斑のようなエストロゲン依存性の第二性徴を促進している可能性がある (Jones、1971)。

プロジェステロン及びプロジェステロン様ホルモンは、細胞表面の特異的受容体に結合す

ることによって、両生類と硬骨魚の非遺伝子的な卵母細胞成熟を調節している (Paolucci ら、1998)。輸卵管からの分泌 (Chester Jones ら、1987) 及び両生類輸卵管のアルギニン・バソトシンによる収縮感受性 (Guillette ら、1985) は、プロジェステロンに依存している。プロジェステロンは、胎生のニシアフリカコモチヒキガエル *Nectophrynoidea occidentalis* 幼生の発達を明らかに遅らせる (Bentley ら、1998)。カメにおいては哺乳類と同様、プロジェステロンは収縮性を減少させる (Paolucci ら、1998)。ステロイドが細胞表面上の特異的受容体と結合することによって、迅速かつ非遺伝子的な影響を誘導している事実は、環境中化学物質によるステロイドの攪乱においても、ステロイドが制御を助けている生理的過程においても大きな意味を有する (Revelli ら、1998)。

3.4 HPA 軸

3.4.1 HPA 軸の概要

HPA 軸は、HPG 軸に関する説明と類似した仕組みによって機能しているが、制御分子や分泌分子には大きな違いがある (Becker、1995)。CRH は、視床下部ニューロン末端から分泌され、下垂体後葉での ACTH の合成と分泌を調節する。次いで、ACTH は、血流経路で副腎に輸送され、グルココルチコイドホルモン (コルチゾールやコルチコステロン) 分泌を促進する。グルココルチコイドホルモンは、炭水化物・蛋白質・脂質の代謝、抗炎症作用、ストレス応答調節における重要な役割等、全身に渡って多様な影響を示す (Becker、1995)。他の内分泌軸におけるのと同様、標的細胞産物であるグルココルチコイドは、視床下部と下垂体の段階に負のフィードバック影響を及ぼし、CRH 分泌を抑制する。性ステロイドホルモンと同様に、循環血中グルココルチコイドの大部分は、ヒトの場合、結合蛋白質 (CBG) に結合しており、生理活性なホルモンが CBG から局在的に遊離される現象が局部組織での炎症応答メカニズムの一つとなっている (Rosner、1990)。グルココルチコイドが発達期において重要な「プログラミング」効果をもつこと、グルココルチコイドの血中濃度変化が他の内分泌軸の時期や設定値に影響する可能性があること、に関する認識が深まっている。例えば、IUGR の複数影響が、疾病リスクの見地からの短期的影響や長期的影響を含め、胎児におけるグルココルチコイド濃度上昇によって引き起こされることが定説化している (Phillips ら、1998)。

成人の学習や記憶障害において認められているように、ストレスや高グルココルチコイド曝露は、脳の発達に重大な影響を及ぼす可能性がある。新生児ラットをグルココルチコイドで処理すると、加齢に伴う視床下部細胞減少と老化性記憶力低下とが抑制された他、ストレス応答調節能力が向上した (Francis ら、1996、Meany ら、1988)。対照的に、新生児ラットにおけるグ

ルコルチコイド濃度増大は、髄鞘・樹状脊椎骨・シナプス形成の減少の他、軸索の未発達、ひいては学習能力低下や運動機能変化をもたらした (de Kloet ら、1998)。

以上概説した哺乳類の HPA 軸には、更に多くの精巧性や複雑性がある。まず、副腎は、ミネラルコルチコイド (腎臓に作用する)、オピオイドペプチド、エンケファリン、カテコールアミン等、他のいくつかの重要ホルモンの発生源となっている。これらすべては、体全体に様々な影響を及ぼし、HPA 軸とは独立したメカニズムによって分泌調節されている。生殖の見地からは、副腎から分泌される他の最も重要な産物としては、弱アンドロジェンである DHEA、DHEA 硫酸エステル、アンドロステンジオンが挙げられ、ACTH がこれら弱アンドロジェンの分泌を促進する。これら副腎アンドロジェンは、標的組織内で更に活性が高いアンドロジェンもしくはエストロジェンに変換される可能性がある (図 3.3)、アンドロジェンやエストロジェンに应答する生殖内分泌軸や細胞型の機能に潜在的影響力をもつ (Simpson と Rebar、1995)。副腎アンドロジェンの過剰分泌は、子宮内または母親体内の雌胎児の部分的性転換など、重大な影響を持つ可能性がある (Simpson と Rebar、1995)。ヒトの場合、副腎アンドロジェンは、早熟 (副腎皮質機能亢進性思春期徴候) に関与し、陰毛や腋毛の発育促進を担う (Ritzen、1998)。視床下部 - 副腎の段階では、アルギニン・バソプレシンによって ACTH 放出の更なる調節が行われている。

3.4.2 非哺乳類における HPA 軸

非哺乳類において哺乳類の副腎皮質に相当するステロイド合成組織は、肝腎臓腺、肝腎臓組織、あるいは単に肝腎臓と呼ばれている (Vinson ら、1993、Norris、1997a、Bentley、1998)。そのため、特に魚類では HPA 軸ではなく視床下部 - 下垂体 - 肝腎臓軸と呼ばれる場合が多い。副腎皮質との類似性を強調するために「副腎皮質性」の語がしばしば用いられる。

非哺乳類の HPA 軸は、哺乳類同様、まず視床下部による CRH 類似ペプチドの分泌に刺激され、次いで下垂体から ACTH が放出され、更に副腎皮質的組織からコルチゾール (ほとんどの魚類)、コルチコステロン (ほとんどの両生類、鳥類、爬虫類) が分泌される。HPA 軸は、ストレス応答の調節において重要であり (Iwama ら、1997)、抗免疫作用をもつと思われ (Schreck、1996)、哺乳類において述べられているのと近い (Gaillard、1994)。生物は、ストレス因子に対しホルモンを正常濃度に回復させることによって適応している可能性がある。ストレスの持続は、時として慢性的高濃度のコルチゾールやコルチコステロンを産生し、HPA 軸の活性化につながっている可能性がある。HPA 軸の極端な活性化の場合、HPA 軸の消耗と死に至る。慢性的ストレス条件下にある動物は、HPA 軸の活性化状態を呈す

るが、血中グルココルチコイド濃度は正常もしくはやや高い程度である。

多くの非哺乳類が哺乳類に類似した CRH を分泌することが知られているが、それ以外にも ACTH 分泌を促進する CRH 様ペプチドが魚類と哺乳類において見出されている。哺乳類の CRH は、脊椎動物種間での高いアミノ酸配列の保存性を反映し、すべての脊椎動物の副腎皮質の分泌を促進するようである。軟骨魚(サメ、エイ)は、コルチコステロンも産生するが、固有なコルチコステロイドである 1-ヒドロキシコルチコステロンも産生する。

硬骨魚でのコルチゾールの機能は、グルココルチコイドのみではなくミネラルコルチコイドとして Na-K カチオンバランスを調節する。また、血清中に微量のコルチコステロンが存在することも報告されている。両生類幼生及び水棲両生類は、硬骨魚と同じくコルチゾールを主要コルチコイドコルチゾールとして産生する。陸棲両性類及び半陸棲両生類は、あらゆる鳥類及び爬虫類と同様にコルチコステロンを分泌する。すべての四脚動物は、アルドステロンを産生するが、非哺乳類における塩バランス的役割は不明である。哺乳類では、グルココルチコイドとミネラルコルチコイドのそれぞれに対応する 2 種類の普遍的コルチコステロイド受容体を異なった標的細胞中にもつ。他の脊椎動物の非哺乳類におけるコルチコステロイド受容体の型数については、あまり調べられていない。

3.5 HPT 軸

3.5.1 HPT 軸の概要

この軸は、HPG 軸と極めて類似した機構で機能している。哺乳類において、TRH は、視床下部ニューロン末端から分泌され、下垂体前葉の甲状腺ホルモン産生細胞に作用し、TSH の合成と分泌を調節する (Reed と Pangaro, 1995)。次いで、TSH が血流経由で甲状腺に輸送され、甲状腺においては TSH が T_3 及び T_4 の合成促進的に作用する。 T_3 及び T_4 は、血流に放出されて全身を巡り、普遍性が高い代謝活性刺激を行う。 T_3 の方が強い生理活性を有するが、現実には、甲状腺から放出される主要なホルモンは T_4 である (Reed と Pangaro, 1995)。多くの標的組織中 T_4 が T_3 に代謝されることによって強い活性発現が起きる。これは、内分泌軸における単純な精巧性が局部的必要性に応じた調節や制御をどのように行っているかを示している例である。循環 T_3 のほとんどは、肝臓デオジナーゼによる T_4 代謝産物である。循環 T_3 及び T_4 は、古典的な負のフィードバック回路をたどり、視床下部での TRH あるいは下垂体後葉での TSH 分泌を抑制的に調節する (Reed と Pangaro, 1995)。下垂体の段階でのフィードバックのほとんどが T_4 によるものであって、この T_4 は、甲状腺ホルモン産生細胞中で T_3 に変換される。この回路の最末端には、更にもう一つの調節因子であるソマ

トスタチンが存在する。ソマトスタチンは、視床下部ニューロンから分泌され、下垂体後葉の TSH 分泌を抑制する。下垂体後葉の GH 分泌は、本章では論じていない内分泌軸であるが、ソマトスタチンは、下垂体後葉の GH 分泌を（負）調節する上でも主要な役割を果す。だが、GH が細胞増殖を促進するのに対し、TSH は (T_3 及び T_4 を経由して) 細胞代謝を促進しており、これら 2 種類の内分泌軸の調節が下垂体の段階で交差してことを示している。

本項では、甲状腺内分泌軸に対する興味が以下の観点から得られる。

- a) いくつかの PCBs が抗甲状腺活性をもつこと、すなわち T_3 及び T_4 と拮抗する可能性があることが強く示されている点 (Gray ら、1993、Porterfield と Hendry、1998)。
- b) ニューロンから筋肉や精巢中セルトリ細胞に至るまで、種々組織の最終的分化段階において甲状腺軸が果している重要な役割

甲状腺ホルモン作用の多くは透過性であり、細胞が他の刺激に応答する能力に影響を及ぼす。例えば、重要酵素であるアデニルサイクラーゼの活性は、甲状腺ホルモンによって増大する。アデニルサイクラーゼは、GH 標的細胞においてセカンドメッセンジャーである cAMP 生成を担っている。

3.5.2 非哺乳類における HPT 軸

非哺乳類 HPT 軸の構造と機能は、哺乳類と極めて類似している (McNabb、1993、Norris、1997b)。甲状腺は濾胞構造を有しており、甲状腺ホルモンの合成と分泌や末梢組織における T_4 から T_3 への脱よう素化に関するメカニズムは、極めて似ている。代謝分解、分泌形態も似ている。哺乳類の甲状腺では濾胞が第 2、4 大動脈弓間の連結組織部分に分布しているのに対し、硬骨魚の特徴として甲状腺濾胞の分散性があり、連結組織によって濾胞の一つ一つが覆われた構造にはなっていない。甲状腺濾胞が腎臓、肝臓、性腺にまでも分散している場合があり、甲状腺の外科的除去は不可能になる。

視床下部と下垂体での調節において、大きな違いが視床下部での段階に存在する。魚類と両生類では、TRH が TSH 分泌を刺激する主要な因子とはなっていない。両生類では、CRH が主要な因子となっている (Denver、1997)。哺乳類 TSH は、すべての脊椎動物において甲状腺でよう素集積とホルモン分泌を促進する活性をもつ。甲状腺ホルモンは、あらゆる脊椎動物の胚及び後胚の発達期において、特に神経系に係る場合、決定的な役割を果す。魚類や両生類の幼生が若成体に変態する過程でも重要な役割を果す (Dickhoff ら、1990、Galton、1992、Kikuyama ら、1993、Shi、1994)。変態上の劇的変化だけでなく、棲性や食性の顕著な変化に連動した生化学的順応をも引き起こす。すなわち、サケ科魚類の銀化

と両生類の変態における甲状腺ホルモン作用、そして甲状腺ホルモンと PRL やコルチコステロイドとの相互作用である。ギンザケの銀化についての調査研究 (Dickhoff ら、1990) では、インシュリンや PRL の変動に加えてチロキシンで 2 倍、コルチゾールで 6 倍の漸進的濃度増加が報告されている。銀化魚では、GH 濃度が増加し、その GH 濃度の高値が維持される。

両生類の幼生から若成体への変態では、PRL の短期間かつ遅延型の上昇に加えて、甲状腺ホルモンとコルチコステロイドの漸進的濃度増加が起こる。また、ある種のデオジナーゼに特異的な変動が起き、 T_4 から更に活性が強い T_3 への変換が増加する (Galton, 1992)。甲状腺ホルモン受容体型も変態期間中には変化する (Wolffe ら、2000)。変態期間中、甲状腺ホルモンによって対象組織中の多くの遺伝子産物が正の調節を受け、いくつかの遺伝子産物のみが負の調節を受けた (Shi, 1994)。

サンショウウオと爬虫類の脱皮は、甲状腺ホルモンによって調節されているが、鳥類の脱毛は、性ステロイドで刺激され、甲状腺ホルモンで増大する。このような甲状腺ホルモン作用は、哺乳類における体毛の生え変わり現象における影響に似ている (Norris, 1999)。

甲状腺ホルモンは、GH と相乗作用し、魚類、成熟した両生類、鳥類、あるいは、知見は少ないがおそらく爬虫類に対しても、最大成長速度を賦与する (Norris, 1997)。結局、甲状腺ホルモンは、重要な性成熟促進因子であり、広範な動物種が季節的生殖活動を遂げるのに不可欠である (Norris, 1999)。代謝速度、体温、産熱の調節における甲状腺ホルモンの役割は、恒温動物の哺乳類と鳥類において個別に進化したものであって、魚類、両生類、爬虫類において類似した役割は行われていない (Oppenheimer ら、1995)。

3.6 松果体：光周期の変換装置

哺乳類において、松果体は、大脳視床下部の上、大脳皮質の間に存在する。松果体は、生理活性アミンであるメラトニンを夜間に分泌するが、多くの内因性生理リズム調節に影響しており、光周期刺激を行動に変換する上での重要な鍵を握っている。更に、メラトニンは、皮膚色素沈着や毛髪発育を変化させ、HPA、HPT、HPG 軸における視床下部の制御を阻害する他、免疫応答系を促進することが知られている (Norris, 1999)。鳥類や哺乳類における映像的インプットは、主に光学的可視系によって処理される。だが、ほとんどの魚類、両生類、爬虫類の松果体は、直接的な光受容体として重要な役割を果している他、メラトニンを分泌することによって HPA、HPT、HPG 軸に対する重要な調節器官となっている可能性がある。松果体機能を変化させるあらゆる環境要因は、脊椎動物の健全な営みに深

遠な作用をもつ可能性がある。

3.7 HPG 軸と他内分泌軸との相互作用

体内の様々な内分泌軸は、決して孤立して機能しているわけではない。そうすることによって、季節、食糧供給、獲物の存在など、変化する周辺状況に対して、生物の反応力、順応力に明らかに折衝が図られているに違いないからである。HPG 軸以外の分泌軸の種々要素は、HPG 軸に対し重要な調節効果を発揮しており、生殖活動の時期や効率を変化させる影響力をもつ。このような相互作用の複雑性を図 3.4 に示し、重複するクロストークのいくつかに焦点を当てた。これらの相互作用における機能や複雑性への洞察を深めるために、4 つの追加点を（例示の上）特記した。

3.8 内分泌系への理解の進捗

様々な内分泌系間に存在する新たな情報交換経路や機能的重複については、まだ発見が続いている。遺伝的肥満 (*ob/ob*) マウスの研究から比較的最近発見されたレプチンがその一例である (Rosenbaum と Leibel、1998)。レプチンは、脂肪細胞において産生され、満腹感や空腹感に対し、あるいは摂餌行動のような食欲に反応した行動に対し、重要な影響を及ぼす。脂肪組織におけるエネルギー貯蔵は、インシュリン - グルコース内分泌系における重要な一要素であるため、インシュリンがレプチン濃度に対する直接的影響及び間接的影響（脂肪消費の変化など）を及ぼすことが知られている（図 3.4）。レプチンと生殖系との間にも重要な相互作用が存在する (Friedman と Halaas、1998、Rosenbaum と Leibel、1998)。動物というものは、母動物個体が適切なエネルギー貯蔵を持ちかつ食糧供給が良い時にしか繁殖しない。レプチンは、このような様々な要素を統合した必要信号を送る。食料供給と母体のエネルギー（脂肪）貯蔵が低い時は、レプチン上昇が生殖系機能を抑圧する。このような経路は、性成熟の時期や開始においてや繁殖期において、ある種の疾病（拒食症のような摂食障害をもつ女性での正常月経周期停止など）において重要な役割を果たしている。哺乳類以外の脊椎動物におけるレプチンの存在と意義については未解明であるが、栄養状態が生殖に及ぼす重要性については、哺乳類におけるのと同じく極めて重く、すべての脊椎動物にあてはまることが知られている。

核ステロイド受容体への結合という遺伝子発現上の変化に至る古典的メカニズムを介在した影響以外に、内分泌系について最近認識されつつあるもう一つの複雑性は、ステロイドが細胞表面上の受容体に結合し、生物応答に至る信号伝達経路を活性化することによって、迅速かつ非遺伝子的な影響を引き出す力である (Watson と Gametch、1999)。特異的な膜

受容体の存在（及びそれを介在した迅速かつ非遺伝子的なエストロゲンやアンドロゲン作用）は、最近になって視床下部、下垂体、配偶子、ステロイド産生細胞、乳房のような一次的及び二次的な生殖器官など、脊椎動物の生殖系全般に渡って広く見出されている（Revelli ら、1998）。ステロイドの非遺伝子的作用は、軟骨細胞の増殖、分化、マトリクス形成などの非生殖過程の他、哺乳類の精子活性化（Luconi ら、2001）、精巣輸出管での電解質と溶液の輸送（Leung ら、2001）、魚類や両性類におけるプロジェスチンによる卵母細胞成熟（Thomas ら、1998）など、いくつかの生殖過程において重要機能をもつことが示されている。しかし、これらの作用の生理的意義は、ほとんどの組織において不明である。近い将来、本研究分野は一層注目されると予想され、内分泌攪乱化学物質によって引き起こされる広範な影響の全体について詳しく知ることは、一層複雑な作業となるであろう。

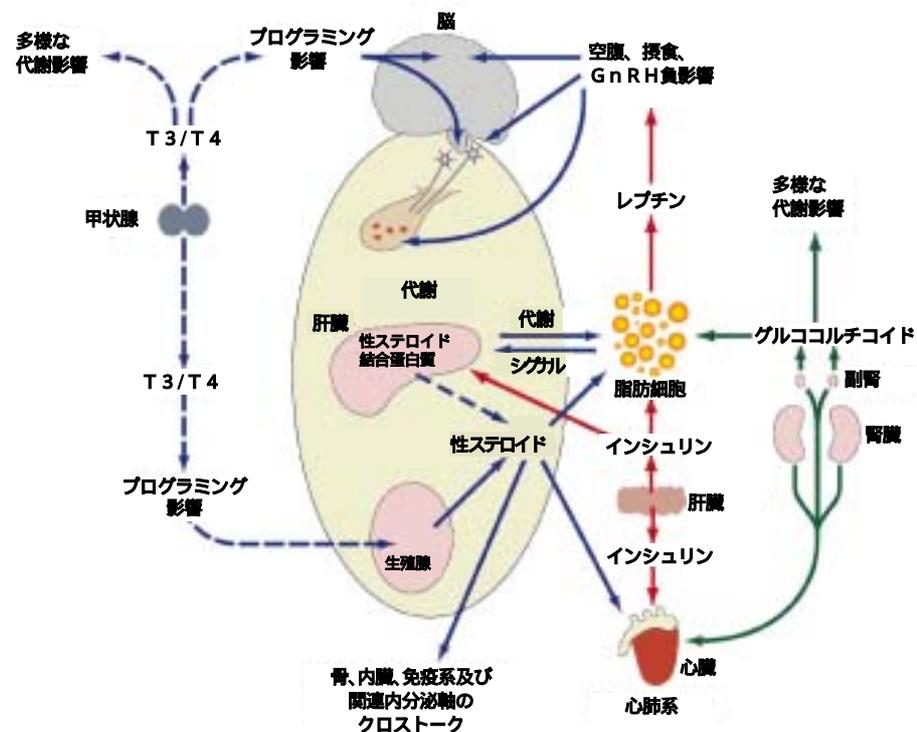


図 3.4 哺乳類の HPG 軸とその他の内分泌軸とに生じるクロストークのいくつかを模式的に図示したもの。特定例のみを図示しているが、実際には、体内すべての機能を統合するために、各内分泌軸が他の内分泌軸と様々な段階で相互作用している。この複雑なクロストークの重要性は、ある内分泌軸に起きた変化が他の内分泌軸の変化を引き起こす可能性であるが、このような相互作用については理解が不十分であり、予想が困難な点である。

3.9 内分泌系の発達とプログラミング効果

内分泌系間クロストークは、ライフステージの違いによって違った意義をもつ可能性がある。「起動期間」すなわち、刺激回路やフィードバック回路の閾値がプログラミングされる期間において、内分泌軸の変化が引き起こす極めて強い影響は、特に重要である。次のような2つの影響が結果的に生殖内分泌軸における変化を引き起こす。一つは、比較的直接的で甲状腺系が関与する。血中甲状腺ホルモン (T_3/T_4) 濃度は、種々組織 (ニューロン、筋肉細胞など) の末梢分化、最近の研究では雄セルトリ細胞の末梢分化にも影響を及ぼす可能性がある。未成熟または増殖中のセルトリ細胞から精子保持に備えた成熟または非増殖セルトリ細胞への変換は、未成熟期の甲状腺ホルモン濃度によって開始される。 T_3/T_4 濃度が正常値よりも低いと (甲状腺機能低下症) セルトリ細胞増殖期の延長を引き起こし、逆に T_3/T_4 濃度が正常値よりも高いと (甲状腺機能亢進症) セルトリ細胞増殖期を短縮する (Sharpe, 1994, Jannini ら, 1995)。一個のセルトリ細胞は極少数の精原細胞しか保持できないので、このような変化の最終結果として、最終的セルトリ細胞数の変化、ひいては精巣の大きさや日毎精子数の変化 (増加もしくは減少) が起きる。甲状腺機能低下症及び亢進症は、体の発育や脳の発達上における変化の見地からは、他の多くの意義をもち (図 3.4)、個々のどの内分泌軸の機能に変化によっても多面的な発現影響が起きる可能性をあらためて示している。

クロストーク以外にも、甲状腺ホルモンは、成熟動物の脳の分化と働きの程度に重要かつ直接的な影響を果す (Akaike ら, 1991, Porterfield と Hendry, 1998)。ヒトでは、妊娠期あるいは出産直後の甲状腺不全が不可逆的な知恵遅れを引き起こす。

内分泌軸間クロストークのプログラミングにおける劇的結果のもう一例は、既に簡単に言及してきた通り、IUGR である。未熟児は、子宮内での発育が抑制された結果「インシュリン抵抗性」であり、誕生時には非常に少量の貯蔵脂肪とレプチン濃度しかもっていない。このような未熟児は、おそらく順応的な内分泌変化によって、普通は「追いつき成長」を示すが、慢性的なインシュリン過剰状態でありインシュリン抵抗性を維持する (Jaquet ら, 1999)。ヒトでは、そのような個体は、糖尿病や肥満となるリスクが高い (Philips ら, 1998)。また、高血圧症であるため、肥満とは無関係の心肺系疾患、心臓発作、腎臓病に罹患するリスクが高い。生殖系もまた有害影響も受ける可能性がある。ヒトの IUGR 男児は、誕生時での睪丸下降不全症や尿道下裂、成人後の精巣精原細胞がん発生や精子数減少に罹患するリスクが高い (Sharpe, 1999)。これらの変化がどのようにして誘発されるかは厳密には不明であるが、性ステロイド濃度の変化が関与している可能性がある。可能性のある一経路を図 3.5 に示した。今日広く定説化していることは、インシュリン亢進症が肝臓

SHBG 分泌を大きく低下させる結果、(生理活性を有する)遊離ステロイド血中濃度が上昇することである(Nestler、1993)。またアンドロジェンはエストロジェンよりも強固にSHBG に結合するので、アンドロジェン/エストロジェン比が変化することになる。このことは、代表的な女性疾患の一つ、多嚢卵巣症において実に顕著である。多嚢卵巣症患者は、インシュリン亢進症であり、正常値より高い血中アンドロジェン濃度をもつため、多嚢卵巣や無排卵性不妊に加えて男性型多毛症となる(Dunaif、1997)。このような状態を発達させる一般的リスク因子は、IUGR である。

3.10 性ステロイドの非生殖影響

インシュリン亢進症による SHBG の変化は、アンドロジェンとエストロジェンの変化につながり、必然的に生殖系機能を変化させる。だが、性ステロイド(特にエストロジェン)は、生殖系以外にも全身に多くの影響を引き起こす。エストロジェン(ある程度アンドロジェンも)は、雌雄の骨形成と骨吸収に主要な役割を果たしており、エストロジェンの作用は、骨端収束に不可欠である(Sharpe、1998)。性ステロイドの産生または作用が異常であると、骨粗鬆症、骨端収束の異常な早まりや遅れにつながり、結果的として最終身長に影響する。更に、性ステロイドは、心肺系に対し広範な影響を及ぼし、ヒトでは性や年齢による心肺系疾患発生リスクに明確に関係する(Sharpe、1998)。性ステロイドは、脳(Gorski、1996、Meewen と Alves、1999)、消化系(Sharpe、1998)、免疫系(Olsen と Kovacs、1996)、脂肪組織(Simpson ら、1997)に対し広範な影響を及ぼし、その過程で標的組織を共有する他の内分泌軸との相互作用を行う(図 3.4)。エストロジェンやアンドロジェンの絶対または相対濃度変化を及ぼすような、HPG 軸への直接的または間接的影響は、広範な意義をもつ。このような影響は、成人に対して急性(下垂体へのフィードバック効果)あるいは慢性(骨や心肺系への影響など)であるのに対し、胎児や新生児に対しては不可逆的(性分化など)となる可能性がある。

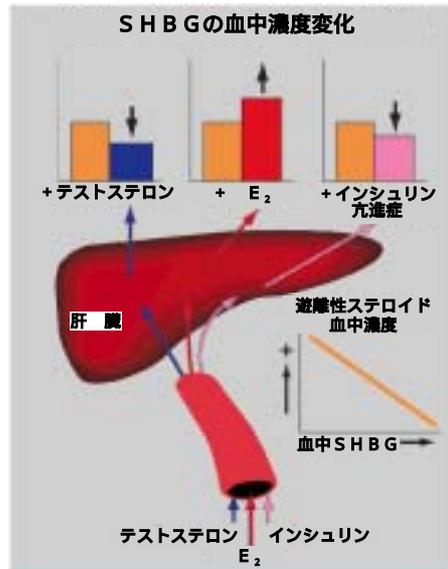


図 3.5 ヒト内分泌軸のクロストークが特に内分泌攪乱に関連する重要例を模式的に図示したもの。ヒトやその他の哺乳類では、性ホルモンであるテストステロン及び E_2 は、SHBGと結合して血流循環するため、標的細胞に自由に結合するわけではない。(肝臓によって合成される)SHBGの濃度変動は、テストステロン及び E_2 産生量の変化によらずに、それらの生理活性を変化させている。おそらく、SHBGの産生そのものがテストステロン(負)と E_2 (正)によって調節されていても不思議ではない。だが、インシュリン濃度上昇は、クロストークを経由してSHBG産生を抑制する。その結果、(SHBGに結合していない)生理活性を有するテストステロン及び E_2 濃度が上昇する。更には、テストステロンが E_2 よりもSHBG結合力が強いため、SHBG濃度の減少は、生理活性を有するテストステロンを選択的に増加させ、結果的にアンドロジェン/エストロジェン平衡を変化させる。糖分が高い食事のような血中インシュリン濃度を増加させる因子は、性ステロイドの標的細胞に対する濃度と作用を潜在的に変化させる。

3.11 内分泌クロストークと内分泌攪乱化学物質

性ホルモンから端を発する生殖系への化学的影響は、決して直線的ではない。インシュリン濃度に影響を及ぼす摂食上の変化(精製糖を多く含む食品の摂取など)は、SHBGの変化を経由して、性ホルモンの生物活性を変化させ得る潜在的効果があるが(図 3.5)、精製糖が性ホルモン活性を有すると論ずることは普通しない。ある環境中化学物質が(微弱な)ステロイドホルモン活性を示すとしても、その化学物質は他にも何らかの活性をもつ可能性がある。PCBsが内分泌系に及ぼす潜在的効果を考える場合、微弱なエストロジェン(抗アンドロジェン)影響よりも、甲状腺影響の方が一層重要である。他の環境化学物質(DDT異性体及びある種のフタル酸エステル)は、エストロジェン様活性と同時に抗アンドロジ

エン様活性を有しており、*in vivo*での効力をどう解釈すべきか混乱させる。抗アンドロジェン化学物質の投与は、内因性エストロジェン濃度の上昇を引き起こし易い。その理由は、抗アンドロジェンがエストロジェンの負のフィードバック循環を阻害するからである。エストロジェンによる負のフィードバックは、補償的 LH 濃度の上昇（図 3.1、図 3.2）、ひいては、アロマターゼ酵素反応基質供給促進を必然的に伴う、正常値以上のアンドロジェン濃度上昇を引き起こす（図 3.3）。種々の研究が示唆するように（Simpson ら、1997）、アンドロジェンがアロマターゼ発現に対し正の調節を行っているのなら、更にエストロジェン濃度上昇も起きることになる。このような総合的結果としての PCBs、DDT、フタル酸エステルなどの *in vivo*「エストロジェン」活性は、どんな *in vitro* エストロジェンスクリーニング系からも予測不可能であった。いくつかのエストロジェンは、ある組織ではアゴニストであっても、他の組織ではアンタゴニストとして作用する（タモキシフェン、ラロキシフェンなど）。最近明らかになりつつある知見からは、アンドロジェンについても、ある程度同じことが示唆される。このような差の原因について完全には判っていないが、組織特異的なコアクチベータ蛋白質（あるいはアダプター）が関与していることが明らかである。エストロジェンの場合は、ER- α や ER- β が発現している。いくつかのコアクチベータは、ステロイド受容体スーパーファミリーの複数メンバーによって共有されている可能性があるため、あるメンバーの作用が、アンドロジェン（あるいはエストロジェン）受容体複合体に結合するコアクチベータの供給を変化させるのかもしれない。一方、非生殖系ホルモンは、このようなコアクチベータの発現調節を行うのかもしれない。これらの可能性は推測の域を出ないが、タモキシフェン、ラロキシフェン、その他研究途上の SERMS（Cosman と Lindsay、1999）の知見から洞察すると、性ステロイドホルモン作用を変化させる可能性をもつ未知経路の存在が強く示唆される。

上記の考察によれば、問題化学物質が生殖系に対する内分泌攪乱化学物質であるかどうかの判定が目的である場合、単に *in vitro* 実験系において性ステロイド活性試験を行うよりも、「生殖上の」効力（例えば、生殖系の発達や機能に変化を引き起こす力）を試験せねばならないことは明確である。

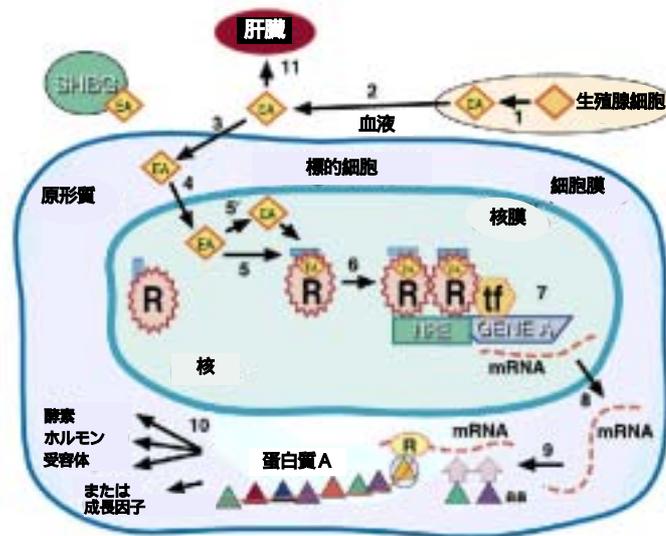


図 3.6 スteroidホルモン作用の鍵段階を模式的に図示したもの。これらの段階は、環境中化学物質による攪乱に対し感受性が高い可能性がある。

- (1) E_2 、テストステロン、プロゲステロンなどのステロイドホルモン (EA) は、生殖腺胞内において生成される。医薬品や農薬などの CYP450 酵素阻害剤は、ここで作用する。
- (2) ホルモンは、生殖腺から血液中に分泌され、拡散を通じて細胞に取り込まれるか、SHBG と結合して輸送される可能性がある。遊離型と結合型ホルモンの割合はいくつかの因子によって決まるが、結合型ホルモンは、ステロイドの SHBG 蛋白質ととの結合親和性に応じて一定の比率で SHBG から解離される。有害物質は、SHBG 濃度を变化させる可能性がある。いくつかの擬似ホルモンは、天然リガンドほどには SHBG と結合しないため、標的細胞と肝臓代謝の双方に取り込まれ易いことが報告されている。
- (3) スteroidホルモンは細胞内に拡散する。
- (4) ホルモンは、未結合受容体 (R) が存在する核周辺部に拡散する。
- (5) ホルモンや擬似ホルモンは、受容体と結合する。多くの外因性化学物質は、ER または AR と結合することが示されている。血中分泌された化学物質がホルモン前駆物質であって、細胞中で活性ホルモンに代謝される場合もある (5')。例えば、ある組織ではテストステロンはアロマトラーゼによって E_2 に代謝されるのに対し、他の組織では 5 β -レダクターゼによって DHT に変換される。筋肉のような組織内では、テストステロンそのものが活性ホルモンである。標的組織内で前駆ホルモンの活性化を阻害する EDCs もある。
- (6) 天然リガンドや合成リガンドに結合した受容体 (R) は、鍵となる蛋白質結合部位

が顕わになるような立体配座の変化を起こし、ホモダイマーを形成する。

- (7) ホモダイマーは、転写因子 (tf) と次々に結合し転写複合体を形成する。転写複合体は、ホルモン応答配列 (HRE) として知られているホルモン依存性遺伝子上の特定 DNA 配列に結合する。次いで、転写複合体は、mRNA 合成 (mRNA) を開始する。DNA の結合を妨害するアンチホルモンもある。
- (8) mRNA は、核外の原形質に運ばれる。
- (9) 特定の tRNAs (太矢印) とリボゾームに結合したアミノ酸 (aa) の連結によって、蛋白質 (「糸」上の円) が mRNA を鋳型として合成される。
- (10) 酵素、蛋白質ホルモン、成長因子、細胞の構成成分が、内分泌作用マーカーとなり得る可能性がある。ピテロジェニン¹は、卵生脊椎動物が産生するエストロジェン依存性蛋白質であるが、ホルモン依存性マーカーの一例である。
- (11) 有害化学物質が、血清中ホルモン濃度が変化するようなホルモン代謝の増減を伴う肝機能変化によって、内分泌機能を攪乱する可能性がある。例えば、いくつかの PCB は、T₄代謝を促進して血清中 T₄濃度を劇的に減少させる。肝臓を刺激し、血清中ステロイドホルモン濃度を減少させる農薬も知られている。

3.12 EDC による発達・生殖毒性の作用形式と発現影響

3.12.1 調査の視点

いくつかの内分泌攪乱化学物質については、生殖機能及び発達上の *in vivo* 有害影響が既に詳細に詳しく知られている。本項では、そのいくつかの作用メカニズムを厳選して提示した。内分泌系の正常な機能から予測されるように、内分泌攪乱の細胞的あるいは分子的機構は、受容体結合に限定されるものではなく、例えば、ホルモンの合成、輸送、代謝なども包括する。一例として、図 3.6 は、いくつかのステロイドホルモン作用メカニズムを示しており、既に EDCs が内分泌機能を変化させることが判明している過程を対象に、鍵段階を提示している。信号伝達過程におけるもうひとつの特徴は、人工化学物質による攪乱を受けやすい点である。本項は、厳選したステロイド受容体アゴニスト、ステロイド受容体アンタゴニスト、ステロイド合成調節剤、AhR アゴニストを対象に、発達期の生殖系における細胞的あるいは分子的メカニズムと有害影響について限定する。哺乳類以外のデータも得られる場合は、提示する。一般に EDCs は、複数のメカニズムによって生殖系の発達を変化させている。そうすることによって、必ずしも同じ用量によらずとも厳密に同じライフステージにおいてでなくとも、複数の標的器官が負荷を受ける。有害物質の多様

な内分泌影響、非内分泌影響は、*in vivo* での示唆に富む包括的な方式においてのみ解釈可能であるので、*in vitro* 試験の限界を認識することは、極めて重要である。

脊椎動物の内分泌学には大きな相同性が存在するので、ある動物の内分泌機能を変え得る有害物質は、他の動物においても毒性を引き出す可能性がある。だが、内分泌機能をもつ動物種間には、外挿による推測を進める際に考慮すべき大きな違いも存在する。ホルモン、ホルモン合成、ホルモン受容体の相同性が高度に保存されていたとしても、生殖機能及び発達における特異的ホルモンの役割は、大きく違う可能性がある。また、EDCs 代謝に大きな違いがあるために、EDCs への応答性が動物種間で顕著に違ってくる可能性もある。

3.12.2 AR を介在する (抗) アンドロジェン

3.12.2.1 **ピンクロゾリン**. ヒト AR 塩基配列が一箇所置換しただけで起きるアンドロジェン欠乏症候群では、完全な性転換が起きる。このことを科学的根拠として、哺乳類が単一の AR をもつと一般的にみなされている (Quigley ら、1995)。ピンクロゾリンは、AR 拮抗性をもつジカバメート系殺菌剤である。EDCs の中でも、抗アンドロジェン的な殺菌剤であるピンクロゾリンの分子細胞学的挙動は、最も徹底的に詳細に知られている。ピンクロゾリン代謝物である M1 及び M2 は、アンドロジェンの哺乳類 AR への結合を完全阻害する。M1 及び M2 は、ヒト AR 導入細胞での DHT が誘導する転写活性をも阻害する。Kelce ら (1997) は、ピンクロゾリン処理が抗アンドロジェン的に *in vivo* 遺伝子発現を変化させることを強く示した。ピンクロゾリン及びその代謝物は、AR 結合力とは対照的に ER 親和力を示さない。5 α -レダクターゼは、テストステロンから更に強活性の DHT に変換する上で必要な酵素である。ピンクロゾリン、M1 及び M2 は、5 α -レダクターゼを *in vitro* で阻害しない (Kelce ら、1994)。*in vivo* と *in vitro* において生物影響を示す用量値の比較から、母動物血清中の M1 及び M2 濃度が AR 結合の K_i 値に近づくと、雄児動物に奇形が起こることが判明している (Kelce ら、1994、Monosson ら、1999)。

M1 及び M2 が AR 依存性遺伝子発現を抑制することは、*in vitro* でも *in vivo* でも示されている。また、ピンクロゾリンは、去勢後テストステロン処理された未成熟雄ラットにおいてアンドロジェン依存性組織の増殖を阻害するが、これは *in vivo* 抗アンドロジェン作用を更に強く示す例である。薬物であるフルタミドは、ヒドロキシフルタミドに代謝活性化される。ヒドロキシフルタミドは、ピンクロゾリン代謝物である M2 に構造が類似しており、フルタミドとヒドロキシフルタミドは、それぞれピンクロゾリンと M2 とほぼ同程度の内分泌活性を示す (Imperato-McGinley ら、1992、Gray ら、1994、Kelce ら、1995)。

ビンクロゾリンとフルタミドは、抗アンドロジェン影響を生殖器官に及ぼす他にも、視床下部 - 下垂体軸の段階で生殖機能を変化させる。ビンクロゾリン (30 ~ 100 mg/kg/day ; Monosson ら、1999) あるいはフルタミドの経口投与は、血清中 LH 及びテストステロン濃度上昇とライディヒ細胞の過形成を引き起こす。ビンクロゾリンやフルタミドとは対照的に、*p,p'*-DDE (Kelce ら、1995) や MXC (Gray ら、1989、1999c) は、抗アンドロジェン物質ではあっても、血清中 LH 及びテストステロン濃度には何ら有意な変化を引き起こさない。妊娠後期に用量 3 ~ 200 mg/kg/day のビンクロゾリンに曝露すると、雄児動物に抗アンドロジェン的な催奇影響が多々認められる (Gray ら、1994、1999b)。このような影響には、雌に近い AGD、乳頭の存在、尿道下裂を伴う生殖結節裂、鼠蹊部外の異所性精巣、腔囊、精巣上体肉芽腫、付属性腺の小型化や消失、包皮分離の遅延などがある。低用量ビンクロゾリン影響試験では、妊娠雌に 3 ~ 100 mg/kg/day の範囲で妊娠 14 日目から出産後 3 日目まで曝露が行われた。最低用量群 (3.125 mg/kg/day) においてすらも、雄児動物の AGD 及び乳頭出現に有意な影響が認められた。雄性生殖器官の奇型は、50、100 mg/kg/day において観察された。これらすべてのエンドポイント (AGD の低値、乳頭の出現、付属性腺重への影響、尿道下裂、精巣上体発達不全) は、AR 段階での妨害によって誘起されると信じられているが、有意な変化を引き起こす用量濃度は、エンドポイントによって違いが大きい。このような変化の中には、実験用量濃度の範囲では明確な閾値を示さないものもある。雄性生殖に対する微弱な抗アンドロジェン影響を検出するには、多世代試験が不可欠であり、新しい試験ガイドライン (新規な抗アンドロジェン影響測定法を導入している) を用いない場合、約一桁も大きい NOAEL 値を与えてしまう。

ビンクロゾリン 100 mg/kg を未成熟ウサギに 2 ヶ月間経皮投与すると、付属性腺重量が低下するが、精子数は有意に増加する。抗アンドロジェン影響によってテストステロンの視床下部または下垂体への負のフィードバックを阻害され、性腺刺激ホルモン分泌を上昇させている可能性を、著者らは示唆している (Moorman ら、2000)。

3.12.2.2 その他の AR アンタゴニスト . DDT 代謝物である DDE (Kelce ら、1995、Gray ら、1999a、You ら、1998、1999a、1999b)、メトシキクロル代謝物である HPTE (Gaido ら、1999、Maness ら、1998)、有機リン酸エステルであるフェニトロチオン (Tamura ら、2001)、ジカルボキシミド系殺菌剤であるプロシミドン (Ostby ら、1999) など、ビンクロゾリン以外の有害化学物質のいくつかにも、AR アンタゴニスト活性が認められている。リニユロンは、弱い AR 結合力を有する尿素系除草剤であるが、哺乳類の性分化に対し複数の作用メカニズムによって有害影響を引き起こす可能性が、雄児動物への影響から示されている (Gray ら、1999a、Lambright ら、2000、McIntyre ら、2000)。関連する知見として、前立腺治療のための臨床薬として使用されるペルミキソンは、植物由来の抗アンドロジェン

様活性薬物であるが、AR に結合するだけでなくステロイドホルモン合成を阻害する (Carilla ら、1984、Bayne ら、1999、Plosker と Brogden、1996)。トリス(4-クロロフェニル)メタノールは、発生源不明の地球規模汚染物質であり、DDT 類似構造をもち *p,p'*-DDE に匹敵する AR 結合力をもつ。だが、成熟ラットを餌中最大濃度 100 ppm に 28 日間曝露しても、*in vivo*での抗アンドロジェン影響は認められなかった(Foster ら、1999)。

3.12.2.3 哺乳類以外の脊椎動物における AR 介在影響。 魚類の性的二型は、エストロジェンとアンドロジェンの双方に影響されることが示されている (Ankley ら、1998)。例えば、Smith (1974) は、ファットヘッドミノーの生殖結節と粘液分泌背隆起の形成が 17-メチルテストステロンによって誘導されることを示した。孵化直後の雌遺伝子型チヌークサーモンに芳香族化変換可型(テストステロンと 17-メチルテストステロン)、芳香族化変換不可型(11-ケトテストステロンと 17-メチル DHT)を 2 時間処理すると用量相関的な性転換が観察された。この実験では、天然型や芳香族化変換可型の方が、化学合成型や芳香族化変換不可型よりも活性が強く、発達初期にアロマターゼが何らかの役割を果していることが示された (Piferrer ら、1993)。テラピア幼魚にアンドロジェンを経口投与すると、商業規模ではほぼ独占的に雄魚のみを生産することができる。性分化前の *O. aureus* にトレンボロンアセテート (25 mg) を 28 日間投与すると、98%の性比で表現型上の雄となる (対照群では 55.7%)。これ以上の高用量曝露では雄性比が低下するが、抗エストロジェン様活性がむしろ低下するためと推測される (Galvez ら、1996)。Davis ら (2000) らは、ブチナマズを同様に処理したところ、処理区の成熟魚の体重、体長、性腺重 (GSI)、血漿中テストステロン濃度が対照区の成熟魚よりも低値であるという化学的根拠を見出した。成熟ファットヘッドミノーをメチルテストステロンに 21 日間曝露した実験では、雄雌いずれにおいても血漿中性ステロイド濃度の低値と (相対重量と病理組織学検査を科学的根拠とする) 性腺状態における有害影響が認められた (Ankley ら、2001)。メチルテストステロンのアンドロジェン的な性質は、曝露した雌魚に雄性化が認められることから明確に証明された。投与アンドロジェンがエストロジェンに芳香族化されたためと思われるビテロジェニン誘導が、雄と雌の双方に認められた。哺乳類は単一 AR をもつと信じられているが (Quigley ら、1995)、いくつかの魚食性の魚は、AR-1、AR-2 と命名された 2 種類の AR をもつ (Sperry と Thomas、1999a、1999b)。AR-2 の結合特性は哺乳類 AR と類似しているが、脳内 AR-1 は AR-2 と極めて異なったりリガンド結合特性を示す。AR-2 は、*p,p'*-DDE、ピンクロゾリン代謝物である M1 及び M2 と結合することが知られており (Sperry と Thomas、1999a) *in vitro*での AR 機能が広範な脊椎動物種間で類似性をもっていることを示している。メダカは哺乳類型の性分化を示すが、*in vivo*でのピンクロゾリン処理はメダカ (*Oryzias latipes*)に性転換を引き起こす (Koger ら、1999)。対照的に、Makynen ら (2000) は、ピンクロゾリン処理によってもファットヘッドミノーの性転換を認めなかった。この

結果には、ビクロゾリン代謝活性化が存在していないこと (Makynen ら、2000)、まだ未解明な性分化過程でのアンドロジェンの役割など、いくつかの要因が関係している可能性がある。だが、上記実験結果とは対照的に、M1 と M2 は、ファットヘッドミノアの AR に結合しなかった (Makynen ら、2000)。

Takeo と Yamashita (1999) は、rtAR- と rtAR- と命名された 2 つの異なるニジマス c-DNA クローンについて述べている。これらクローンは、完全な AR コード領域をもつ。両者の予想アミノ酸配列を比較したところ、85%の相同性があることが判明した。このような高い相同性にも係らず、コトランスフェクション試験において rtAR- がアンドロジェン応答レポーター遺伝子を活性化したのに対し、rtAR- は活性化しなかった。このことから、ニジマスは機能が違う 2 つの異なる AR イソホームをもつことが示唆された。

Ikeuchi ら (1999) は、(日本産)ウナギにおいて精子形成を誘導するホルモンとして 11-ケトテストステロン (硬骨魚の主要アンドロジェン) を同定し、その受容体 (eAR1) cDNA をウナギ精巣からクローン化した。彼らは、797 アミノ酸残基をコードしている第二の型の AR (eAR2) についてもウナギ精巣からクローン化したと報告した。eAR2 のアミノ酸配列は、eAR1 等の AR と DNA 結合ドメイン (88~98%) とリガンド結合ドメイン (59~85%) で高い相同性を示したが、他のドメインでの相同性は低かった。eAR2 は、哺乳動物細胞を用いた一過的トランスフェクション試験において、アンドロジェン応答性のマウス乳がんウイルスプロモーターに対しアンドロジェン依存性の転写活性を示した。eAR2 の mRNA 組織分布は、eAR1 とは異なっていた。下等脊椎動物の AR と哺乳類の AR とでリガンド結合ドメインでのアミノ酸配列の違いが、天然及び合成リガンドの結合に対し、どの程度影響するかについては、まだ良くわかっていない。リガンド結合ドメインの全配列相同性に差があることは明らかである。しかし、ヒト AR 結合ポケットに存在する複数アミノ酸を突然変異させると AR の結合力が消失するが (Quigley ら、1995)、このようなヒト AR 結合ポケットのアミノ酸は、魚類において、他のリガンド結合ドメイン中アミノ酸よりもはるかに高度に保存されているようである。

3.12.2.4 抗アンドロジェンのその他の作用部位：肝臓と副腎. ビクロゾリンとその代謝物は、グルココルチコイド受容体に結合しないが (Kelce ら、1994)、ビクロゾリン処理がラット (Monosson ら、1999)、イヌなど、いくつかの哺乳類において下垂体 - 甲状腺軸を変化させることが示されている。ビクロゾリンのイヌの甲状腺影響については、確かにこれまで無毒性量 (NOAEL) が定められていない。ビクロゾリン (Monosson ら、1999) とフルタミド (Wada ら、1999、Migliari ら 1999) の肝臓影響も注目値する。これら抗アンドロジェンの肝臓影響については作用メカニズムが解明されていないが、AR 経

由で作用するアンドロジェンと抗アンドロジェンとが、肝臓の生長と代謝上のいくつかの局面に変化をもたらすことが知られている。特にシプロテロンアセテートは、抗アンドロジェン様活性、プロジェステロン活性、抗グルココルチコイド活性をもつ薬物であるが、肝細胞に対し有糸分裂促進剤としても作用する (Kasper ら、1999)。ピンクロゾリンとフルタミドの肝臓に対する作用メカニズムは、長期投与によって有害影響 (雄ラットでフルタミドが引き起こす肝機能不全性死亡、ピンクロゾリンが引き起こす肝腫瘍) を引き起こすことから、調査研究に値する。

3.12.3 ER を介在するエストロジェン

3.12.3.1 概要. 子宮肥大応答も含め、農薬にエストロジェンアゴニストとして作用する潜在性があることは、約 30 年前に知られており (Bittman ら、1968)、ビスフェノール A や DES のような人工化学物質のエストロジェン様活性についても 1938 年に初めて報告されている (Dodds と Lawson、1938)。多くのエストロジェンが *in vitro* 試験 (エストロジェン受容体、乳がん細胞増殖、転写活性化など) を用いて同定されているが、メトシキクロル、クロルデコン、オクチルフェノール、ノニルフェノール、ビスフェノール A、ビスフェノール B、植物エストロジェン (ゲニステイン)、エチニルエストラジオール、菌由来マイコトキシン (ゼアラレノン) など、いくつかのエストロジェンは、*in vivo* 試験においてもエストロジェン様活性を示す。他の化学物質は、エストロジェン様活性の科学的根拠を *in vitro* で提示していても、同じような科学的根拠を *in vivo* の系では提示していない。*in vivo* での判定を行わずに、*in vitro* の結果を解釈してしまうことは危険である。*in vitro* では BPA と E₂ のようなエストロジェンは、予想外の仕組みで相互作用することが知られており、BPA は、いくつかの E₂ 影響に対しアンタゴニストとして作用している (Gould ら、1998)。大豆、ベリー、果実、穀物、野菜、ナッツなどの様々な植物に含まれる植物エストロジェン (大豆のイソフラボノイド、ナッツのリグナンなど) は、もう一つのエストロジェン様化学物質曝露源となっている (総説としては Whitten と Patisaul、2001)。イソフラボノイド系の植物エストロジェンは ERs、特に ER- の親和性リガンドであるが、細胞を用いた *in vitro* 結合試験では活性が低いことが結合試験から示されている。植物エストロジェンは、通常の食事を摂っているヒト血漿中濃度を含む種々の用量で広範な生物影響をもつことが *in vivo* データから示されている。*in vivo* 試験影響としては、骨、卵巣、下垂体、脈管組織、前立腺、血清脂肪について報告されている。感受性の動物種間差を正確に比較するための血液循環量の薬物動態学的な厳密な比較はなされていないが、ヒトに対する有効濃度 (0.4 ~ 10 mg/kg/day) は、齧歯動物に影響を及ぼす濃度 (10 ~ 100 mg/kg/day) よりも大きく低い。

3.12.3.2 メトキシクロル：エストロゲン様かつ抗アンドロゲン様の農薬。 エストロゲン様活性を有するメトキシクロル (MXC) は、今なお市販され使用されている。この DDT 誘導体は、ある種の動物において DDT 代謝物よりも速やかに代謝されるので、通常は生物濃縮性でない。MXC は、ER アゴニスト、ER アンタゴニスト (Maness ら、1998、Gaido ら、1999)、AR アンタゴニストであるので、EDC 作用の多様性を示す例となっている。MXC は、*in vivo* で卵巣、膣、脳 (行動)、骨などの多くの組織において ER を介したエストロゲン様活性を示すが、視床下部 - 下垂体軸には影響を示さない。MXC 処理は、ラットに長期間高用量投与を実施しても抗 PRL 症の誘発、LH の阻害、下垂体腫瘍の誘発を引き起こさなかった (Gray ら、1988、1989、1999c)。MXC は成熟及び幼若雄ラットにおいてアンドロゲン作用に拮抗するが、このことは MXC 代謝物がテストステロンや DHT による遺伝子発現及び組織成長分化を阻害している可能性を示している。なぜなら、これら組織には ER が存在していない場合があるからである。天然及び人工エストロゲンの多くが AR 結合力を示し、*in vitro* 試験では (Danzo、1997、Baker ら、1997) 高濃度条件下で作用することが多いが AR アンタゴニストかつアゴニストとして作用している。

MXC そのものは、*in vitro* ER 結合試験及び転写活性試験において微活性もしくは非活性である。MXC 純品 (>99%) は、純度が劣る MXC (>95%) と同程度の非活性である (Bulger ら、1978a、1978b)。MXC は、エストロゲン様活性を有する数種類のモノヒドロキシ、ジヒドロキシ代謝物に代謝活性化される。これらのうち HPTC も、ER- アゴニストであると同時に、比較的強い AR アンタゴニスト、ER アンタゴニストである (Maness ら、1998、Gaido ら、1999)。

成熟雄ラットを MXC 処理すると、非常に高用量にて精子形成阻害による出産率の変化がおきる (Gray ら、1999c)。それよりも低用量 (約 25 ~ 200 mg/kg/day) では、精子産生、精巣形態、血清テストステロン濃度に影響を与えずに、精巣上体精子貯蔵量及び精嚢重量を減少させる。離乳期の MXC 処理では、性成熟遅延、付属性腺重減少を含む多くの影響を雄児に引き起こす。成熟雌においては、MXC は、ロードシスを誘導するなど、むしろエストロゲン特徴的影響を引き起こす。性成熟が遅延した状態において、血中 LH あるいはテストステロン濃度に影響は認められなかったが、血清 PRL 濃度に上昇が認められた。LH 影響が認められないことは、下垂体経由の機構よりもむしろ被験物質が生殖系に直接働いていることを示唆しているかもしれない。長期間曝露の場合、雄ラットに対する 10 ヶ月間の MXC 曝露 (200 ~ 400 mg/kg/day) では、性成熟が 10 週間まで遅延し、出産率が低下し、生殖行動が変化するが、シリコンゴムチューブ内に埋設された E₂ の慢性的持続影響に近い変化ではなかった。雌ラットに 0、5、50、150 mg/kg/day の MXC を出産前一週間、出産一週間強制経口投与し、更に生後 7 日目からは児動物に直接 MXC 投与した実験では Chapin ら、

1997a)、高用量群で同腹児数が約 17%減少した。包皮分離日は、中用量群で 8 日、高用量群で 34 日遅延したが、AGD は変化しなかった。高用量群雄が受胎させた未処理雌数は低値であった。すなわち、精巣上体精子数、精巣重量は、高用量群と準高用量群において低値であった。雌への影響(腔開口、性周期)は、50 mg/kg/day 以上の群において認められた。

3.12.3.3 哺乳類以外の脊椎動物における外因性エストロジェンの作用メカニズム。 いくつかの外因性エストロジェンは、哺乳類 ER に近い親和力で魚類 ER と結合する (Loomis と Thomas、1999)。オクチルフェノール、ノニルフェノール、BPA、*o,p*-DDT、エチニルエストラジオール、MXC は、(魚類、カエルなど) 下等脊椎動物においてエストロジェン様活性を示す。鳥類や哺乳類の動物種において、*o,p'*-DDT は雌生殖器官の生長を促進するが、*p,p'*-DDT は促進しない (Bitmann ら、1968)。

これら外因性エストロジェンのいくつかは、性腺の間性 (Kloas ら、1999)、雄でのビテロジェニン合成 (Kloas ら、1999、Lutz と Kloas、1999)、雌雄同体現象とエストロジェン依存性性的二型 (Noriega と Hayes、2002) を引き起こす。アフリカリードフロッグ (*Hyperolius argus*; Hayes、1998a、Hayes と Menendez、1999) のエストロジェン依存性体色変化を引き起こす有害物質は、雌ラットの子宮肥大応答を引き起こす有害物質と驚くほどの類似性があり、ER 配列の違いにもかかわらず ER 機能の高い相同性を示している。

対照的に、MXC のエストロジェン様活性は、動物界に普遍的ではないようである。MXC を代謝活性化出来ない下等脊椎動物では、MXC がエストロジェン様活性をもたないだろうからである。MXC の水酸化は、エストロジェン様活性の発現のためにも、MXC の排泄のためにも必要である。すなわち、MXC を代謝活性化できないような動物種は、この農薬 MXC を DDT と同程度まで生物濃縮する傾向がある。雄ナマズを MXC と BNF のいずれか又は両方で前処理すると、BNF ではなく MXC の前処理が MXC 生物変換速度を大きく低下させた。MXC と BNF の両方で前処理した後に MXC 処理すると、血清ビテロジェニン濃度が大きく誘導されたが、MXC 単独処理ではビテロジェニン上昇は認められなかった。このことから、ナマズにおいてはエストロジェン様活性代謝物の産生能力が減弱しているにもかかわらず、MXC がエストロジェン様活性を引き起こすことが強く示された (Schlenk ら、1998)。ファットヘッドミノー (*Pimephales promelas*) 成熟個体を 21 日間 MXC 曝露した短期繁殖試験において、MXC は、雄雌いずれにおいても一種類または複数のステロイド (テストステロン、11-ケトテストステロン、 E_2) の血漿中濃度を減少させ、雄の血漿中ビテロジェニンを有意に誘導した (Ankley ら、2001)。ビテロジェニンを誘導したのと同濃度 (3.56 $\mu\text{g/L}$) においては、繁殖力の有意な低下も認められた。シープスヘッドミノー (*Cyprinodon variegates*) 雄成熟魚を 42 日間 *p*-ノニルフェノール、MXC、エンドサルファン曝露すると、エンドサル

ファン以外のすべての群において曝露開始の5日以内に、肝臓ピテロジェニン mRNA と血漿中ピテロジェニン蛋白質濃度の用量相関的高値が認められた(Hemmer ら、2001)。両生類の卵核胞の分解は、細胞表面のヒドロキシプロジェステロン受容体の活性化に依存する。MXC 代謝物である HPTE ではなく、MXC そのものが、この両生類の卵核胞の分解を変化させるという事実は、この影響が ER を介在しないことを示している。3.8 項で述べたように、様々な外因性化学物質がステロイドによる遺伝子調節作用だけでなく非遺伝子的ステロイド作用をも妨害し得ることが最近の調査研究から示されている(Thomas、1999)。エストロジェン様物質であるキーボンや *o,p'*-DDT が低濃度(30~40 ppb に相当する 100 nM)の *in vitro* でアトランティック・クローカー卵母細胞のプロジェステロン誘導性有糸分裂成熟を阻害するという発見によって、この新型内分泌攪乱の科学的根拠が初めて提示された(Ghosh と Thomas、1995)。次いで、MXC 曝露したアフリカツメガエルにおいて、エストロジェン様物質による卵母細胞成熟における攪乱が証明された(Pickford と Morris、1999)。更に、プロゲステゲンによるアトランティック・クローカーの精子運動性亢進作用を、キーボンが部分的に遮断することが示された(Thomas ら、1998)。*o,p'*-DDT やノニルフェノールのようなエストロジェン様化学物質は、ラット胃筋肉細胞や croaker 精巣アンドロジェン産生に対して速やかな(アゴニスト的)エストロジェン様活性をもつことも示された(Ruehlmann ら、1998、Loomis と Thomas、2000)。エストロジェン様化学物質が受容体を介在する仕組みによって非遺伝子的ステロイド作用を攪乱する直接的証拠も、近年得られた(Thomas ら、1999)。これらの化学物質が、魚類の生殖細胞において非遺伝子的ステロイド作用を攪乱するだけでなく、魚類卵母細胞や精子に存在する膜結合 PR 及び魚類精巣に存在する膜結合 ER と結合することが、拮抗試験から示されている(Das と Thomas、1999、Thomas ら、1998、Loomis と Thomas、2000)。

遺伝的雄型のコイ (*Cyprinus carpio*) 群を 4-*t*-ノニルフェノールに曝露しても、胚から幼魚期の3日間においては精原細胞の分化や増殖に影響が認められなかった。だが、性分化前に開始し、性分化中を通して実施した長期曝露では、きれいな水に戻しても消失しない持続性の輸卵管形成阻害を誘導した。この時期(孵化後 24~51 日)の曝露は、精原細胞数も低下させた(Gimeno ら、1997)。14 日間、500 µg/L の BPA に曝露した雄ニジマスのピテロジェニン濃度観察では、低用量曝露ではピテロジェニン濃度は一定もしくは低下した。だが、感受性個体と非感受性個体の比を調べたところ、70 µg/L ほどの低濃度で有効であった。50 µg/L 曝露での平均肝臓中濃度は、4.36 µg/g であった(Lindholst ら、2000)。

PCBs 44 種、水酸化 PCBs 9 種、アラクロル 8 種類についてミドリアノール(トカゲ) (*Anolis carolinensis*) クローン ER、再クローン化ニジマス ER、グルタチオン S-トランスフェラーゼ蛋白質に連結したヒト ER に対する総合比較的な結合試験では、わずか 3 種類の PCBs

(104、184、188) が E_2 と強く拮抗することが判った。爬虫類とヒトでの測定値は、ニジマス受容体における測定値よりも、相互に類似性が高かった。モノオルト PCB 中 5 種類 (58、60、68、70、74) 及びジオルト PCB 18 種中 9 種 (18、44、49、99、101、112、128、138、153) がニジマス ER に弱く結合し、3 種類 (41、47、115) が中程度の結合力を示した。13 種類のトリオルト PCBs は、同様にニジマス ER にのみ結合した。このデータから示唆されるのは、ステロイド受容体の対リガンド相対結合力には脊椎動物種間で顕著な違いが存在するということである。

3.12.4 ステロイドホルモン生合成阻害剤

3.12.4.1 概要. 菌の細胞膜合成と生育を阻害する殺菌剤がいくつか開発されている。これらは、ステロイド生合成経路におけるチトクローム P450 酵素の特異的阻害、特にラノステロールの 14 脱メチル化の阻害によるものである。ステロイド生合成経路の生物間保存性は高く、これらの殺菌剤は、哺乳類のステロイド生合成をも阻害する。ステロイド生合成にはいくつかの CYP450 酵素が存在するが、これらの個々に対する結合力は化学物質によって異なる。しかし、比較的高濃度では CYP450 一般に対する非特異的阻害剤となる。したがって、影響は生殖系にとどまらず、哺乳類の副腎や肝臓、無脊椎動物のエクジステロイドにまで及ぶ (Schumeryer と Nieschlag, 1984, Pepper ら, 1990, Williams ら, 2000)。

3.12.4.2 ケトコナゾール. 抗菌性イミダゾール誘導体であるケトコナゾールは、齧歯動物やヒトのチトクローム P450 モノオキシゲナーゼを阻害する。コレステロールの側鎖切断酵素、副腎の 11 ヒドロキシラーゼ、ラットやヒトの精巣の 17 ヒドロキシラーゼや C17-20 リアーゼなどが阻害される (Schumeryer と Nieschlag, 1984, Pepper ら, 1990)。例えば、*in vitro* でのヒト精巣モノオキシゲナーゼ活性は、3.1 μM のケトコナゾールで 50% 低値となる。臨床的抗アンドロジェン剤であるケトコナゾールの副作用としては、男性の女性化乳房があげられる。しかし、ステロイド生合成に対する影響は、精巣選択的ではなく、卵巣と甲状腺影響も報告されている。ライディヒ細胞機能に対する影響は、ヒト及び齧歯動物の性成熟ライディヒ細胞において認められている。性成熟齧歯動物にケトコナゾールを投与した場合、単回投与によってすらも生殖に劇的变化を引き起こす可能性がある (Bhasi ら, 1986, Hechman ら, 1992, Waller ら, 1990)。卵巣や子宮でのステロイド応答影響が妊娠維持に対して妨害的であるのに対し、テストステロン生産量減少による雄生殖腺発達影響は、顕著でない。妊娠母動物をケトコナゾールで処理すると、卵巣プロジェステロン産生抑制を原因とする妊娠維持能に影響を及ぼす可能性が更に高くなる。卵巣プロジェステロン産生抑制は、兎動物への影響観察が不可能となるほどの、流産や産児数減少にもつながる可能性がある (Gray ら, 1999a)。

3.12.4.3 アロマトラーゼ阻害剤. アロマトラーゼのチトクローム P-450 は、炭素数 19 個のアンドロジェンを炭素数 18 個の含ベンゼン環エストロジェンに変換する。アロマトラーゼを阻害する多くの薬物が開発され、閉経後の乳がんの処方箋として使用されてきた (Brodie ら、1999)。この P-450 酵素 (複数存在) は、広範な組織及び多くの動物種において高度に保存されているが、他の P-450 遺伝子との全体的相同性は、わずか約 30% である。すなわち、この酵素は、全スーパーファミリー内部において独立した遺伝子ファミリーに属すると考えられる。アロマトラーゼが他の P450 酵素との配列相同性に欠けている結果、アロマトラーゼ阻害剤はケトコナゾールのような薬物よりも大きな特異性を示す。アロマトラーゼ阻害活性を試験するために、酵母によるスクリーンアッセイが提案されている (Mak ら、1999)。トリブチルスズに曝露した軟体動物でのインボセックスの誘導は、アロマトラーゼの阻害、それに伴うエストロジェン欠乏とアンドロジェン濃度上昇に原因が求められてきた。いくつかの殺菌剤は、哺乳類のアロマトラーゼ活性を阻害し、雄雌双方に対する不能を引き起こす。フェナリモール処理は、雄の交尾行動を阻害するが、これは脳中アンドロジェンのエストロジェンへの変換阻害が原因と推察される (Hirsch ら、1987、Gray ら、1998)。フェナリモール処理は、分娩も阻害するが、これは出産開始時期近くで E_2 が決定的役割をもつためである。フェナリモールは、雄ラットのアンドロジェン生産や妊娠期のプロジェステロン合成を阻害しないので、哺乳類に対するフェナリモールの影響はケトコナゾールと大きく異なる。アロマトラーゼ阻害剤が爬虫類の雌性腺の性決定を阻害するのに対し、フェナリモールは無脊椎動物のエクジステロイド合成を阻害する (Williams ら、2000)。

フェナリモールは Wistar ラット雄妊孕能の用量相関的低下をもたらしたが、出産や授乳を含む全生涯を通してフェナリモール処理した母獣では解剖学的に正常な妊娠が認められた (Hirsch ら、1987)。交尾時において膈中精子が存在しないことで不能と判別した観察に基づくと、雄性行動の欠如が不能の原因として判明した。次いで Gray と Ostby (1998) は、フェナリモールを離乳期から性成熟期までの毎日投与した際に、ラット雄性行動の用量相関的低下が起こることを報告した。この結果から示唆されることは、フェナリモールは、主に脳中でテストステロンから E_2 への変換を阻害する機構によって雄性行動を低下させていることである。この主幹的影響を支持するデータとして Hirsch ら (1987) は、曝露した母動物由来の児動物脳中ではフェナリモール濃度が 3 ~ 4 倍高く、半減期も 4 倍長いこと報告している。

雌チヌークサーモン (*O. tshawytscha*) の保存遺伝系統のすべてに対し、性腺未分化期に非ステロイド型アロマトラーゼ阻害剤ファドラゾール (CGS 16949A) を 2 時間処理すると、遺伝子的雌を雄に発達させてしまう。結果として生じた雄は、遺伝子的雄と大きさも機能

も同じ精巣をもち、しかも子孫を残すことが出来る。ファドラゾ - ルを性成熟雌ギンザケに投与した場合、血漿中 $17\beta, 20\text{-P}$ の上昇と連動した $17\beta\text{-E}_2$ の低下が認められた。10 mg/kg のファドラゾ - ル曝露した魚類の 67% が、注射 10 日後に排卵し、卵母細胞形成とその後の排卵とが停止しないことを示した。対照群は 0% であった (Afonso ら、1999)。性成熟期間中の雄ギンザケにファドラゾ - ルを投与すると、脳での E_2 分泌阻害、血漿中 $17\beta, 20\text{-P}$ の上昇を引き起こした。また、被験群雄は、対照群雄よりも早期に排精を開始した。更に、注射 4 日以内の被験群魚では、対照群よりも高濃度のテストステロンと 11-ケトテストステロンが維持された (Afonso ら、2000)。

3.12.4.4 5 α -レダクターゼ阻害剤. 5α レダクターゼは、テストステロンを更に強力な AR アゴニストである DHT に変換する酵素である。DHT は、主に外性器を雄性化するのに働く。フィナステライドは、 5α レダクターゼ阻害剤であり、アンドロジェン依存性前立腺がんに対する臨床薬として、更に一般的には成人男子禿頭の処方剤として使用される。フィナステロイドは環境汚染物質ではないが、雄生殖系発達において DHT がこれほどまでに重要な役割を果たしていること、雄生殖系、特に前立腺と外性器の発達阻害が複雑な過程であることを示す典型的な例である。妊娠 6、20 日目ラットへの経口投与 (Imperato-McGinley ら、1992) では、0.003 mg/kg/day ほどの低用量で投与後の AGD 値が低下し、0.1 mg/kg/day で尿道下裂の発生開始が認められ、100 mg/kg/day で全児動物に影響が認められた。25、50 mg/kg/day で前立腺容積の有意な低値が認められ、これ以上の高用量群で更なる低値は認められなかった。フィナステライドは、フルタミドによる AR 遮断とは異なり、用量を増加していても前立腺分化を完全に阻止したり外性器を完全に雌性化させたりすることはない。これらの結果は、AR の段階においてテストステロンが DHT をある程度代償し得ることを示唆している。ウォルフ管の分化は、DHT の阻害によって影響を受けず、テストステロン依存性を強く示しているが、精囊の発達は妨げられた。AR 遮断剤は、 5α レダクターゼ活性阻害よりも効果的に精巣下降を阻害する (Spencer ら、1991)。内間充組織板は、生殖結節の基底部から先端までの泌尿生殖洞の動きを補助する上で不可欠である。フィナステライドによる尿道下裂の機構として、この内間充組織板の形成阻害が示唆されている (Clark ら、1993)。アカゲザル母動物に対し、妊娠 20~100 日に連続してフィナステライドを経口投与 (2 mg/kg/day) すると、雄胎児に外性器異常が起きることが示唆されるが、雌胎児の外性器異常は認められなかった。同じ期間での 800 ng の曝露では、雄雌いずれの胎児にも外性器異常は認められなかった (Prahallada ら、1997)。

3.12.4.5 フタル酸エステル. フタル酸エステルは、多くの工業的行程において可塑剤として使用される一連の広範な化学物質群である。これから述べるように、いくつかのフタル酸エステル (ジブチルエステル、ジエチルヘキシルエステルなど) の発達影響は、胎

児の精巣でのテストステロン生合成能力の変化を經由して現れる。成人に対するフタル酸エステルは生殖毒性がよく報告されている。例えば、DEHPが未成熟及び成熟後のラットの精巣を標的としていることが知られている(GrayとButterworth, 1980, Sjobergら, 1985)。また生化学的相互作用の厳密な経路は不明であるが、精巣毒性の作用機構は、精巣中の細胞であるセルトリ細胞を標的にする代謝物(モノエステル、MEHP)を經由する(HeindellとChapin, 1989, HeindellとPowell, 1992)。エストロゲンとアンドロゲン双方の作用に対する複合的影響も含め、フタル酸エステルの内分泌影響について関心が集まっている。Zacharewskiら(1998)は、拮抗リガンド結合試験においてDBP、BBP、DHPがER結合においてE₂に弱く拮抗することを報告した。Gal₄-HEGOとGal₄調節下ルシフェラーゼレポーター遺伝子である17m5-G-Lucを一過的形質導入されたMCF-7細胞を用いて遺伝子発現試験を行ったところ、10 μMのDBP、BBP、DHPは、それぞれ36、42、20%の相対活性を示した(10 nM E₂の応答を100%とする)。これらのうちBBPのみが、Gal₄-HEGOと17m5-G-Lucコンストラクトを常時形質導入されたHeLa細胞でルシフェラーゼ活性を誘導し(32%)、選択培地上E₂依存性組換え酵母株PL3に対しERを介在した最低生育能を付与した。他の5種のフタル酸エステルについては、どの*in vitro*試験においても有意な応答は認められなかった。*in vivo*では、8種のフタル酸エステルを20、200、2,000 mg/kg経口投与した卵巣摘除未成熟SDラットにおいて、子宮湿重量の有意な高値は認められず、卵巣摘除成熟個体においても膈上皮細胞角質化に影響を与えなかった。これらの結果が示すこととして、特定のフタル酸エステル(DBP、BBP、DHPなど)のみがいくつかの*in vitro*試験において高濃度でER経由の微弱な影響を与えたが、子宮肥大試験や膈角質化試験から得られる結果においては8種のフタル酸エステルはいずれも*in vivo*エストロゲン影響を示さなかった。これらの結果は、*in vitro*単独の実験結果から化学物質の潜在的危険を評価することに対し注意を喚起している。

更に重要なことには、あるフタル酸エステル(DEHP、DBP、BBP、フタル酸ジイソブチルを含み、DEP、DMP、DOTPは除く)は、雄胎児において抗アンドロゲン応答を誘導する。例えば、性分化の進行期にDBPまたはDEHP曝露した雄ラット児動物では、明らかに受容体を介在しないメカニズムによって、アンドロゲン依存性組織に奇形を誘発する(Grayら、1999a、2000)。深刻にも、このような影響のクリティカル・ウインドウは、古くから定義されている「器官形成期」のクリティカル・ウインドウの枠外なので、標準的な発達毒性学研究的範囲から外れてしまっている(Emaら、1992、1993、1994、Tylら、1988、Narotskyら、1995)。

DBPのラット複数世代実験では、F₁世代ではF₀世代と比較して同腹児の数・体重の低値、精子数の50%低値を伴う顕著な生殖影響が認められた。また、これら雄F₁動物の性生殖系

では最高試験用量（～600 mg/kg/day）において、これと同程度の用量を用いた従来の標準的な発達毒性学研究では観察されなかったような多くの奇形が認められた(Wine ら、1997)。Mylchreest ら（1998）は、F₀世代・F₁世代間の曝露期間における決定的な違いを調査し、妊娠・授乳動物を曝露しその児動物を検査した。雄児動物において、包皮分離日遅延と AGD 低値に加え、精巣上体奇形の高頻度発生と精子数減少が認められた。複数世代実験における生殖系奇形の全ては、短期間曝露処理においても再現され、雌児動物には影響を与えなかった。だが、もう一つの複数世代実験においては、DBP 曝露（250 mg/kg/day、試験中最低用量）が雄雌両方の F₁ ラットに奇形を誘発した(Gray ら、1999a)。Mylchreest ら(2000) は、曝露ウインドウを妊娠後期（妊娠 12～21 日目）のみに限定することによっても、先に発見したのと本質的に同一の影響を再現させ、雄児動物における乳頭の存在についても報告した。したがって、DBP は、DBP のその他の毒性の LOAEL あるいは NOAEL よりもはるかに小さい、LOAEL 100 mg/kg/day にて古典的 AR アゴニストが生殖系発達に及ぼす全影響を引き起こした。Mylchreest ら（1999）は、DBP の影響を AR アゴニストのフルタミドと比較し影響の様式に多くの類似性を示したが、精巣上体が DBP 奇形の主要標的であるのに対し前立腺がフルタミドの主要標的であるなど、組織感受性の多くの違いについても示した。DBP もフタル酸モノブチルも AR との直接的相互作用を示さなかった。

これらの影響が AR 拮抗性を介在しないということは、DBP、DEHP 及びこれらのモノエステル代謝物が哺乳類（ラットまたはヒト）AR に結合しないという発見によって支持されている（Mylchreest ら、1999、Parks ら、2000）。雄胎児における厳密な細胞的あるいは分子的分子学的フタル酸エステル作用部位は不明であるが、精巣が主要な標的のようである（Mylchreest ら、1998、1999、Gray ら、1999a、Parks ら、2000）。母動物を DEHP と DBP で処理すると胎児テストステロン合成（Parks ら、2000）と胎児アンドロジェン濃度（Mylchreest ら、1999、Parks ら、2000）が劇的に減少し、ライディヒ細胞の形態と機能が確実に変化していた。発達期のフタル酸エステル毒性に関与している AR が発情期雄の精巣毒性に関与している AR と類似しているという事実は、初期の分子的事象における共通点のいくつか、これら毒性の原因となっている可能性を示唆する。フタル酸エステル毒性の作用メカニズムは、脊椎動物において広く存在しているようである。フタル酸エステルの発生生殖毒性は、モルモット、フェレット（Lake ら、1976）、ウサギ（DBP、Veeramachaneni、2000）、ハムスター（MEHP など）、いくつかの系統のラット、PPAR γ -ノックアウトマウスを含むいくつかの系統のマウスにおいて認められている。PPAR γ -ノックアウトマウスが DEHP 処理後に精巣と腎臓に病変を示すという事実は、この受容体 PPAR γ が MEHP の肝毒性に明らかに関与しているが、これ以外の毒性発現に必要なことを示している（Ward ら、1998）。

ある魚類複数世代実験では、メダカを環境中濃度に近い DBP に曝露している。この試験で

は、エストロゲン様応答の誘導は起きなかったが、F₀世代ではなく、F₁世代にのみ性腺機能の異常が検出された (Patyna ら、1999)。DBP が発達中のカエルのアンドロゲン依存性組織に変化を及ぼすことも示されている。

3.12.5 AhR アゴニスト : TCDD、PCBs、PCDFs

本項の EDCs は、魚類や野生生物においてよく確認されている多くの生殖影響や集団影響の原因となっている (Peterson ら、1993)。このような確認済みの影響は、内分泌攪乱化学物質説の根拠とされ、TCDD 及び構造が類似した合成ハロゲン炭化水素によって引き起こされると考えられており、作用メカニズムも内分泌攪乱化学物質の仮説に関連するので、作用メカニズムを理解することは重要である (Birnbaum、1994)。TCDD が引き起こす影響は、信号伝達に対する影響に分類され得るが、ステロイドホルモンの受容体を介在する狭義の影響には該当しない。結論として、全てではないにしろ大抵の TCDD 影響は、Poland と Glover (1977) が最初に発見した原形質中の受容体蛋白質である AhR (Okey ら、1994、Hankinson、1995) を介在するとした仮説によるものが科学的根拠によって支持されている。AhR 信号伝達経路は、TCDD が細胞内に拡散することによって開始され、細胞内で TCDD が原形質 AhR 蛋白質複合体と強固に結合し、その複合体にはヒートショックプロテイン 90 (Hsp90) 及びイムノフィリン関連である 38-kDa も組み込まれる (Ma と Whitlock、1997、Carver と Bradfield、1997)。リガンドが結合すると AhR が活性化され、AhR 結合蛋白質の解離が促進される。次いで、リガンド - 受容体複合体は核中に移行し、核中で AhR 核内トランスロケータ (ARNT ; Hankinson、1995、Probst ら、1993) と二量体を形成する。このヘテロダイマーは DNA 上のダイオキシン応答因子である共通配列 GCGTG を認識して結合することができる (Denison ら、1989、Dong ら、1996)。この作用によって、チトクローム P-450 (CYP1A1、CYP1A2; Quattrochi と Tukey、1989)、NAD(P)H: キノンレダクターゼ (Favreau と Pickertt、1991)、クラス 3 アルデヒドデヒドロゲナーゼ (Asman ら、1993)、グルタチオン S - トランスフェラーゼ (Paulson ら、1990) などの標的遺伝子の転写が促進または抑制される (Nebert ら、1993、Schmidt と Bradfield、1996)。

ARNT 蛋白質は、HIF-1 と結合し、低酸素ストレスに応答して遺伝子を活性化させる (Guillemin と Krasnow、1997、Semenza、1994、Wenger と Gassmann、1997)。調節を受けるとしては、赤血球産生にかかわる Epo (Semenza、1994)、血管産生にかかわる VEGF (Forsythe ら、1996、Goldberg と Schneider、1994、Maxwell ら、1997、Shweiki ら 1992)、グルコース輸送にかかわる GLUT-1 (Semenza、1994、Wenger と Gassmann、1997) がある。AhR、ARNT、HIF-1 は、basic-helix-loop-helix/PAS 蛋白質ファミリーに属し、細菌・古細菌類、藻類、植物、菌類、動物の 5 界すべての代表的生物において見出されている (Hahn、

1998)。ARNT-HIF ヘテロダイマーと同様の低酸素応答に加え、PAS 蛋白質は、発達と分化 (Nambu ら、1991、Isaac と Andrew、1996)、概日時計の調節 (Huang ら、1995、King ら、1997)、ステロイド受容体シグナリング (Yao ら、1993) に関与する。ARNT 欠損マウスが妊娠 10.5 日目以降生存できないという事実は、この蛋白質の重要性について更に科学的根拠を与えている (Kozak ら、1997、Maltepe ら 1997)。TCDD 曝露とそれに続く AhR を介在した ARNT の動員が、ARNT に依存する他の信号伝達経路を阻害している可能性がある (Chan ら、1999)。AhR 受容体アゴニストは、複数の信号伝達経路と相互作用する能力、様々な遺伝子産物を誘導や抑制する能力を通して、様々な動物の多くのライフステージにおいて広範な生物影響を引き起こすことができる。これら応答のいくつかは、内分泌介在影響の古典的定義にうまく該当しない。本アセスメントでは、AhR への結合に関連するような生物影響が内分泌介在作用メカニズムを導き出すとは考察していない。そうではなく、本章末にあるクライテリア一覧表を用いることによって、AhR 介在影響を本総説に包括すべきかどうかを判断した。このような情報は、野生生物研究からは得られ難いので、ヒトよりもむしろ野生生物での知見を包括すべきかどうかの判断に大きな余地を残した。

TCDD 0、0.05、0.20、0.80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ に母動物妊娠 15 日目に単回子宮内曝露した雄ラットは、性成熟遅延や生殖器官中の変化とともに生殖能力低下を示した (Gray ら、1997a)。0.80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群のみにおいて新生児の成長と生存率が低下し、開眼が早期化し (すべての群)、性成熟が遅れた (0.02、0.80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群)。被験群の雄児動物では、前立腺腹葉重量と精嚢重量の一過的低値、精嚢上体中精子貯蔵量と陰茎亀頭長の不可逆的低値が認められた。射精精子数は、尾部、精嚢上体頭部・胴部、精嚢中精子数よりも大幅に減少した (0.80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群で 45%、0.20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群で 25%、0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群で 25%)。被験群の雌児動物では、0.80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群で膣開口の遅延が認められた。残留性膣系が TCDD 0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群で個体数の 27%、0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群で 98% に存在した (Gray ら、1997b)。これらの影響は、性成熟前の子宮機能の異常によるものではなさそうであった。すなわち、1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ に曝露した母動物から生まれた 21 日齢及び 28 日齢の児動物では、血清中 E_2 濃度も子宮内 E_2 産生量も減少しなかった。TCDD 処理ラットで生殖結節の不完全開裂が認められ (0.20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群で 10%、0.80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群で 60%)、これと同用量で尿道口長の高値、尿道口から生殖結節先端までの距離の高値、尿道口から膣口までの距離の低値も認められた。0.80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群では、受胎率は正常であったが、妊娠に至るまでの所要日数が遅れた。20 月齢で剖検すると TCDD 被験群の雌は、生殖系に病理組織学的な変化をきたしていた。すなわち、TCDD は、エストロゲンや抗アンドロゲンに類似した機構及び異なった機構の両方によって生殖系発達に影響している。胎児中 TCDD は、8-13 ppt 程の低濃度でも生殖系の変化と相関性をもつ (Gray ら、1995a、1995b、1997a、1997b、Hurst ら、1998、2000a、200b)。

TCDD 2 µg/kg に妊娠 11.5 日目に単回曝露した後、対照群及び被験群 F₁ 雌は対照群雄と問題なく交尾したが、被験群の 20% は妊娠しなかった (Wolf ら、1999)。また、妊娠した被験群雌 F₁ の 38% がほぼ同時期に死亡し、妊娠動物中の着床数と生存児数も減少した。TCDD 曝露 P₀ 母動物由来の F₂ においては、離乳後生存率が大きく減少した (対照区の 78% に対して 15%)。TCDD 子宮内曝露した F₁ の児動物に相当する F₂ 雌ハムスターもまた外泌尿器系の奇形を示し、ほとんどの雌に生殖結節の開裂が認められた。すなわち、F₁ が妊娠及び哺育期において間接的にしか TCDD 曝露を受けていないにもかかわらず、TCDD の有害影響は二世 (F₁ と F₂) に渡って持続した。

神経系発達における変化は、実験動物において TCDD 出産前曝露に認められるもう一つの健康影響である。Mably ら (1992) は、母動物の曝露後に雄児動物の性行動について脱雄性化及び雌性化現象を報告した。性行動試験時の日齢では、AhR 依存性肝臓 CYP450 濃度及び EROD 活性は対照群と差がなかった。このことから、性行動に対する影響は、発達期曝露の長期持続的影響及び性ステロイド器官形成作用の攪乱によるものであることが示された。このモデルにおいて、脳の各部位における ER 濃度が測定された (Bjerke ら、1994)。AhR は発達期の神経系に存在するが、正常な発達における神経系 AhR の役割は不明であり、脳の発達における AhR の重要性についてはまだ直接的な科学的根拠が得られていない。

3.12.6 *p,p'*-DDE によって引き起こされる卵生脊椎動物の卵殻薄化のメカニズム

北米自然環境に高濃度の DDT が存在していた 1960 年代から 1970 年代にかけ、感受性の高い数種の鳥類数が減少し、原因は、卵殻異常薄化による抱卵失敗によるものであった (Cooke、1973)。米国で DDT 使用が禁止されて環境中濃度が減少して以来、これら (ミミヒメウなど) 鳥種の多くの個体数が劇的に復活した (Ludwig、1994)。このような感受性の高い鳥類での *o,p'*-DDT 及びその安定代謝物 *p,p'*-DDE による卵殻薄化影響は、よく知られている。ペリカン、ミミヒメウ、ヨーロッパヒメウ、シロカツオドリなど、通常白色の *valerite* な外殻をもつ卵を生む鳥類は、DDT 曝露後、外殻が極薄の卵や外殻が完全に欠損した卵を産む場合がある (Gould、1972、Cooke ら、1976)。このような種類の鳥においては、卵殻形成過程がその終結に向けて DDE からの負荷を最も受ける。オオセグロカモメ (Cooke、1979a、1979b) やゴイサギ (Cooke ら、1976) のような鳥類では、DDE 曝露後、すべての卵殻が全般的に薄くなる。DDE 処理後の卵殻ミネラル組成変動については、めったに調査されることがなかった (Longcore ら、1971)。

DDE 誘導性の卵殻薄化 (鳥類種によって差がある場合がある) については、いくつかの可能性が高いメカニズムが提唱されている (Cooke、1973、1979a、1979b)。しかし、ニワト

り、ニホンウズラなど一般的な実験鳥類の多くは、DDE 誘導性の卵殻薄化に対する感受性がない (Scott ら、1975)。卵殻薄化のメカニズムを完全に予想するまでには至っていないが、この分野での調査研究は、主に感受性の高い鳥類種に対象が絞られている (Lundholm、1980、1982、1984a、1984b、1984c、1985、1988、1993、1994、Lundholm と Mathson、1983、Lundholm、1987、Lundholm と Bartonek、1991、1992)。示唆されるメカニズムは次の3つである

- 1) カルシウムの吸収・分泌・輸送のいずれかの変化によって、血液から卵殻腺へのカルシウム供給が制限 (Peakall ら、1975、Haynes と Murad、1985、Taylor と Dacke、1984、Hagmann、1982)
- 2) 炭酸脱水酵素の阻害のために卵殻形成に用いられる炭酸が減少 (Peakall ら、1970a、1970b、Pocker ら、1971、Cooke、1973、Miller ら、1976、Eastin と Spaziani、1978)
- 3) ステロイドホルモンの受容体または機能の変化 (Lundholm、1985、1988)

DDE 誘導性の卵殻薄化についての最新仮説では、卵腺粘膜による PGs の阻害が関与する。PGs は、鳥類の生殖を調節する上で重要な役割を果たしている (Lundholm と Bartonek、1992)。アヒル卵殻腺粘膜では *in vitro* 実験や *in vivo* 曝露においても *p,p'*-DDE によって PG 生合成が阻害される (Lundholm と Bartonek、1992)。PG 生合成は、*in vitro* 実験において *p,p'*-DDT や *o,p'*-DDE によっては阻害されないが、これら同族体が卵殻薄化を引き起こす潜在的危険性は拭えない。他にはインドメタシン処理が卵殻薄化を引き起こす。DDE 処理されたアヒル卵殻腺粘膜では、フロセミドに非感受性で PG によって促進をされる炭酸イオン輸送系に阻害が起きるといふ仮説がなされているが、これを支持する実験報告例はその後ない (Lundholm、1994)。

DDE 誘導性の卵殻薄化のメカニズムは、極めて複雑であることが示唆されている。卵殻薄化は、影響を受けた卵でのカルシウム量の減少と関係している。マガモでの DDE 影響は、卵殻腺粘膜から内腔液へのカルシウム輸送量の減少と関係がある。鳥類の DDE 処理は、カルシウム輸送の変化に関連する様々な生化学的変化と相関性を示している。これら生化学的エンドポイントの多くが相互に相関性をもつので、どのエンドポイントが DDE の直接的な標的であるのか、どのエンドポイントが単にその付随影響であるのかを判断することは難しい。DDE 誘導性の卵殻薄化に対する感受性が鳥類種間で異なるという事実は、状況を複雑にしている。すなわち、異なった程度の卵殻欠損に科学的根拠が得られているように、異なった鳥類での異なったメカニズムが卵殻薄化を引き起こしているのかもしれない。

DDE 及び関連化学物質によって誘導される卵殻薄化は、野生生物での内分泌攪乱として最も話題にされる例であるが、作用メカニズムについて複数の仮説が存在する現状では、こ

のような卵殻薄化が間違いなく内分泌攪乱の結果であると、はっきり断言することは出来ない。内分泌攪乱との関連を示す最も強い科学的根拠は、粘膜腺プロスタグランジン生合成での影響発見から提示される。

3.13 発がんにおける EDC 作用機構 - アトラジンの影響

トリアジン系農薬の一つであるアトラジンの内分泌攪乱影響については、400 ppm のアトラジンを 104 週間に渡って混餌投与された雌 SD ラット雌の慢性生物毒性試験において乳がん発生率の高値が認められた以降、深く懸念されるようになった。乳がんは、対照群雌にも出現したが、被験群雌では早期に出現した。乳がん以外、この被験群の雌 SD ラットには影響は認められなかった。また雄 SD ラットや雌 Fischer 344 ラットには影響が認められなかった (Stevens ら、1994、Thakur ら、1998)。

初発性乳がんの発見がアトラジンのエストロジェン性を調べるきっかけとなったが、アトラジンはラット子宮 ER 拮抗結合試験 (E_2 との平衡状態下) において陰性であった。原形質をトレーサー共存下での保温に先立ち 25 に保温すると弱い拮抗が認められた (Tennant ら、1994a)。他の研究では、やや矛盾する結果も得られている。成熟 Fischer ラットを 120 mg/kg のアトラジンに 7 日間連続曝露すると、正常性周期をもつ雌個体数が被験群で低値となり、発情間期日数が被験群で有意な高値となった。曝露後の最初の一週間、受胎率は雌で低値となった。しかし受精した個体のみを対象とした妊娠率は影響を受けなかった (Simic ら、1994)。だが、卵巣摘除成熟 SD ラットに最大 300 mg/kg のアトラジンを 3 日間連続して強制経口投与すると、子宮重量の高値も子宮プロジェステロン濃度の高値も認められず、エストロジェン様活性がないことが示唆された。300 mg/kg のアトラジン経口投与と同時に E_2 (2 μ g/kg、皮下注射) と与えると、子宮肥大応答に対する弱い阻害 (~25%) が認められた (Tennant ら、1994b)。似たようなもう一件の研究では、雌未成熟 SD ラットに 0、50、150、300 mg/kg のアトラジンを 3 日間連続して強制経口投与が行われた。では、子宮重増加が認められないものの子宮 PR 結合活性とペルオキシダーゼ活性が低下した。しかし、 E_2 を同時投与すると、この PR 結合活性とペルオキシダーゼ活性が低下も含め、子宮におけるアトラジンの抗エストロジェン影響は消失した (Connor ら、1996)。同じ研究において、アトラジンは、 E_2 共存条件においても MCF-7 細胞増殖に影響を与えず、Gal4 に制御されるヒト ER キメラを形質導入した MCF-7 における E_2 誘導性ルシフェラーゼ活性に対してもアゴニストあるいはアンタゴニスト作用を示さなかった。

生殖機能に対する影響を更に評価するために、いずれも規則的 4 日性周期をもつ個体として選抜された雌 LE ラットと雌 SD ラットに 0、75、150、300 mg/kg/day のアトラジンを 21

日間強制経口投与した。アトラジンは各ラット系統において規則的 4 日性周期を攪乱した。LE ラットに対してはすべての用量が有効であったのに対し、この影響を SD ラットで発現させるためには高用量 (150 mg/kg/day) を長期間投与する必要があった。膣での発情間期の延長は、一種の疑妊娠状態を示すような、血清プロゲステロン濃度の高値、E₂ 濃度の低値と関連があった。本実験では最低被験用量での性周期延長がある程度示されるにもかかわらず、報告者らは本ホルモン作用が乳がん発達を誘導するとは考察していない (Cooper ら、1996)。

成熟以前での乳がんの発生に系統間差 (高感受性の SD ラットに対し低感受性の Fischer 344 ラット) が認められることについて、正常な生殖系の加齢の様式に系統間差があることが原因としてあげられた (Eldridge ら、1994、Stevens ら、1994、サマリーとしては Chapin ら、1996)。アドレナリン作動性視床下部ニューロンは、下垂体からの GnRH 分泌を調節するが、雌 SD ラットの繁殖周期は、おそらくこのニューロンの感受性低下のために、一年齢も経過しないうちに低下を開始する。この感受性低下は、FSH と LH 分泌を低下させ、究極的には排卵を遅らせる。排卵の遅延は、エストロゲン曝露の延長につながり、不可逆的腔角質化などの顕著な影響を引き起こす。対照的に、Fischer 344 ラットのアドレナリン作動性ニューロンはエストロゲン感受性を低下させないようであり、規則的繁殖周期は、SD ラットよりもはるかに長期に渡って維持される。Fischer 344 における生殖系加齢については、日毎 PRL 変動の制御不能、黄体活性の延長、プロゲステロン分泌濃度の上昇によることが定説化している。したがって加齢中 SD ラットの内分泌環境は、Fischer 344 ラットとは異なり、乳がん発生を引き起こしやすく、成長に伴って腫瘍突然発生率に系統間差が生ずることについての説明となっている。

中枢神経系機能と連動して、離乳児へのアトラジン曝露は、雄 (Stoker ら、2000)、雌 (Laws ら、1996、2000 b) 双方のラットの性的発達を変化させる。雄ラットでは、12.5 mg/kg/day の低用量を 23 日齢から投与開始すると、包皮分離が遅延する。50 mg/kg/day 用量群では、53 日齢で前立腺腹葉重量が減少したが、精巣重量は減少しなかった。雌ラットは、雄よりも感受性が若干低く、50 mg/kg/day 群で膣開口の遅れ、100 mg/kg/day 群で膣開口後の 15 日間に性周期の乱れが認められた。更に PC12 細胞を用いた *in vitro* 実験では、アトラジンがドーパミン (チロシンヒドロキシラーゼを經由) とノルエピネフリン (ドーパミンヒドロキシラーゼ經由) の細胞内合成を阻害し、結果としてニューロン様細胞がノルエピネフリンを分泌する能力を低下させていることが示唆された (Das ら、2000)。アトラジンがどのようにして SD ラット生殖軸の神経内分泌の加齢促進をしているかは、まだ不明である。

アトラジンは、他の脊椎動物においても内分泌影響を發揮する。排卵した雌アトランティックサーモン (*Salmo salar*) は、プライミングフェロモン (F型プロスタグランジンの一種) を尿中に分泌する。次いでこのフェロモンは雄嗅覚系に検出され、性ステロイド濃度を増加させ精子量を増加させる。雄幼魚を短期間アトラジン曝露すると、PG F_{2α} に対する嗅覚応答が低下する。類似の曝露は、排卵雌サケ尿によるプライミング作用への応答能力も低下させる。精巣に対するアトラジンの付随的影響としては、アンドロジェン分泌の変化があり、サケ魚類においては付随的作用メカニズムがあることが示唆される (Moore と Waring, 1998)。

3.14 EDC が関与する神経毒性作用機構

3.14.1 概要

金属、有機溶媒、多ハロゲン化芳香族炭化水素、天然神経毒、濫用の可能性がある医薬品や麻薬など、作業環境中で曝露する危険がある 850 種を超える化学物質について、神経毒性の証拠がある (IPCS, 2001b)。生殖内分泌系は神経内分泌系によって一次的制御を受けているので、これら化学物質は、潜在的に EDCs である。だが、神経系と内分泌系との密接な相互作用にも係らず、ホルモン作用に影響力があることが知られている化学物質についてすらも、二次的影響発現から一次的作用機構を導きだすことは難しい。内分泌攪乱化学物質が神経系に影響するメカニズムは、ほとんど知られていないが、神経機能とホルモンと相互作用には二つの違う様式を考えねばならないことが明らかとなっている。

- 1) 経時的变化につながるような、成熟した生物におけるホルモンの活性化的特性に関連した影響。
- 2) 行動機能、特に性別によって異なる行動、性に関連する行動の不可逆的变化につながるような、神経発達期におけるホルモン依存的過程での総合的な影響。

いずれの作用も、ER や AR のような特異的ホルモン受容体の関与を受けるか、もしくは、ホルモンから影響を受けることが報告されている神経伝達物質の受容体の調節下にある可能性がある。例えば、セカンドメッセンジャーに連動した膜結合性受容体の他、GABA 受容体、ムスカリン受容体、ニコチン受容体、NMDA 受容体、 α -受容体、神経ペプチド受容体が、性ホルモン作用に関与している (Mensah-Nyagen ら、1999)。

更に複雑なことには、神経伝達物質に及ぼす影響の特性、ならびにその影響が内分泌影響であるかどうかは、構造的に極めて類似した化学物質間ですら違う可能性がある。例えば、胎児や新生児の 3,4,3',4'-テトラクロロビフェニルの曝露は、前皮質ドーパミン濃度の有

意な低値、黒質ドーパミン濃度及び代謝の有意な高値を引き起こすが、2,4,2',4'-テトラクロロビフェニルの曝露は、前皮質及び尾核ドーパミン濃度の有意な低値を起こす。いずれの影響も、成人後も持続する (Seegal ら、1997)。この研究から以下のことが示唆される。脳内ドーパミン濃度の低下は、PCB 同族体によって誘導され、コリン作動性受容体の変化と協奏的な、ドーパミン合成阻害の結果である。対して、脳内ドーパミン濃度の上昇は、鍵となる発達期におけるステロイドホルモン機能変化によるものである可能性も示唆される。コプラナー同族体は、AhR との相互作用力に加え、エストロゲンからヒドロキシエストロゲンやカテコールエストロゲンへの代謝を変化させるか (Gierthy ら、1998)、ERs 発現を抑制的に調節することによって (Safe ら、1991)、エストロゲン機能をも変化させる。

PCBs のように神経伝達物質の濃度を変化させる化学物質は、神経内分泌系機能ひいては生殖に影響を及ぼすが、このような内分泌攪乱メカニズムの潜在的な重要性に言及した文献が数件のみ存在する。Aroclor 1254 曝露したアトランティック・クローカーの生殖不能は、LH 分泌の劇的な低下、LH 分泌促進的に働く神経伝達物質である 5-HT の視床下部濃度の劇的な低下に関連している (Khan と Thomas、1998)。その後の研究から、5-HT 濃度の低下は、5-HT 生合成上の律速酵素、トリプトファン・ヒドロキシダーゼの阻害によることが示された (Khan と Thomas、2001)。PCB 曝露後の 5-HT 活性の低下は、視床下部 LHRH 濃度と分泌の低下によるものであり、性腺刺激ホルモン産生細胞上の LHRH 受容体を抑制的に調節し、LHRH 刺激に対する LH 応答の低下を引き起こす。しかも、トリプトファン・ヒドロキシダーゼの選択的阻害剤であるパラクロリンフェニルアラニンは、PCB 混合物に類似した神経毒性影響とそれに続く生殖不能を引き起こした。一方、5-ヒドロキシトリプトファンは、この生合成経路の段階をバイパスするが、PCB と 5-ヒドロキシトリプトファンを魚類に同時投与すると、PCB 影響は軽減した (Khan と Thomas、2001)。神経伝達物質の機能変化による神経内分泌攪乱は、鉛曝露したアトランティック・クローカーにおいても報告されている (Khan と Thomas、1997)。

成熟後とに対比される発達中の神経系への化学的曝露の顕著な差は、毒性学と神経生物学それぞれの理由から、ここでは特に重要な事項である。曝露の結果発現する状態や毒性は、化学物質曝露発生のタイムウインドウに依存している可能性がある。性ホルモンや甲状腺ホルモンなどのように、強力で、厳密に時間に連動し、統制のとれた負荷を脳の発達に与えることが知られているホルモンも存在する (Gray と Ostby、1998)。発達期、特に脳の発達期における種々統制的因子の攪乱は、神経生物学的視点から重要である。なぜなら、ライフサイクル後半での長期持続的もしくは不可逆的な神経行動学的変化は、このような相互作用の結果である可能性があるからである (Tilson、1998)。例えば、甲状腺ホルモンは、脳の発達に以下のような影

響を及ぼすことが知られている (Porterfield, 1994)。

- a) 小脳における神経系の増殖速度の亢進
- b) 神経系発達と神経系分化の同時進行
- c) 特異的脳部位へのニューロン移動における様式の統制

ヒトの場合、よう素欠乏に由来する風土的クレチン症候群、先天的甲状腺機能低下、母遺伝的甲状腺機能低下は、知恵遅れ、聴力障害、発音障害、運動機能障害のような、よく知られた神経学的欠陥や行動学的欠陥に関連する (Porterfield, 1994)。だが、甲状腺機能異常の程度が、明らかに極めて重要である。

成熟個体においては、性ホルモンが、生殖行動や非生殖的神経行動での変化に連動して影響を受けることが示される場合、化学的曝露後に性的二型の非生殖行動変化が内分泌データを伴わずに報告される場合、生殖系での内分泌攪乱は神経行動学的変化を起こす潜在的原因と考えられる。ホルモン受容体を発現しているニューロンやグリア細胞に対する直接的な有害影響を考えねばならない。ホルモンの分泌や合成の欠損につながるようなホルモン産生器官での細胞毒性影響によって、ホルモン濃度の変化が引き起こされる可能性がある。例えば、PCB 曝露は、甲状腺の微細構造を侵食し、サイログロブリンの分解を引き起こすが、その際に T_4 分泌を低下させる (Collins と Capen, 1980)。更に、甲状腺ホルモン濃度は、PCB 曝露によるホルモン代謝の亢進 (Barter と Klaassen, 1992)、血清中輸送蛋白質の T_4 結合部位の遮断 (Brouwer と Van den Berg, 1986) によって影響を受ける。血清中輸送蛋白質の T_4 結合部位の遮断は、 T_4 を血清中から排除し組織への供給低下を引き起こす。

内分泌攪乱化学物質と疑われる物質が神経行動機能に及ぼす影響には、どのようなメカニズムが存在しているのかという命題は、結局のところ、細胞段階及び準細胞段階における神経行動機能調節について何が判っているかにかかる。だが、より高度な神経機能の根本を成す事象は、調べられたエンドポイントの多くについて理解されているとは程遠い。2つの実験的研究例を以下に示す。これらは、化学物質が誘導する神経内分泌系影響と神経行動影響の変化に関して潜在的メカニズムを示そうとするものである。だが、これらの研究は、メカニズム解明のほんの第一段階に過ぎない。

3.14.2 神経系の性分化

齧歯動物の脳の性分化は、アンドロジェンをエストロジェンに変換する酵素、アロマターゼ (CYP19) の活性によるものと一般的に考えられている。アロマターゼは、これまで調べ

られた全哺乳類の脳から検出されているが (Lephart, 1996)、齧歯動物以外の生物種での性分化に果たす役割については、未解明のままである。アロマターゼは、HPOA、分界条、扁桃体、線条体などの脳の数箇所の部位で発現する。アロマターゼの調節は、アンドロジェン依存性による脳部位の違いや、最大活性発達期によって違うようである (Lephart, 1996、Lauber ら、1997a、1997b、Küpper と Beyer、1998、Roselli ら、1998)。性的二型核の存在領域である HPOA では (Cooke ら、1998)、妊娠末期で鋭い活性ピークが認められ、産後 5 日以内に当初の活性に低下する (Lephart, 1996)。

母乳中 PCBs 組成に準じオルトクロル体とコプラナー同族体を含有する PCBs 混合物を母動物に曝露すると、雄ラット新生児においてアロマターゼ酵素活性の低値の他、成熟後も甘みに対する嗜好性の高値、精巣重の低値、テストステロン濃度の低値などの影響が残る (Hany ら、1999)。甘みに対する嗜好行動は、雌ラットにおいて一層顕著であり、視床下部 E₂ の低下によって脳に一層の雌的な性分化が起き、次いで成熟動物の行動に雌性化を引き起こすことが示唆される。

3.15 EDC が関与する免疫毒性作用機構

免疫系の主な機能は、感染因子や腫瘍細胞に対する防御である。多くの細胞型と可溶性分泌物とが絶妙に協奏し、免疫系機能を発揮する。恒常性維持には、神経系内分泌と免疫系内分泌双方のコミュニケーションが必要である。脳が免疫系に及ぼす影響のほとんどは、免疫系内分泌系から分泌されたホルモンによって引き出される。当然、ホルモン受容体は免疫系細胞上に見出されているのに対し、サイトカイン受容体は内分泌腺と脳に見出されている。また神経制御経路の役割のほとんどについて未解明だが、特筆すべきは、ほとんどすべてのリンパ組織が神経支配であることは注目に値する (総説としては Heijnen ら、1991、Weigent と Blalock、1995、Besedovsky と Del Rey、1996、Johnson ら、1997)。

HPA 軸は、中枢神経系と免疫系との主要なコミュニケーション経路となっている。下垂体由来 ACTH によって誘導される甲状腺のグルココルチコイドホルモン (ヒトではコルチゾール) 合成は、免疫応答を抑制する。他のメカニズムとしては、オピオイドペプチドのような神経ペプチド (Van den Berg ら、1991) による免疫細胞への促進的もしくは抑制的に直接的な作用を介在するものがある。このようなコミュニケーションのために、免疫系細胞は、CRH、ACTH、PRL、 β -エンドルフィン、GH、性ステロイドなど、多数のホルモン、神経ペプチド、神経伝達物質が結合する受容体をもつ。更に、免疫系細胞は、炎症性サイトカイン、特に腫瘍壊死因子、IL-1、IL-6 を分泌する。このような炎症性サイトカインは、離れた部位で生産され、HPA 軸の中心的構成要素と交感神経系に働き、免疫系内分泌ホルモンと

して作用する可能性がある。

HPA 軸の最終活性因子であるコルチゾールは、複数の不思議な免疫抑制影響をもつ。組織学的には、胸腺が最初にコルチゾールの影響を受ける器官である。コルチゾールは、白血球の産生、輸送、機能に影響し、リンパ球減少症や単球減少症につながる場合が多い。単球の走性、殺菌性、T リンパ球増殖も、コルチゾールによって阻害される。グルココルチコイドも、多くのサイトカインの産生を阻害する。更に、グルココルチコイドは、免疫細胞その他の細胞表面にある粘着受容体分子発現を抑制し、IL-6 を筆頭とするサイトカインが誘導する急性期反応を強化する。

PRL が免疫系の様々な面を制御することが示されている。PRL 減少症は、リンパ球増殖の低下、T リンパ球が産生するマクロファージ活性因子の低下につながる。内因性オピオイドペプチドである β -エンドルフィン、 γ -エンドルフィン、 δ -エンドルフィンもまた下垂体から産生される。脳内エンドルフィン受容体に似た受容体が脾臓細胞にも存在しており、他の型の白血球にも存在している可能性が高い。 β -エンドルフィンは、T 細胞増殖と IL-2 産生を促進することが知られている。神経内分泌制御下にある胸腺の生理活性の一つは、胸腺ホルモンの分泌である (Savino と Arzt、1999)。胸腺上皮細胞が分泌するノナペプチドであるチムリンの分泌は、GH と PRL によって調節される。抗ソマトトロピン産生細胞ホルモン血清を注射したマウスでは、胸腺依存性免疫不全が起きることから、下垂体と胸腺との相互作用が強く示されている。

免疫応答への影響の変化は、性ステロイドについても報告されている。雌性の E_2 と雄性のテストステロンとのホルモンバランスは、免疫応答性の強度に影響を与える。一般に、雄性ホルモンであるテストステロンは、免疫促進性である。 E_2 及び DES のような非ステロイド型化学物質は、特定の免疫系を強く抑制する。齧歯動物で観察される影響としては、胸腺萎縮、胸腺依存性細胞の免疫応答の抑制、自己免疫疾患の亢進、ナチュラルキラー細胞活性の抑制、脊椎毒性、単核食細胞系の亢進である (Luster ら、1984)。妊娠期には、リンパ器官に顕著な変化が認められ、妊娠期の血清 E_2 濃度上昇がリンパ球減少症と細胞免疫系抑制に関連している (Clarke、1984)。様々な程度のエストロジェン様活性をもつステロイド型化学物質と非ステロイド型化学物質の評価から、Luster ら (1984) は、免疫毒性の大部分がエストロジェン性に関連しているという科学的根拠を提示した。

ヒトの場合、神経内分泌系と免疫内分泌系は、いずれもが出生時には未完成であり、その後のライフステージで完成する。ヒトの新生児期では、コルチゾール応答能が低い、免疫系は、グルココルチコイドからの調節に対して極めて感受性が高い。この高い感受性が

免疫系の順応的応答を意味し、この繊細な発達期での順応的応答がグルココルチコイドの対免疫系重要調節影響を維持することが示唆される (Kavelaars ら、1996)。このことは、個体発生期間の神経内分泌系が内分泌攪乱化学物質に対し極めて感受性が高い可能性を意味するかもしれない。TCDD (Vos と Moore、1974) やヘキサクロロベンゼン (Michielsen ら、1999) などの様々な化学物質を用いた動物実験から示されているように、免疫系の場合、有害物質の影響を最も受けやすいのは、出産に近い時期である。

これらの考察は、発達期あるいは成熟後の免疫系機能に影響する内分泌経路や内分泌攪乱化学物質の標的となり得る経路が、潜在的に多々存在することを示している。

3.16 内分泌攪乱影響に原因を求める根拠

以上の例は、EDC 作用機構が実験室的設定条件において広くよく調べられている事例である。その目的は、重要な攪乱の型、起こり得る有害健康影響の発現の多様性を説明することであった。これまでの例において見出される因果関係、本総説の後半部において考慮すべき因果関係があるが、このような因果関係を明確化するための方式を、以下にいくつか示す。

- (1) 無処置の生物において、内分泌感受性組織への応答を検出できること。
- (2) 表現型の発現から生理学、細胞生理学、究極的分子生物学に至るまで、生体内での多段階における応答の分析。
- (3) 毒性学的影响が顕れる実験条件下でのホルモンの作用の変化(遺伝子の誘導または抑制)、ホルモン分泌、ホルモン代謝、ホルモン相互作用の直接的測定。
- (4) 生物にとって内分泌系の攪乱が極めて重要な応答であって、一般毒性学上の二次的結果でないことを示すような用量反応性が認められること。
- (5) 発現した表現型を、既知の薬理学的手法による曝露結果と比較できること。
- (6) 特定内分泌系の調節異常によって有害健康影響が起きるような特定ライフステージにおいて、異なった感受性の存在が提示されること。
- (7) 無処置の生物の内分泌系において想定される作用機構に対し相反的な薬理学的処理によって、表現型及び毒性学的影响を回復できること。
- (8) *in vitro* 結合、転写活性、細胞応答の研究からの内分泌活性に関する補助データ。

化学物質曝露が内分泌系の正常機能の変化を経由して有害健康負荷を示したと判断されるような個々の状況においては、当然、これら構成要素すべてが提示されるべき必然性はない。だが、その曝露が「内分泌攪乱的である」という状況を分類するには、科学的論拠の

強さを積み上げていく手法が必要である。本アセスメント第7章では、ある特定影響を特定曝露と結びつけるような予想メカニズム上の根拠に特に重点を置き、ヒトと野生生物の双方において、自然個体群にまで因果関係の評価を拡張する。

