

両生類の発生と内分泌生理機能へのポリ塩化ビフェニル類による影響

ロバート J. デンバー
米国 ミシガン大学

主催者に感謝の意を表します。このシンポジウムの他の講演者と同様に、私も両生類の発生におけるホルモン作用について研究していますが、本日は両生類の発生と内分泌生理機能に対する内分泌攪乱物質としてのポリ塩化ビフェニル類の潜在的影響について我々が行ったいくつかの最近の研究についてお話しします。

環境中には内分泌攪乱化合物があることは明らかです。明らかでない点は、これらの化合物が動物の発生と生理に実際に影響を及ぼしているのかどうかです。特に、両生類の発生に対するこれら化合物の潜在的影響については、情報はごくわずかしかなりません。

ポリ塩化ビフェニル類、すなわち PCB 類は、動物およびヒトの内分泌機能を攪乱することが確認されている化合物です。米国における PCB 類の使用は 1970 年代後半に段階的に中止されました。しかし、PCB 類は食物連鎖中で濃縮すると共に生化学的分解に耐性を示すために環境中に高濃度で残留しています。

既に申し上げましたとおり、哺乳動物、鳥類、および魚類において実施された研究は数多くあり、それらの研究は PCB 類による内分泌攪乱を確認しています。すなわち、PCB 類は、恐らくホルモンと結合するタンパク質と相互作用することにより、ホルモン性信号伝達を攪乱し得るということです。このことは生殖系の問題について最も研究が進んでおり、PCB 類にエストロゲン様作用があることがよく知られています。

PCB 類、または、私が知る限り、何らかの工業的に生産された化合物が、著しい親和性により甲状腺ホルモン受容体と相互作用する可能性があるという証拠がないことは、指摘する価値があると思います。しかし、このようなことが可能な化合物がないと言っているものではありません。このことについて、少しお話ししましょう。しかしながら現在のところ、少なくとも甲状腺の攪乱に関するデータは、攪乱が核受容体との相互作用以外のレベルで生じていることを示唆しています。

両生類はどのようにして PCB 類の影響を受けるのでしょうか。PCB 類は両生類においては催奇性があり、特に高用量では死をもたらすことがあることが知られています。また、PCB 類が発生や成長に影響を及ぼすことも分かっています。本日は、私の研究室から最近発表したものですが、PCB 類がオタマジャクシにおいて実際に行動に影響を及ぼすことがあり、内分泌機能を攪乱する可能性があることを示したいくつかのデータをご覧頂きます。

私は 2 つのパートに分けてお話しします。最初に取り上げるのは、TCB-77 というモデル PCB について行った研究です。その研究では主に内分泌ストレスシステムの攪乱に焦点を置いていました。2 つ目は、両生類における甲状腺ホルモン結合タンパクとの相互作用の可能性、すなわち、甲状腺系の機能を攪乱する可能性について様々な PCB 同族体を分析した研究です。

最初の研究では、オタマジャクシ、つまりこの研究ではグラスフロッグのオタマジャクシ (*Rana pipiens*) の TCB-77 への暴露が、活動レベルの減退を実際にもたらすことを我々は示しました。すなわち、これらのカエルは摂食行動よりも休息に多くの時間を費やすのです。TCB-77 の用量の増加に伴った用量依存型の影響がみられます。

申し添えておきたいのは、我々や他の研究者らはミシガン全域の五大湖地域全体で様々な PCB 同族体の堆積物中の濃度を測定したということです。これらの化合物が高濃度でミシガンの堆積物中に存在しています。これらの研究やこれからお話しする研究で我々が用いた濃度は、我々が環境中に発見した濃度の範囲内であるということです。我々はいくつかの内分泌に関するパラメータの測定も行いました。これはコルチコステロンの濃度または含有量です。コルチコステロンは両生類で主要なストレスホルモンです。我々は、PCB への暴露がコルチコステロン含有量の減少をもたらすことを発見しました。

最近、我々は、オタマジャクシを外因性のコルチコステロンに暴露させるか、または、コルチコステロ

ンの合成を阻害すると、摂食行動に影響が及ぶことを発見しました。例えば、コルチコステロンを投与すると摂食行動が亢進し、コルチコステロン合成を抑制すると摂食行動が減退します。したがって、これは、少なくとも、先ほどご覧頂いた摂食行動の減退と休息時間の延長という行動変化の機序の1つである可能性があります。

我々は発生と成長に関する他のいくつかのパラメータも分析しました。そして驚くべきことに、オタマジャクシ（この場合グラスフロッグまたはアメリカアカガエル）に 77-TCB を投与すると、相対成長を実際に亢進させたのです。このことは、この化合物が全身性の毒性作用がなく、これらの動物が TCB-77 の存在下で実際によく成長したことを示しており、重要です。

しかし、これらは単一種環境での実験であることを指摘したいと思います。すなわち、1つの動物種だけをタンク内で育てたのです。後程、この話を再び取り上げます。なぜなら、これらの2つの動物種は同じ池で一緒に生活しており、自然環境で同じ資源を奪いあう競合相手であるため、自然環境でこれらの化合物がどのようにして動物に影響を及ぼすのかを理解するのに重要だからです。

このスライドに戻りますと、高用量の PCB で観察されたコルチコステロンの減少は、成長促進の機序の1つであるかも知れませんし、少なくとも、我々が検証している仮説の1つです。なぜなら、外因性コルチコイドをオタマジャクシに投与すると成長を低下させ、コルチコイド合成遮断薬を投与すると成長を実際に促進することが分かっているからです。したがって、これは、単一動物種環境での実験で見られた成長の差の機序の1つである可能性があります。

これが、単一動物種の実験であると言及した理由です。我々は、オタマジャクシと一緒に育てた場合（すなわち、資源を得るために競争することになる環境であり、より自然の状態に近い環境で）、77-TCB への曝露がオタマジャクシの成長速度を変調するかどうかを知りたいと考えました。そして答えは、イエスです。

この化合物はそれらオタマジャクシの競争能力または競争的応答を低下させ、TCB が存在する場合は存在しない場合よりも成長が低下しました。したがって、個別に育てる場合はよく成長し、資源を得るために競争することが必要な環境で両者を一緒に育てる場合は成長が低下するということです。これは、行動が障害を受けた結果なのでしょうか。おそらくそうだと思います。これは、自然環境での個体群構成における競争的相互関係に影響を及ぼすでしょうか。それは分かりません。

ここまでの話を要約すると、我々は、この化合物 77-TCB が活動レベルと摂食率を低下させ、コルチコステロンの全身含有量を減少させることを示しました。そしてそれは、給餌率の低下と関連している可能性があります。なぜなら、ストレス軸が、両生類だけでなくヒトや他の脊椎動物においても、食欲や摂食行動の制御に重要な役割を果たすことが分かっているからです。単一動物種環境では成長の促進を観察しますが、自然環境で起こっている状態に近い競争的環境では成長を損ないます。

本日はこれをお見せしていませんが、我々は、77-TCB が ACTH に対する間腎性応答を阻害することを発見しています。ACTH は間腎腺を制御する脳下垂体ホルモンであり、間腎腺のストレス応答も損なわれている可能性があることを示唆していました。

これらは、研究室での単一動物種環境の実験や単なる細胞や分子レベルでの機序の観察では予測できない方法で個体群の構成をも変調する可能性がある PCB 類曝露の亜致死効果です。私は、PCB 類の潜在的役割と PCB 類による甲状腺系機能の攪乱に目を向けてみたいと思います。これまでの話で既に分かっているこのことは、両生類の発生で非常に重要です。

PCB 類は甲状腺ホルモンに類似した構造を持っており、甲状腺ホルモン結合タンパクと相互作用する能力があると示唆されています。PCB 類が、少なくとも、甲状腺ホルモン結合タンパクの1つで血清中の結合タンパクであるトランスサイレチンと実際に相互作用することを示したよいデータがあります。

我々は、先程バーバラ・デメニークが言及した通り、甲状腺ホルモンが、発生、特に脳発生に非常に重要であることがわかっています。また、我々が現在注目している無尾類のだけでなく平目やサンショウウオなどの動物の変態にも非常に重要であることが分かっています。

このスライドは、甲状腺系の攪乱が生じる可能性がある部位の同定に役立ちます。甲状腺ホルモンの生産は、神経内分泌系、すなわち視床下部と脳下垂体によって制御されています。甲状腺ホルモンが甲状腺

から分泌されると、血液中に入り、血清中の結合タンパクに結合されます。

トランスサイレチン、すなわち TTR はすべての脊椎動物に見られます。一部の脊椎動物は、本日は言及しない別の甲状腺ホルモン結合タンパクを持っていますが、TTR は少なくとも血液への甲状腺ホルモンの到達とホルモンの貯蔵場所の形成に役立っています。TTR は次に膜タンパクを經由して細胞内に入ります。膜タンパクは十分には解明されておらず、アミノ酸トランスポーターであると考えられています。

TTR が細胞内に入ると、サイトゾル中の様々な結合タンパクに結合します。この結合タンパクの大半は酵素です。これらのタンパク質の一部はモノデオディナーゼであり、これらは甲状腺ホルモン、すなわち T_4 をより活性の強い T_3 に変換したり、 T_4 や T_3 を非活性化することができます。このプロセスについては、どこで甲状腺ホルモンが核受容体に結合して遺伝子の転写を制御するかを既に聞いています。

したがって、問題は、これらの化合物がこれらの経路のどこに作用しているのか、つまり、信号伝達を攪乱している可能性があるサイトはどこにあるのかということです。ほぼすべての PCB 類や PCB 混合物は哺乳動物の甲状腺機能を攪乱することが示されています。攪乱が生じる主なサイトはトランスサイレチンを結合しており、それにより、 T_4 の分解と排泄の減少に起因する血漿中 T_4 の減少がもたらされます。

注意すべき重要なポイントの 1 つは、哺乳動物の TTRs が T_4 特異性結合タンパクであることです。しかし、両生類の TTR は、大半の脊椎動物の TTRs と同様、 T_3 特異性結合タンパクです。実際、 T_4 に対する特異性は真獣類哺乳動物で発達しました。

これは、両生類と哺乳動物の TTRs への PCB 類の結合を研究するために我々が使用した競合結合測定の一つを示したグラフです。グラフは、放射性 T_3 の置換では、 T_3 が T_4 よりも強力であることを示しています。我々は、PCB 類が両生類 TTR と相互作用することができるかどうかを知りたいと考えました。また、相互作用するとしたら、両生類と哺乳動物の TTRs への T_3 または T_4 様の特性を有すると予測される PCB 類の結合を比較し、TTR が様々なクラスの PCB 類に特異性を示すという仮説を検証したいと考えました。

次に、我々は、PCB 類がオタマジャクシの発生および/または甲状腺機能を変調するかどうかを調査したいと考えました。すなわち、このことが動物の発生と生理に何らかの結果をもたらすかどうかということです。最終的に、 T_3 様の特性を有する PCB 類が甲状腺ホルモン受容体に結合することができるかどうかを測定したいと考えました。

注意すべきは、私の講演の最初に言及した通り、甲状腺ホルモン受容体との何らかの高親和性の相互作用を PCB 類が持っていることを示した証拠はないということです。しかし、指摘すべき点は、甲状腺ホルモン受容体との相互作用について検証した PCB 類が主に T_4 様の特性を有することです。それについては後ほど再度取り上げます。

これらは両生類すなわちウシガエルのトランスサイレチンとの PCB 類の相互作用を研究するために我々が使用しているいくつかの競合結合測定法です。両生類すなわちウシガエルのトランスサイレチンに比較的高い親和性で結合する PCB 類がいくつも存在することを指摘するためにこのスライドをご覧頂いています。親和性を比較してみますと、ここの 32 nM は T_3 に関するもので、これら PCB 類の一部は T_3 と同等か、より高い結合親和性を持っています。

これは複雑な表ですが、前のスライドのデータの多くを要約したものです。しかし、色分けして単純化しています。これから、重要な点についてお話しします。我々は、McKinney と Wallace のモデリング法に基づいて T_3 または T_4 様特性を示すと予測される複数の PCB 類の相互作用を分析するために競合結合測定法を使用しました。

この縦列にはウシガエル TTR の阻害定数、そしてこの縦列にはヒト TTR の阻害定数を示しています。黄色で表示しているのは、 T_3 様であると予測される化合物がウシガエル TTR には非常に高い親和性を示すが、ヒト TTR には非常に低い親和性を示すということです。ここにもそれが見られ、高い親和性と低い親和性、こちらは高い親和性とまったく作用なしです。対照的に、ヒト TTR は T_4 様と予測される化合物に親和性を示します。一方、ウシガエル TTR は T_4 様化合物に非常に低い親和性を示すか、親和性が全くありません。

つまり、これはごく小規模なデータセットですが、このデータセットは、これら 2 種類のホルモン結合

タンパク、すなわち哺乳動物の結合タンパクと非哺乳動物のウシガエルの結合タンパクが PCB 同族体に対して非常に異なる特異性を示し、これにより、異なるクラスの PCB 類がこれらの甲状腺ホルモン結合タンパクと相互作用して甲状腺攪乱を生じさせることを示唆しています。

ですから、甲状腺攪乱の場合は、哺乳動物の研究から予測されることが必ずしも両生類に当てはまらず、そして逆もまた同様です。これは T_3 結合能の変化を示す複雑なグラフです。我々は、これらの PCB 類が *in vivo* でウシガエルのオタマジャクシに何らかの影響を及ぼすかどうか知りたいと考えました。その際のデータを要約してお話しします。

これは、初期の前変態期、後期の前変態期、および変態の極期に投与を行ったオタマジャクシを示しています。この段階では 2 種類の PCB を投与することだけが可能でした。これらは、ウシガエル TTR に高い親和性で結合することを示した先程の表の PCB 類ですが、こちらの 1 つはその表に示しませんでした。それは水酸化された PCB で、これもまた高い親和性で結合することを発見しました。

これは異なる量の血漿を用いた結合分析法です。青は対照群を示しており、赤は PCB 4008 を投与することによる結合の減少を示しています。ここでの結果を要約すると、PCB 4008 は一貫して血漿 T_3 の結合を減少しましたが、他方 PCB-128 はウシガエル TTR への結合能が高く、実際に一貫して血漿 T_3 の結合を増加させました。したがって、*in vitro* 研究から *in vivo* で実際に何が起こるかを予測することは実際には不可能です。

我々は、変態、 T_3 、および脳の T_3 含有量に対する影響を分析しました。テストしたすべての PCB 類が変態を遅延させました。 T_3 は陽性対照として含めました。テストしたすべての PCB 類が血漿 T_3 を減少させましたが、有意であったのは PCB 4008 だけでした。また、すべての PCB 類が脳の T_3 含有量を有意に減少させました。

しかし、驚くべきことに、 T_3 でも同じことが起こりました。 T_3 は T_3 を分解する 5-モノデオディナーゼの脳における発現を誘導することが分かっています。したがって、変態の際の脳における T_3 含有量の減少は実際には正常で、モノデオディナーゼの誘導に起因するものである可能性があります。PCB 類が、5-モノデオディナーゼを誘発させることによって、同じように作用しているかどうかは、現時点ではわかりません。

PCB 類による甲状腺攪乱の機序について、TTR との結合での競合はイエスです。代謝および甲状腺ホルモン除去の変調について、哺乳動物の研究からそれはイエスであることが分かっています。PCB 類は、形質膜、ホルモントランスポータ、あるいはサイトゾルの甲状腺ホルモン結合タンパクへの結合で競合するのでしょうか。それについて答えは分かっていません。また、一部の PCB 類が甲状腺ホルモン受容体に結合する能力が潜在的にあるかどうかは分かりません。

少し前に皆さんにご覧頂いた研究に基づいて、以前に甲状腺ホルモン受容体との結合について分析されていない特定の PCB 類が T_3 様の特性をもつのではないかと予測しています。こちらは、これらの PCB 類の何れかが甲状腺ホルモン受容体と相互作用するかどうかをテストするために、神経芽細胞腫細胞系で発現したヒト甲状腺ホルモン β 受容体を使用して、我々が最近行ったばかりの非常に予備的な研究です。

このグラフが示しているのは、先程ご覧頂いた PCB-128 がウシガエル TTR に高い親和性があり、このアッセイでは実際に甲状腺ホルモン受容体との結合の減少が生じましたが、ウシガエル TTR に若干の親和性を示す他の化合物はそうなりません。したがって、これらの化合物が生理や発生にどのような影響を及ぼすかについて予測できる分析法はありません。

要約すると、PCB 類はウシガエル TTR に結合する T_3 と競合することがあります。分子モデリングから予測された PCB 類の T_3 様および T_4 様の特性は我々の研究によってほぼ裏付けられていましたが、より詳しくこの予測を検証するために、さらに多くの同族体を研究する必要があります。PCB 類は変態を遅延させる、つまり PCB 類は血漿結合を変調させると共に T_3 濃度と脳における T_3 含有量を減少させることがあります。最後に、一部の PCB 類、または T_3 様特性を有する少なくとも 1 つの PCB は、甲状腺ホルモン受容体との結合で競合する可能性があります。

そのため、甲状腺ホルモン受容体との高い親和性による相互作用に関する証拠はないと申し上げて私の講演を始めました。ここでご覧頂いたデータは、これが高い親和性による相互作用だということを示して

いません。なぜなら実際にそれらの研究は 1.0 ミクロモルの化合物を用いて行われたためです。しかし、研究所見は、少なくとも T₃ 様特性を有する可能性のある一部の化合物が甲状腺ホルモン受容体と相互作用する能力を潜在的に有することを示唆しており、また、さらに研究が必要なことも示唆しています。

PCB 類は両生類や他の野生生物個体群に脅威となるでしょうか。PCB 類は高用量では致死効果がありますが、自然環境の濃度の大半はそれよりずっと低い濃度です。しかし皆さんにご覧頂いたように、低用量では亜致死効果を示すことがあり、内分泌機能、発生、成長、さらには自然環境における個体群構成をも変調させる可能性があります。

私の共同研究者達について、私の講演を終えたいと思います。私が担当する大学院生 Karen Glennemeier と Peter Schleuter の両者が研究の多くを実施しました。組換え型ウシガエル・トランスサイレチンを提供してくれたのは Kiyoshi Yamauchi です。また、これらの研究はミシガン州環境部門の支援を受けました。ご清聴ありがとうございました。

質疑応答

吉里：討議と質問の時間が若干あります。

質問：チロキシン結合グロブリンとして知られている別の血漿甲状腺ホルモン結合タンパクがあります。チロキシン結合グロブリンが PCB 類にも結合することを示唆したデータはありますか。データがあるとするれば、同グロブリンはどのようにして甲状腺攪乱物質としての PCB の力学を変えますか。

デンバー：チロキシン結合グロブリンすなわち TBG は、特定の哺乳動物にだけに存在し、両生類あるいは非哺乳動物の脊椎動物にはありません。私が知る限り、PCB 類が TBG と高い親和性で相互作用する可能性があることを示した研究所見はありません。

質問：別の質問です。あなたはサイトゾルの甲状腺ホルモン結合タンパクがあったと述べられました。あなたはそれを観察して、影響を及ぼすかどうか見る機会があったでしょうか。

デンバー：いいえ。これはよい質問です。我々はそれについて研究できていません。しかし、これらは甲状腺ホルモン結合タンパクですから、ぜひ次に研究すべきです。ご存知の通り、これらの結合タンパクは数が多く、相互作用や甲状腺ホルモン機能の攪乱を生じさせるサイトである可能性が高いと思います。

質問：TTR への T_4 と T_3 の親和性はヒトと両生類の間では逆転します。この逆転する親和性について、何か分子的な理由はわかっていますか。

デンバー：私個人としては分かっていませんが、オーストラリアのグループがこの問題を分析し、このタンパク質の構造を調査し、ある理由を示しています。しかし、私はそれを詳しくお話することはできません。しかし、いくつかご紹介することはできると思います。

質問：複数の動物種を使用して逆の影響を観察されたあなたの研究では、変態では副腎皮質ホルモンが重要で、少なくとも副腎皮質ホルモンが変態

に影響を及ぼすことが分かっています。あなたが示したデータ以外については測定しておられますか。

デンバー：はい。これはよい質問です。我々は競合実験では副腎皮質ホルモンを測定しませんでした。しかし、オタマジャクシの密度、すなわち、資源を求めて競争する動物の数を増大させると、コルチコステロンを増加させることが分かっています。

それは実際に成長遅滞の理由であると思います。なぜなら、コルチコイド合成遮断剤を使用して同じ実験をすると、オタマジャクシの密度増大の作用を逆転することが分かっているからです。したがって、コルチコイド軸はオタマジャクシの生理と発生で非常に重要であると思います。

質問：*in vivo* 研究における濃度は、*in vitro* 研究の濃度と一致していますか？

デンバー：はい。これはよい質問です。我々は *in vivo* で使用した濃度を *in vitro* で結合を置換させることが確認された濃度に適合させようとしていました。

私はこれについて言及しませんでした。我々がこれらの化合物を投与する方法は混餌であり、我々は基本的に処理した飼料を動物に与えています。しかし、実験後の PCB 類の組織中含有量や体内量は測定していません。

質問：哺乳動物の血清甲状腺ホルモン濃度に対する PCB の影響を観察した方をご存知ですか。

デンバー：はい。それについては、主にラットで、数多くの研究がなされています。簡単に言及しました通り、研究の多くは PCB 類と PCB 類の混合物が甲状腺機能を攪乱し、主に血漿甲状腺ホルモン濃度を減少させることを示しています。

質問：基本的に同じ機序と予測されていますか。

デンバー：はい。私は同じ機序が起こっていると仮説を立てています。すなわち、TTR からの置換が腎臓による排泄を増大させ、その後、恐らく肝臓でグルクロン酸抱合と硫酸化を増加させている

と考えられますが、両生類では検証されていません。したがって、同じ機序が起こっているのではないか思います。しかし、異なるクラスの PCB 類が同じタイプの影響を生じさせているのではないのでしょうか。

質問：ありがとうございます。

吉里：時間に制限がありますので、このセッションを終了したいと思います。聴衆の皆さんのご協力で非常に興味深い刺激的かつ楽しいセッションとなりました。ありがとうございます。