

平成 10 年度環境庁委託業務結果報告書

内分泌攪乱化学物質影響調査研究

平成 11 年 3 月

財団法人 日本公衆衛生協会

目 次

はじめに	1
第1章 内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムに関する調査研究	3
1. 内分泌攪乱物質の作用点に関する考察	5
2. 内分泌攪乱化学物質等の生殖毒性物質と精子形成障害との関連	28
—生殖細胞死を中心として	
3. 比較胎生病理学からみた内分泌攪乱	38
4. 産業化学物質の生殖毒性に関する文献的研究	48
5. 次世代影響としての神経行動毒性評価と今後の研究課題	65
6. 魚類の生殖と性ステロイドホルモン	89
(内分泌攪乱化学物質の生殖への影響を解析する研究モデル)	
7. 内分泌攪乱化学物質等の環境因子の試験動物モデルとしてのメダカ	104
8. 奇形カエルと内分泌攪乱化学物質	184
第2章 先天奇形サーベイランスに関する調査研究	201
1. 内分泌攪乱化学物質の人への影響調査方法の研究	203
2. 日本母性保護産婦人科医会・外表奇形等調査の解析	207
3. 先天奇形を指標とした環境モニタリング	210
4. 泌尿器科領域での奇形発生状況の分析	217
5. 尿道下裂の疫学調査の検討	223

はじめに

人や野生動物の内分泌作用を攪乱し、生殖機能障害、先天奇形等を引き起こす可能性のある内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）による環境汚染は、科学的には未解明な点が多く残されているものの、生物生存の基本的条件に関わるものであり、世代を超えた深刻な影響をもたらすおそれがあることから環境保全上の重要課題である。

本業務では、内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムに関する科学的知見の整理、内分泌攪乱化学物質と先天奇形との関連を調べるサーベイランス等についての検討を実施したが、本報告書はその成果をとりまとめたものである。

本報告書は、2部構成となっており、「第1章 内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムに関する調査研究」においては、各分野の専門家に依頼し、内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムに関する文献の調査とともに、今後の調査研究の方策についてまとめている。「第2章 先天奇形サーベイランスに関する調査研究」においては、内分泌攪乱化学物質との関連が特に疑われている生殖器奇形を中心にその発生状況・関連性を検討するとともに、本邦及び諸外国の出生児の先天奇形の発生の動向を把握するシステムについて検討している。

第 1 章

内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムに関する調査研究

1. 内分泌攪乱物質の作用点に関する考察

東京大学分子細胞生物学研究所

教授 加藤 茂 明

1. 内分泌攪乱物質の分子作用メカニズムについての考察

1-1. 内分泌攪乱物質の生物化学的（科学的）定義は何か？

内分泌攪乱物質は、内分泌を攪乱する人工化合物として一般的には捉えられてきてはいるが、化学的に正確な定義はされていない。定義を明確にするには、既に内分泌攪乱物質として認知されている人工化合物の作用点、即ち生体内標的分子を同定することが、絶対先決であると思われる。このような標的分子については、到底一種とは思えず複数存在すると思われるが、その生物活性を考えると無数ではなく、限られた数の分子であると推定される。

このような標的分子群が具体的に同定された時、初めて内分泌攪乱物質群のクラス分けが可能となろう。更にこのような標的分子別のクラス分けが最も意味を持つのは、既知の人工化合物ばかりではなく、生物活性未知の人工化合物群の予見的評価であろう。内分泌攪乱活性を有することが既に知られている化合物と類似の化学構造を有する化合物群の危険性を、いち早く予見されることが可能となろう。

それではこのような標的分子群を活性評価系に持ち込む方法論は如何なるものであるか？内分泌攪乱物質の作用が性転換に代表されるように遺伝形成を変えるものでもあるため、その標的分子群は遺伝情報を制御する転写制御因子群である可能性が高い。転写制御因子群はDNA結合能を持つタンパク質であるので、それらcDNAを用いた分子生物学的手法により、簡単に生物活性を保持したタンパクを大量に作ることが十分量そして迅速に調製することが可能である。同様に分子生物学的手法により、転写制御因子としての機能への影響も短時間で評価が可能である。実際このような手法を用いることで、性ステロイドホルモン誘導体が数多く人工合成され、本来のホルモン活性を増強もしくは阻害する化合物が数多く開発されている。このことからこの系の有効性については実証済みである。従って、このような分子生物学的手法に基づいた評価系を導入することで、初めて内分泌攪乱物質候補化合物を短時間に効率良く評価することが可能と考えられる。

1-2. 内分泌攪乱物質の現状調査は、果たして、内分泌攪乱物質汚染除去の根本的解決法になりうるか？

内分泌攪乱物質による環境汚染によって引き起こされるヒトを含めた生物への害は、様々な形で、研究調査されている。

1) は、ダイオキシンを始めとした内分泌攪乱物質と目される化合物群の汚染源を調べる調査である。これによって大気中、地中、そして生物体中の存在量が調べられている。しかし前にも述べたように、内分泌攪乱物質群の作用点は複数であること、

また化学的測定法に限界があって類似の化合物群や代謝体などを同時に測定できない。従って、このような調査においては、あくまでも代表的な内分泌攪乱物質を指標とした汚染の”目安”を示すにすぎない。全く内分泌攪乱作用点の異なる化合物群についての測定は、場合によっては完全に欠落してしまう可能性が考えられる。

2) としては、性転換生物個体数の調査である。内分泌攪乱物質の影響によると考えられる性転換が、様々な生物で報告されている。しかし、性決定は決して1つの段階で成り立つものではなく、複数の複雑なステップを経ていて、内分泌攪乱物質作用点は複数と予想される。従ってこのような方法は1) の陥る全く同じ欠点であり、これも異なった種類の化合物が異なった作用点に作用し性転換を引き起こしている可能性が否めない。従って性転換生物個体数もあくまでも汚染の1つの”目安”に過ぎないように思う。

この報告者は決して1)、2) の有用性を否定するものではない。このようなアプローチがあってこそ、内分泌攪乱物質汚染の実態が浮き彫りにされ、世間にも強い関心と認識を喚起することができたことは言を待たない。しかし次の最も重要な布石は、1)、2) の結果をふまえた内分泌攪乱物質作用点の解明であろう。このような作用点を決める研究は、1)、2) とは全く異質な方法論の開発が必要であり、さしあたっては、分子生物学的手法に基づいた基礎研究の展開が大いに来たいできる。特に後者としては、性ステロイドホルモンの分子作用メカニズムや性決定機構の分子メカニズムの解明が該当しよう。このような基礎研究の成果なしに、次のステップ、つまり汚染拡散防止の根本的解決に到るとは思わない。

1-3. 内分泌攪乱物質の作用点（標的分子）は何か？

それでは内分泌攪乱物質の作用点（標的分子）は何であろうか？性転換生物の存在から、図1に示すようにその作用点について概念的に示した。作用点は、現在まで明らかになっている事象を合わせるとおよそ3つに分類出来ると考える。1つは、ダイオキシンを初めとした薬物（毒物）が結合する核内薬物レセプター（ダイオキシンレセプター）を介する情報伝達への影響である。最も単純な図式で、薬物レセプターに結合した内分泌攪乱物質が、これらレセプターの標的遺伝子群を活性化することで、性転換を初めとした内分泌攪乱を引き起こす可能性である（図2）。しかし薬物レセプターに結合する薬物すべてが、性転換を初めとした内分泌攪乱を顕著に示すわけではないので、内分泌攪乱の1部のみを証明すると思われる。最も端的な例はダイオキシンである。ダイオキシンは、薬物レセプターに非常に高い結合能を示すことで非常に良いリガンドとして働き、胎児に著しい奇形を催すが、性転換は引き起こさない。むしろ薬物代謝酵素群（p450酵素群）がダイオキシンレセプターによりその、これらp450酵素群は性ステロイドホルモンの代謝を担うものもあるため（1、2、3）、魚類などの性転換の1種の例では、性ステロイドホルモン合成異常で説明できるかも知れない（図3）。

これらの可能性より更に魅力ある仮説は、内分泌攪乱物質が結合した薬物レセプタ

一が間接的に性決定因子群や性ステロイドホルモンレセプターの機能を阻害する可能性である（図4）。これは、内分泌攪乱物質が結合した薬物レセプターは細胞質あるいは核内で、様々な相互作用因子群と会合あるいは解離することから予想される。このような相互作用因子群を通じて間接的に他の情報伝達系の機能を攪乱する可能性である。従って、薬物レセプターの細胞内動態の解析や薬物レセプターとの細胞内相互作用因子群の同定は、極めて興味深い問題の1つである。

もう1つの作用点は性決定因子群への作用である。性決定因子群は現在のところ、すべてが同定されているわけではなく、その一部が解明されたに過ぎない（図5）（4-9）。それでも、その性決定に関わる因子群の数は多く、また複雑多岐に渡ることが理解できる。このような性決定因子群の機能が薬物などによって直接的に影響を受ける例は報告がない。しかしながらこれら因子群の中には、後で述べるように核内ステロイドホルモンレセプタースーパーファミリーに属するオーファンレセプターが含まれている。よって、これら性決定に関与するオーファンレセプターのリガンドとして働く可能性は極めて興味深い作用仮説の1つである。

3番目として、核内ステロイドホルモンレセプター群が挙げられる（10、11、12）。核内ステロイドホルモンレセプターは核内レセプタースーパーファミリーに属し（図6、7）、核内に局在するリガンド誘導性転写制御因子である。従って、後に詳細に述べるように、核内レセプターはリガンドのもつシグナルを遺伝情報へと伝達する変換器として働く。このファミリーに属するレセプターは、リガンド未知のオーファンレセプターを含めると、ヒトではおよそ100種近くも存在すると考えられている。内分泌攪乱物質が、直接性ステロイドホルモンレセプターのリガンドとして働き、内因性の性ステロイドホルモン作用を攪乱する可能性は最もわかりやすく、説得力のある可能性である。しかし、性ステロイドホルモン作用に完全拮抗するような、いわゆる合成ホルモンアンタゴニストには、性転換能がないことが知られている。従って、性ステロイドホルモンレセプターに作用するとしても、性ステロイドホルモンに対して完全に拮抗するものではなく、性決定という限られた時期にレセプター機能を調節するような効果が想像される。そのような調節作用は、後に詳しく述べるように、レセプターそのものへの効果よりむしろレセプター機能に必須な転写共役因子の機能への影響が考えられる。

同様に、内分泌攪乱物質がこのファミリーに属するオーファンレセプターのリガンドとして作用する可能性を検証することは、最も興味深い対象の1つである。特に最近同定されたPXRはステロイドホルモン代謝体をリガンドとするため、内分泌攪乱物質との関係は目を離せない（13）。

このように、以上述べてきたように内分泌攪乱物質が直接核内レセプターのリガンドとして働き、レセプター機能を正負に調節する可能性が考えられるが、一方で、これらレセプターに結合することで、レセプターと相互作用する転写共役因子の機能を間接的に制御する可能性が考えられる（14、15）。核内レセプターに作用する転写共役因子はすべてが同定されたわけではなく、その一部のみが同定されている。こ

れら核内レセプター転写共役因子は、薬物レセプターや性決定因子群の転写制御に対しても共通の転写共役因子として働く可能性が推察されている。従って、もしも性ステロイドホルモンレセプター転写共役因子が、内分泌攪乱物質によってその機能による障害が引き起こされると、間接的に性決定因子群や薬物レセプターの機能障害が引き起こされる可能性が考えられる。

1-4. 性ステロイドホルモンレセプターの機能解析研究がもたらすもの

以上述べてきたように、内分泌攪乱物質が作用すると考えられる作用点について、現時点での知識で考え得る、そして可能性の高いものについて列挙してみた。このような作用点の候補の分子レベルでの機能の解明なくして、内分泌攪乱物質群の分別化、そして未知化合物の副作用の予知が難しいことについても述べた。これら作用点として考えられる3つのクラスの異なる因子群の共通した性質は、既に述べたように、いずれも遺伝情報をコントロールする転写制御因子であることである。性転換を含めた内分泌攪乱物質の生物への悪影響は、単に一時的な代謝障害や毒性ではなく、遺伝情報制御の攪乱を伴った、より重篤なものと捉えられる。このような観点から眺めてみると、3つのクラスの候補因子群のうち、転写制御因子群として最も解析が進んでおり、かつまたそれ自身が低分子量の脂溶性生理活性物質をリガンドとする核内ステロイドレセプター群（核内レセプタースーパーファミリー）が、最も内分泌攪乱物質の作用する標的分子として解析しやすい候補と思われる。

そこで、以下に既に今まで明らかになっている核内レセプターの転写制御因子としての機能を分子レベルで概観したい。これら既に明らかになった核内レセプターや転写共役因子の機能に対して、内分泌攪乱物質が如何に作用するか検討することは、今後の解析法の発展を考慮する上でも、現時点では最前のアプローチと思える。

2. 核内レセプターを介した性ステロイドホルモンの分子作用メカニズム

2-1. 性ステロイドホルモン群の作用メカニズム

性ステロイドホルモンを始めとして、核内レセプターを有する低分子量脂溶性生理活性物質には、ステロイド/甲状腺ホルモン、ビタミンA(レチノイド)、ビタミンD群のエイコサノイド、更にコレステロール代謝体などが知られている（図6、7）（10-13、16-19）。これら一群の脂溶性物質は脂溶性であるので、各々細胞膜・核膜を自由に透過し、核内に局在する特異的核内レセプターに高い親和性を示すことでリガンドとして働く。核内レセプターは、リガンド誘導性転写制御因子であって、それぞれの特異的な標的遺伝子群プロモーターに結合することで、標的遺伝子群の発現を転写レベルで制御する。標的遺伝子群産物（タンパク）は、酵素であったり、細胞内構成蛋白であったり、いずれも生理的に重要な役割を担っていると予想されている。

このように核内レセプターは、これら性ステロイドホルモンを媒体として脂溶性リガンドの持つシグナルを遺伝情報に伝える変換器であって、リガンド固有の生理活性

は、その標的遺伝子群（遺伝子産物=タンパク）群が実際担っていることがわかる（図8）。各脂溶性リガンドの生理作用は一般に多種多様で、一見その作用メカニズムは外見上互いに異なり、極めて複雑に見えるが、実はこのように何れも図1に示したように単純化できる（10、11）。即ち、これら脂溶性リガンドはいずれも核内レセプターを介し遺伝情報を呼び起こすシグナルなのである。このようにシステムの基本原理は簡単にまとめることができるが、性ステロイドホルモンをはじめとしたこれら核内レセプターリガンドは、体内で組織特異的作用を示すことが知られている。特に性ステロイドホルモン合成化合物は、組織によって、その作用が正（アゴニスト）や負（アンタゴニスト）に逆転することが知られている。このことは、後に述べるように、合成リガンドの種類によって核内レセプターの立体構造を異なった形に変えるため、レセプター機能を正負に調節する作用があることがわかっている。従って、リガンドとして作用する内分泌攪乱物質は組織特異的に作用する可能性を示唆している。

2-2. 性ステロイドホルモン核内レセプタースーパーファミリー

核内レセプター群は1つの遺伝子から分子進化したと考えられ、互いの構造機能が類似したいわゆる1つの大きな遺伝子スーパーファミリーを形成している（前述）。図7に示すようにエストロゲンでは2種のレセプターがあるが、他のステロイドホルモンではレセプターは1つのホルモンに対し一般に1種である。またステロイドホルモンレセプタータンパクのN末端が他のレセプターより長いのも特徴的である。一方、ビタミンAは6種（RAR、RXR、ただしRARはATRAの他9 CRAもリガンドとする）、甲状腺ホルモンでは2種であるが、ビタミンDのレセプターは1種のみ知られている。PPARは当初パーオキシゾーム誘導剤（クロフィブレート）が間接的に活性化するレセプターとしてPPARαが1990年に同定され（16）、続いてPPARβ/d、PPARγが見出された。その後内因性リガンドの同定が精力的に行われ、PPARαのリガンドにはロイコトリエンB₄、PPARγのリガンドはプロスタグランジンJ₂であることが報告された（17）。しかしながら、このレセプターは中鎖脂肪酸によっても活性化されるため、他のリガンドの存在が予想されている。一方、薬物の中では効率よくPPARγを活性化するものとしてトリグリタゾンが知られている。この薬剤は抗糖尿病剤として開発されたものであるので、PPARγは抗糖尿病のターゲット分子として大いに注目されている（18、19）。この他LXRのリガンドがコレステロールの代謝体の1種であること、FXRはファルネソールが有望なリガンドとして同定されたが（20、21）、最近胆汁酸がリガンドとして作用することが示されている（22）。またRXRはリガンド特異性が低く、合成ステロイドホルモンやステロイドホルモン代謝体をリガンドとしている（13）。この他にもリガンドの同定されていない、いわゆるオーファン（孤児）レセプター少なくとも30種以上は存在が知られている（12）。オーファンレセプターは核内レセプターとの相同性から単離されたものも多いが、ショウジョウバエ遺伝学や、遺伝病の原因遺伝子として同定されたものも多い。この中にはその遺伝子の欠損により副腎形成不全（DAX-1/Ad4BP）や、小脳細胞欠失（RORα）等の重篤な病態を引き起こすものもあ

り、それらの内因性リガンドは大いに注目されている(11、23)。このように、予想以上の数の低分子量脂溶性化合物が核内レセプターリガンドとして働くことから、内分泌攪乱物質が核内レセプターリガンドとして働く可能性は高い。

2-3. 核内レセプター群の構造と機能

核内レセプター群は、その高い相同性と機能からA-Fまでの領域にレセプタータンパクN末端から分割される(図9)。直接標的エンハンサー配列を認識、結合するDNA結合領域は、タンパク中央のC領域に位置する。この領域には他のDNA結合タンパクにも見られる特徴的なZnフィンガー構造が2個存在する。この構造はDNA 2重らせんに強固に結合するのに必須な構造であり、実際からDNAとZnフィンガーが強固な構造を取ることがわかっている。リガンドが結合するいわゆるリガンド結合領域はC末側のE領域に存在する。核内レセプターはホモあるいはヘテロとして2量体を形成するが、2量体化能はC及びE領域が存在する。核内に局在させる核移行シグナル(NLS)はD領域に存在する(24)。レセプターの主たる機能である転写促進能は、A/BとE領域の2箇所が担っている。何れの機能も組織や動物種の違いによって活性が異なっている(25)。このA/B領域とE領域を別々に、分子生物学的手法により調べてみると、A/B領域の転写促進機能(AF-1)は恒常的であるのに対し、E領域の転写促進機能(AF-2)はリガンド結合誘導的である(26)。またAF-1やAF-2の機能はリン酸化によって調節されることも知られている(27、28)。一方核内レセプターは、DNAに結合しただけでは転写促進しない。この点は他のDNA結合性転写時とは際だって異なる性質であるDNA結合に加えてリガンド結合が転写促進には必須である。このことはリガンド未結合レセプターでは逆にAF-1の機能が、リガンド未結合のE領域(AF-2)によって抑制されていることを示唆する。AF-2へのリガンド結合はAF-2の機能誘導のみならずAF-1本来の機能の回復と言えよう。このようなAF-1とAF-2との機能的な相互作用は、リガンドの生理活性や、組織(動物)特異的な転写促進能に密接に関わっていることが予想されている。更に後に述べるように、このAF-1とAF-2間の相互作用はリガンドの種類により異なっているため、内分泌攪乱物質が結合すると組織特異的な作用を引き起こす可能性が考えられる。

2-4. 核内レセプターの標的DNA配列

核内レセプターの相同性に見られるように核内レセプターの標的エンハンサーは、互いに極めて類似した構造を取っている(図10)。その配列は2つに大別され、1つは回文配列(パリンδροーム)と呼ばれた対称型DNA配列であり、このような配列はステロイドレセプターがホモ二量体として結合する(29、30)。エストロゲンレセプター(ER)の標的配列は5'-AGGTCA-3'の2つのコア配列が互いに向き合って、そのモチーフ間のスペースは3bpである。一方他のステロイドホルモンであるグルココルチコイド(GR)、ミネラルコルチコイド(MR)、プロゲステロン(PR)、アンドロゲン(AR)、レセプターの標的配列は5'-AGAACA-3'からなり、やはり2つのモチーフ