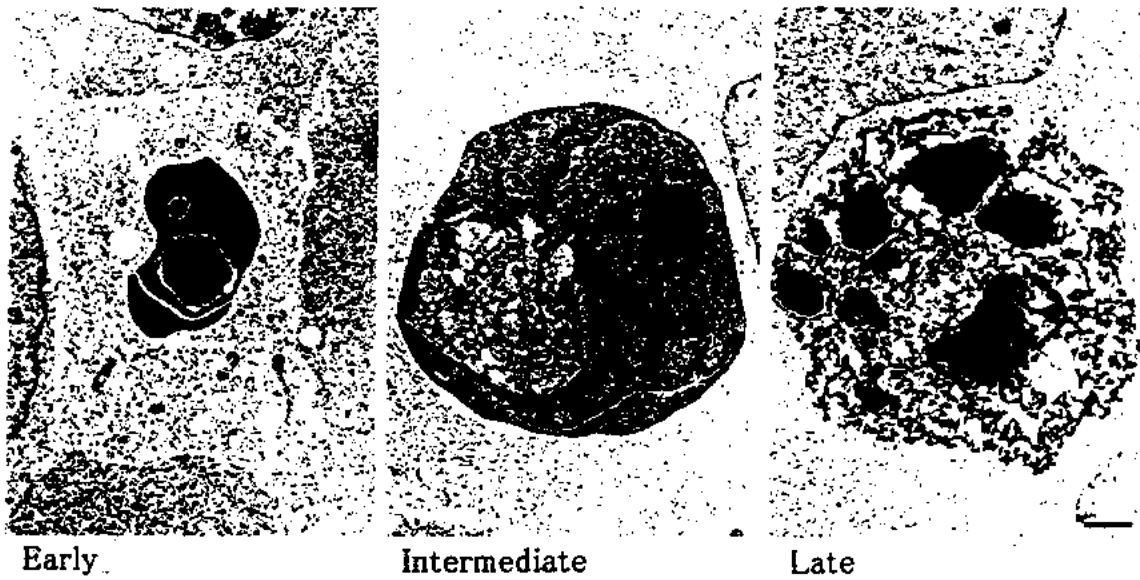
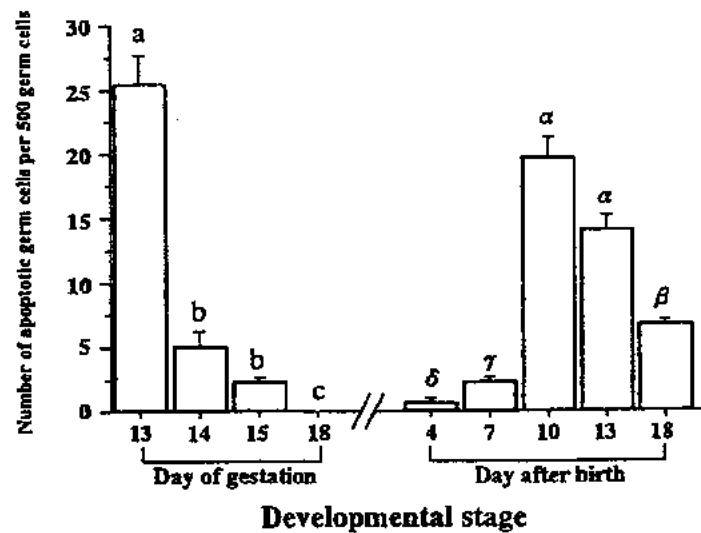


Various stages of germ cell apoptosis (F13)



[図1] マウス胎生13日精巣に於ける始原生殖細胞アポトーシスの電顕像
Early, Intermediate, Late の三つのステージが分類される。Bar: 2 μ m



[図2] マウス精巣の発生に伴うアポトーシス生殖細胞の出現

胎生13-15日精巣でのアポトーシスは電子顕微鏡観察により、またそれ以降では TUNEL 陽性細胞

として計数された。値は3-4匹からの Mean+SEM であり、Student's t-test により有意差検定を行った。各グループにおいて、有意な差異が認められるもの ($p < 0.05$) は異なる文字で区別した。

3. 比較胎生病理学からみた内分泌攪乱

井上 稔 名古屋大学環境医学研究所

要約

内分泌、自律神経系の中樞である視床下部は、男女の二形性が認められる領域である。視床下部の神経細胞の分化は、妊娠後半の胎児期に起こるが、強力な性ホルモン物質に曝露された場合には性分化が障害される。

視床下部の第三脳室腹側周辺域は、血液脳関門が欠如し、血中の化学物質に直接接触することから、胎児でなくても強いホルモン作用をもつ物質に曝露されれば、視床下部一下垂体系での内分泌攪乱が起こる可能性がある。

いっぽう、神経伝達物質グルタミン酸、またはそのアゴニストのような興奮性化学物質は、視床下部の神経細胞を興奮させる。過剰量の興奮毒は神経細胞を興奮死させ、中大量の興奮毒は視床下部一下垂体系を刺激し、いずれも内分泌、自律神経系を攪乱する恐れがある。

胎児・新生児の視床下部では、血液脳関門を欠く領域は成人より広く、神経細胞も脆弱であり、毒物に曝露されたり、性分化に必要な細胞環境の攪乱にあった場合には、不可逆的な障害が起こる恐れがある。発達中の脳の障害という観点から、外因性化学物質の内分泌攪乱作用を検討する必要性について述べた。

始めに

環境を汚染した人為起源の化学物質がホルモン作用をもつことで、生態系が混乱し始めているのは事実としても、われわれが直接影響を受けるほど大量に曝露されることがあるだろうか。外部から取り入れた化学物質がホルモン作用をもっていたとしても、巧妙なフィードバック機構があり、それらの物質に単純に影響されとは限らない。しかし、フィードバックの中樞が

影響を受けて、内分泌が攪乱される可能性も考えられる。そこで、下垂体からのホルモン分泌を支配するとともに、自律神経系の最高位の中樞である(30)、視床下部(広義)の障害に注目して、内分泌攪乱を考察する。

I. 視床下部

大脳皮質の形態や機能に(重さ以外)男女差はないが(7)、視床下部には男女の二形性がある。この性分化は胎児期に起こり、性ホルモンの影響を受けるので、外因性性ホルモン作用物質によっても影響を受ける可能性がある。

I. 1. 視床下部の性的二形性

ラット視索前野の内側核(medial nucleus)は、雄が雌の5倍の体積をもち、神経細胞数もその分だけ多い(12)。同様のことはヒトでも認められ、視索前野内側核の大きさは男性が女性の2.5倍、細胞数は2.2倍(48)である。この神経核を破壊すると、雄ラットの交尾回数が激減するという(2)。雌ラットでは、発情期に入るためのゴナドトロピン放出ホルモン(LH/FSH-RH)放出が減少する(51)。

いっぽう、この神経核の近くにある視索前野室傍核前腹部(anteroventral periventricular nucleus)は雌の方が雄より大きく、細胞密度も高い(3)。この核及び視索上核(supraoptic nucleus)の神経細胞は、バソプレッシンとオキシトシンを合成し、これらのホルモンは軸索中を流れて下垂体後葉に貯留されて後葉ホルモンとして放出される(30)。オキシトシンの生理作用として、子宮筋収縮、卵管の蠕動亢進、乳汁分泌亢進と、雌に関係する作用が知られており、視索前野室傍核が雌で大きい理由かもしれない。

これらが存在する第三脳室腹側周辺域は、血液脳関門が欠如し、血中の化学物質に直接接触する。

I. 2. 視床下部の細胞発生

視床下部の神経細胞発生は、脳の神経細胞発生の最も早期に始まる。マウスでは受精後 10 日から 12 日 (45)、ラットでは受精後 13 日から 15 日に大多数の神経細胞が第三脳室の脳室帯で最終細胞分裂を終える (17)。最終的に第三脳室から遠い外側背側に位置を占める神経細胞が早く発生し、内側に位置する細胞は後から発生する。この時期は、ヒトの脳の発生では受精後 5 ~ 8 週に相当し、大脳皮質神経細胞の発生時期より早い (付表)。しかし、性による二形性を示す、視索前野の内側核と室傍核の神経細胞は発生期間が長く、同じころ発生を始めても、全ての神経細胞が最終分裂を終えるのは、ラットの受精後 17 日頃 (ヒトの 13 週に相当) になる (13,29)。

最終分裂を終えた神経細胞は、第三脳室の脳室帯を離れて最終的な位置まで遊走して集合し、分化する。この時期に神経細胞の数の調整がおこなわれ、ラットでは生後 13 日頃 (ヒトの受精後 24 週程度) までに一定の細胞死が起こる。二形性を示す核の神経細胞は、産生された時は雌雄同数と考えられるが、細胞死に雌雄差があることで最終的な細胞の数に差ができる。

I. 3. 性分化に対するホルモンの影響

視床下部の性による二形性が現れるのは、ヒトでは胎児期である。哺乳類の脳は元来雌であり、性分化の臨界期に生殖腺でつくられるホルモンによって、雄の脳になると考えられる。

胎児の生殖腺に始源生殖細胞が遊走 (ヒトでは受精後 6 週) した後、生殖腺はわずかながらテストステロンとエストラジオールの両方を合成し始める。受精後 8 週から、精巣ではテストステロン、卵巣ではエストラジオールの合成が高まり、出生近くまで性ホルモンの高い状態が続く。エストラジオールは、胎児の肝臓で大量

に作られる胎児型のエストロゲン結合蛋白 (fetoneonatal estrogen binding protein, FEBP/ α -fetoprotein, AFP) と強く結合しており、自由に神経細胞に入れない。神経細胞は能動的に、結合蛋白に結合したエストラジオールを取り込むので、その量を調整できる。また神経細胞は、この結合蛋白を既に取り込んで持っており、フリーのエストラジオールが入ってきても捕捉できる。結合蛋白 FEBP/AFP は、母体と胎盤でつくられるエストロゲンの胎児への輸送にも働く。いっぽうテストステロンはフリーであり、神経細胞に入ることができる。結合蛋白 FEBP/AFP の合成は、性ホルモンの高い期間に一致し、生後には減少する (8,24)。生後の、性ステロイド結合蛋白は、アンドロゲンとも結合する。

胎児の神経細胞に入ったテストステロンは、アロマターゼによってエストラジオールに変換され (テストステロンの A 環が芳香化され)、受容体に結合する。このとき、変換されなかった少量のテストステロンと、テストステロンから変換された比較的大量のエストラジオールの、相乗作用によって男性化が起こるといわれる。女性の神経細胞も、生存・分化のために少量のエストラジオールは必要である。

すなわち、神経細胞の受容体に結合するエストロゲンの多いことが脳の男性化に必要であり、この点が性器の発達とは逆であることに注意を要する (8)。

脳の性分化が起こる時期と一致してアロマターゼが発現し、ラットでは受精後 18 日から生後 2 日にかけて (ヒトの脳では受精後 15 週から 20 週に相当) 最も高くなり、その後ゆっくり減少するが、生後 21 日 (ヒトの脳では出生間際に相当) でもまだ検出される (46)。アロマターゼの存在する部位は、性による二形性が現れる領域を含む視床下部や扁桃核である。そして、アロマターゼの活性および mRNA の誘導には、テストステロンが必要といわれる (14)。

ラットの雄の新生児を去勢すると、視索前野の内側核の細胞死が増え、この核 (雄では雌の

数倍大きい) が小さくなった(6)。いっぽう、出生から5日間テストステロンを注射した雌ラットでは、視索前野の室傍核前腹部の細胞死が増え、この核(雌では雄より大きい) が小さくなった(27)。また妊娠中でも、ラットの受精後16日(ヒトの脳では受精後11週程度)に、母親1匹当たり4 mgのテストステロンを注射して産まれた雌は、成長しても膣が開口せず、膀胱に隣接して精囊と前立腺がみられた。視索前野の内側核(雌では雄より小さい)の体積は2倍になっていた(21)。

以前には、妊娠中に天然あるいは合成のアンドロゲンやエストロゲン、黄体ホルモンによる治療を受けた婦人の女兒に、陰核の肥大など男性化が起こった例がある。ジエチルスチルベストロールを妊娠4～30週に投与された母から産まれた女兒の外性器の男性化は、胎児副腎に異常を起こしたことによる男性ホルモン生成の結果と推定されている(41,44)。脳の観察は報告されていないが、ジエチルスチルベストロールなど合成ホルモンは、エストロゲン結合蛋白と結合しないので(24)、脳の男性化が起こったかもしれない。黄体ホルモンの使用では、男児の尿道下裂も報告されている。これらはmgオーダーで投与された。その他にも、マウスからサルまで多種類の動物を使った、性ホルモンによる催奇形性の実験は数多い(41)。妊娠中とはいえ、生理的な性ホルモンの血中濃度は多くても $\mu\text{g/l}$ のオーダーであるから、投与量はかなり高い。環境化学物質でこのようなことが起こり得るかどうか分からないが、極めて強力な性ホルモン作用をもつ物質が存在するかもしれない。エストロゲン作用をもちながら、結合蛋白と結合せずにフリーで胎児脳内に入れば、脳の性分化に悪影響を及ぼす可能性がある。

I. 4. アロマターゼ活性の影響

水域汚染物質のトリブチル錫やトリフェニル錫が、巻き貝の雌にペニスができるなど、雌を雄化するメカニズムとして、アロマターゼ活性

の低下によるという説がある(52)。それによると、エストラジオールの合成には、テストステロンあるいは androstenedione が前駆体となり、アロマターゼの反応を受けるので、アロマターゼ活性が低下すると、前駆体のアンドロゲンが増えてしまうというが、詳細は不明である。実験的に合成アロマターゼ阻害剤や、環境汚染物質であるメチルコラントレンなどにサケの卵胞を曝露すると、エストラジオール分泌が低下するという(1)。カメの卵を雌になる温度で孵卵し、アロマターゼ阻害剤を投与すると、卵巢と精巢の中間 ovotestis ができる(9)。Cd、Co、Cu、Hg、Ni、Zn など重金属のイオンは、精巢 Leydig 細胞のテストステロン合成を阻害する(23)。これら金属イオンは胎盤を通過しないものが多いが、新生児期の曝露によるテストステロン低下は、脳のアロマターゼ活性および mRNA の誘導の低下につながり(前頁 I. 3)、性分化が障害される恐れがある。

すなわち、外因性化学物質がアロマターゼ活性を低下させた場合には、雄では脳の雌化、雌では性器の雄化という、両性に対する異なった影響が現れる可能性がある。アロマターゼ遺伝子をノックアウトしたマウスでは、雌は子宮が未発達で、雄は交尾できるが、交尾回数が極めて少なかった(16)。

交配直後の雌ラットにトリブチル錫を投与すると、子宮の脱落膜反応が抑制されて、胎芽の着床が阻害される(15)。われわれは、メチル水銀でも同様にマウスの脱落膜反応が異常になり、胎芽の着床異常が起こることを示した(22)。トリフェニル錫も妊娠ラットに投与すると、妊娠が継続しない(5)。これらの現象は、妊娠の成立に関わるホルモンに異常が起こった可能性を示すが、そのメカニズムは不明である。卵巢や副腎のアロマターゼ活性低下によって、エストロゲン合成が減少することで、妊娠反応に異常が生ずる可能性も否定できない。

II. 興奮性神経毒

興奮性神経毒性に関しては、主として興奮性アミノ酸の研究が進んでおり、その点では環境汚染化学物質とはやや異なるが、重金属などには興奮性神経毒性の疑われるものがある。多数のアゴニストやアンタゴニストが知られ、各サブタイプの受容体もクローニングされているので、毒性メカニズムが興奮毒性である環境化学物質については、解析がより容易かもしれない。

II. 1. グルタミン酸

1968年、チャイニーズ・レストラン・シンドロームの原因物質がグルタミン酸ソーダ(monosodium glutamate, MSG)であることがつきとめられた(42,43)。空腹でたった1杯の雲呑スープを食っただけで、首の背側から腕の焼灼感、胸の痛みや頭痛が起こった。当時の中華スープには大量の、例えばラーメン・スープ1杯には10gを越える、MSGが含まれていたと推定される(味の素社私信)が、スープを最初に食べる習慣のない我国では問題にならなかった。症状を引き起こすMSGの最低量は2~12gであった(43)。

翌年Olneyは、マウスの新生児に0.5~4g/kg体重のMSGを投与すると、視床下部弓状核の神経細胞が破壊されることを報告した。神経伝達物質グルタミン酸の興奮毒性によって、神経細胞がアポトーシスに陥ると考えられる。さらに、新生児期に10日間MSGを連続投与した児を育てると、摂食量はむしろ少ないのに肥満し、それでいて長骨は短く、雌は不妊になったことから、内分泌系の障害が示唆された(31)。視床下部一下垂体系の内分泌が障害され、成長ホルモンの不足による長骨の発育不全、性ホルモンの攪乱による不妊が起こったと考えられる。嗜眠性であったことも視床下部の障害と矛盾しない。

その後、ラットの新生児期にMSGを投与すると、高インスリン血症となることがわかった(40)。弓状核の神経細胞にはインスリン受容体があるので(54)、弓状核破壊によって、自律神経系を通じたインスリンのネガティブ・フィー

ドバックができなくなったと考えられる。

MSGを含む食品を摂取した場合の血中濃度の推移は、他のアミノ酸との関係で一定でないと思われるが、MSG水溶液をヒトが飲用した実験では、摂取1時間後までに急速に血中グルタミン酸濃度が上昇し、その濃度はマウスに経口投与した場合と比較して5倍であった(34)。経口投与で、マウスの新生児の視床下部弓状核に神経細胞死を起こすMSGの量は0.5g/kg体重であることから計算すれば(32)、ヒトはマウスより5倍感受性が高いとして、体重10kgの子供が1gのMSGを食せば危険な可能性がある。成獣のマウスの方が感受性が低く、2g/kg以上で神経細胞死が起こる。この計算式を用いれば、体重50kgの成人でも、20g以上のMSGを一度に食することは危険かもしれない。

II. 2. 胎児に対する毒性

MSGに対する脳の傷害感受性は、若齢動物の方が成獣より高いことから、ヒトでは胎児の傷害が危惧された。マウスの新生児の脳は、ヒトの受精後20~24週の脳の発達に匹敵する。われわれは経胎盤的に、グルタミン酸、アスパラギン酸がマウス胎児の脳の神経細胞死を引き起こすことを示した。傷害部位は視床下部弓状核に限らず、嗅球、視索前野、視床下部腹内側核、海馬に及んだ。また、これらの部位は血液脳関門がなく、化学物質に直接曝されることも示した(18-20,28)。傷害部位は内分泌の中枢であり、例えばエストロゲン受容体は、嗅球、扁桃核、内側視索前野、視床下部の腹内側核、弓状核などに強く分布する(47)。弓状核とそれにつながる中央隆起には、インスリン、プロラクチン、アンギオテンシンII、カルシトニンなどの受容体がある(54)。

II. 3. 神経興奮の影響

Olneyらは、成獣の雄ラット弓状核に神経細胞死を引き起こさない量のMSG(1g/kg)の注射によって、血中黄体形成ホルモン(LH)とテスト

ステロンが上昇することをみつけた(33)。弓状核神経細胞は、ゴナドトロピン放出ホルモン(LH/FSH-RH)を合成しているので、MSG による興奮刺激で LH/FSH-RH を放出し、下垂体から黄体形成ホルモン(LH)を放出させたと考えられる。それによって、精巣からのテストステロン分泌が上昇したと思われる。

また去勢した若いアカゲザルに、150 mg/kg のグルタミン酸あるいはアスパラギン酸を静注したところ、血中黄体形成ホルモン(LH)が有意に上昇した。卵胞刺激ホルモン(FSH)は、上昇したが、統計的有意でなかった(26)。その他にも、グルタミン酸、またはアゴニストを用いた実験で、ラットやサルに、黄体形成ホルモン、卵胞刺激ホルモン、成長ホルモン、プロラクチンの分泌を促進させたり、早期性成熟を起こした報告がある(34,38)。また逆に、グルタミン酸のアンタゴニストを用いれば、性成熟を遅らせることもできる(53)。環境化学物質のなかに、グルタミン酸アンタゴニストの作用をもつものがあるかもしれない。

すなわち、過剰量の興奮毒は視床下部の神経細胞をアポトーシスに陥らせることによって、中大量の興奮毒は神経細胞を興奮させ視床下部-下垂体系を刺激することによって、いずれも内分泌系を攪乱する。また逆に、グルタミン酸のアンタゴニストは神経細胞の興奮を阻害することで内分泌系を攪乱する。

II. 4. 実際に曝露される可能性

動物に黄体形成ホルモンの分泌を有意に上昇させる MSG の量は、弓状核に神経細胞死を起す量の 1/3 ~ 1/4 である。体重 50 kg の人に外挿すれば、1 回 5 g 以上の MSG を度々食すると内分泌が攪乱される恐れがある。とくに子供は感受性が高く、体重も少ないので、注意を要する。米国のスーパーマーケットで売っているスープ 180 ml には、最大 1.3 g のフリーのグルタミン酸が含まれており、清涼飲料水にはアスパルテームが入っている(34)。人工甘味料のアスパル

テームは、アスパラギン酸とフェニルアラニンのジペプチドであり、腸で加水分解されて2つのアミノ酸になる。アスパルテームの重量の 40 %がアスパラギン酸になるから、MSG の例から計算すると、アスパルテームを 10 g 以上食すると興奮毒性を示すかもしれない。とくに、清涼飲料水にアスパルテームが入っているような場合には、他の食物の干渉なしに吸収され、アスパラギン酸の血中濃度が上昇することになる。わが国で販売されている清涼飲料水では、低カロリーを特徴とするものにアスパルテームの表示があった。しかし、アスパルテームの甘さは砂糖の 160 倍強いので、多量に使用することはないと思われる。

その他に、同様な興奮性をもつアミノ酸として、システインがある。強さはグルタミン酸と等しいという(32)。これら興奮性アミノ酸が、飲食物にフリーの形で含まれた場合には、相加的な効果を現すので、食品に過剰な化学調味料や蛋白加水分解物を添加することを避けるべきと、Olney は警告している(34)。米国では、女児の第二次性徴の出現が過去に比べて1年以上早くなっているというが(52)、これと関係があるかどうか不明である。

II. 5. ドモイン酸

化学調味料や人工甘味料を含む食物を摂取することによって、視床下部に細胞死が起ったり内分泌が攪乱されるほど、興奮性アミノ酸の血中濃度が上がることはないと思われる。しかし 1987 年に、グルタミン酸の数百倍も強いアゴニストが出現した。この年、カナダで起こったムラサキイガイの食中毒事件では、少なくとも 107 人が罹患し、症状は嘔吐、腹痛、下痢、頭痛、記憶障害等であったが、4 人の死者が出た(37)。原因物質は、ある種の珪藻がつくるドモイン酸(domonic acid)であった。剖検では、海馬、扁桃核などの神経細胞死とグリオシスがみられ、実験動物にグルタミン酸アゴニストのカイニン酸を投与したモデルと酷似していた(50)。生存者