

第3章 内分泌学と内分泌毒性学

3.1 内分泌系とは

身体の内分泌系は、代謝過程の短期および長期にわたる調節に重要で広範囲に及ぶ役割を果たしている。成長(骨形成/再生を含む)や、腸、心血管、腎機能ならびにあらゆるストレスに対する反応と同様に、栄養、行動および発生の各過程もまた内分泌系によって複雑に制御されている。ホルモン分泌の過剰や不足などの内分泌系の障害は、必然的に疾病を引き起こし、その影響は様々な異なる器官や機能にまで及び、時には体の衰弱や生命の危険をもたらすこともある。このような一般的観点から見て、内分泌作用をもつ環境化学物質(アゴニストあるいはアンタゴニスト)がもたらす危険性はきわめて深刻である。しかしながら、ヒトや野生生物がそのような化学物質に暴露されていても、暴露の量、期間および時期に大きく依存するため、必ずしも内分泌系に關与したかく乱が臨床的に現れるとは限らない。

3.2 範囲および用語

3.2.1 概要

内分泌系とは、もともとは血液中にホルモンを分泌する分泌腺のみから構成され、分泌されたホルモンが離れた標的組織に運ばれて、特異的な細胞受容体に結合して特定の作用を発現すると考えられていた。現在では、神経細胞から血液中に分泌される化学物質(神経ホルモンと呼ばれる)などのように、調節に関わる別の化学物質が発見されて「内分泌」の概念が広げられた。「サイトクリン」という言葉は、局所あるいは細胞内における成長因子などの多くの化学調節因子を指す。ある組織の中で細胞外液を介して細胞間を移動するサイトクリンは、それらが別の細胞あるいは自身の細胞に作用するかによっ

て、それぞれ傍分泌(パラクリン)または自己分泌(オートクリン)調節因子と呼ばれる。「イントラクリン」とは、セカンドメッセンジャーおよび転写因子などの細胞内調節因子を指す。最近では、多様なサイトクリン/パラクリン系が作用していることが明らかになり「内分泌学」が一層複雑化してきたが、それ以前においても、血圧、平滑筋収縮、体液平衡、骨吸収など体内における様々な調節を担う「古典的意味」での内分泌系が数多く見出されてきた。

本章では、内分泌系全システムについて記述するのが目的ではない。ここでは、生殖系の発生および機能に關与する3つの主要な内分泌軸に焦点をあてている。これは、内分泌かく乱作用の多くが生殖系に關与しており、特に影響を受けやすい発生時期に多く観察されている結果に基づくものである。特別な観点からここで説明する内分泌系は、HPG、HPTおよびHPA軸である。特定の3つに限定したが、EDCsがこの他の内分泌軸に影響を及ぼさないということではない。全ての内分泌軸(おそらく傍分泌も)については、まず初期設定がなされ次に作用をする、という一般原則は明らかである。したがって、これから論じることの多くはここに記述されない他の内分泌軸にも基本的にあてはまるであろう。また、脊椎動物の内分泌系に重点をおき、無脊椎動物についてはほとんど論じていない。脊椎動物と無脊椎動物の内分泌メカニズムには多くの類似点があるが、いくつか大きな違いもある。この無脊椎動物の内分泌学についての総括論議も報告されている(Downer and Laufer, 1983; Matsumoto and Ishii, 1997; Cymborowski, 1992; Nijhout, 1994)。本章は2つの主要部分から構成されている。本章3.1~3.11では、成体および発生途上の生物における内分泌系の正常な機能について詳細を述べ、本章3.12~3.16では、

第3章 略語表

17 α ,20 β -P	17 α , 20 β -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン	DHT	ジヒドロテストステロン	LOAEL	最小毒性量
5-HT	セロトニン	DMP	フタル酸ジメチル	M1, M2	ピンクロソリン代謝物質
ACTH	副腎皮質刺激ホルモン	DOTP	フタル酸ジオクチル	MEHP	フタル酸モノエチルヘキシル
AGD	肛門生殖突起間距離	E2	17-エストラジオール	MIH	ミューラー管抑制ホルモン
AhR	芳香族炭化水素受容体	EDCs	内分泌かく乱化学物質	MIS	ミューラー管抑制物質
AR	アンドロゲン受容体	ER	エストロゲン受容体(, 異性	mRNA	メッセンジャーRNA
ARNT	AhR核移行因子	FSH	卵巣刺激ホルモン	MXC	メトキシクロル
AFP	-フェトプロテイン	Gal4-HEGO	Gal4 -ヒトエストロゲン受容体構成	NOAEL	無毒性量
BBP	フタル酸ブチルベンジル	GH	成長ホルモン	PCBs	ポリ塩化ビフェニル
BNF	-ナフトフラボン	GnRH	性腺刺激ホルモン放出ホルモン	PCDFs	ポリ塩化ジベンゾフラン
cAMP	サイクリックAMP	GSI	生殖腺指数	PGs	プロスタグランジン
CBG	コルチコトリピン結合グロブリン	GTH	性腺刺激ホルモン(II異性体)	PRL	プロラクチン
CRH	コルチコトリピン放出ホルモン	HIF-1 α	低酸素欠症誘導因子1	SARMS	選択的アンドロゲン受容体調節因
CYP	チトクロムP	HPA	視床下部-脳下垂体-副腎	SD	Sprague-Dawley系ラット
DBP	フタル酸ジ-n-ブチル	HPG	視床下部-脳下垂体-生殖腺	SERMS	選択的エストロゲン受容体調節因
DDE	ジクロロジフェニルジクロロエチレン	HPOA	視床下部視索前野	SHBG	性ホルモン結合グロブリン
DDT	ジクロロジフェニルトリクロロエタン	HPT	視床下部-脳下垂体-甲状腺	T3	トリヨードチロニン
DEHP	フタル酸ジエチルヘキシル	HPTE	2,2-ビス(p-ヒドロキシフェニル)-1,1,1-トリクロロエタン	T4	チロキシン
DEP	フタル酸ジエチル	IL	インターロイキン	TCDD	2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ジオキシン
DES	ジエチルスチルベストロール	IUGR	子宮内胎児発育遅延	TRH	甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン
DHEA	ジヒドロエピアンドロステロン	LE	Long-Evans系ラット	TSH	甲状腺刺激ホルモン
DHP	フタル酸ジヘキシル	LH	黄体形成ホルモン	US EPA	米国環境保護庁

EDCsが器官系や疾病過程に及ぼす影響に焦点をあてている。本章の大部分は、詳細に特性が研究されている例(例えば、メトキシクロル、ビクロゾリン、ケタコナゾル、フタル酸エステルおよびダイオキシン)を実験論文から引用して、生殖系の発生に及ぼす影響を扱っている。これらの例は、化学物質が内分泌系にどのように影響を及ぼすか、その基本的な作用機序の全容をみるため選択された。実験モデルで観察された臨界期、用量感受性および最終的な表現型についても、作用機序の解釈のために記載している。正常な内分泌機能を記述した節と同じく、この節では主に脊椎動物、特に哺乳類に対する影響を取り上げている。続いての節では、発がんおよび神経系や免疫系の機能に関わるEDCs関連作用の例を解説している。最終節では、実験室、野外調査あるいは疫学的な条件下で観察されたある種の影響が、EDCs関連作用に結びつくものであるかどうかを判断するための総括的な枠組みを提示している。この枠組みは、この評価に含まれているかあるいは科学論文に続いて報告された観察結果が、確認された作用機序に関連するものかを判断するための

基準を提供しようとするものである。

3.2.2 恒常性 (ホメオスタシス)

全ての内分泌系の基本的役割は、別の器官で発生した信号および身体の外からの合図に対し、離れた標的組織が動的に適切に反応できるようにすることである。内分泌系における主要な目的は、多くの場合、ホルモンの量や反応の激しい変化を抑えて代謝機能が損なわれないよう一定の“恒常性 (ホメオスタシス)”を維持することである(Norman and Litwack, 1998)。その一例として、血糖値を正常な範囲に維持するインスリンの役割があげられる。すなわち、血糖値が正常範囲よりも低くなりすぎることによる意識喪失、また高くなりすぎることによる尿中への過剰排泄/漏出が起こらないように調節している。もしインスリンが血中グルコース濃度の変化に反応しなければ、糖尿病などの疾病を引き起こすことになる。全ての内分泌系は大体において「シーソーの原理」(図3.1参照)で作動しており、標的細胞が制御細胞にフィードバック信号(通常はネガティブフィードバック)を送っている。

その結果、標的細胞が分泌した1つあるいは数種類の物質によって、標的細胞刺激ホルモンの分泌量が変化(通常は減少)する (Darlington and Dallman, 1995)。しかし、実際には、このような単純な典型的内分泌系であっても精巧で緻密に構成されており、身体全ての内分泌系はクロストークにより統合されている。この理由は明白である。例えば、生殖についていえば年齢や栄養状態、またほとんどの動物では季節などの要因を考慮する必要がある。同様にストレス反応では、空腹をコントロールする内分泌系は少なくとも危険にさらされた時には他の内分泌系の制御に置き換わる必要がある。このクロストークは健全な生命活動に不可欠であり、EDCsの評価に重要な意味合いをもつ。例えばエストロゲン様物質に暴露された場合、生殖系だけではなく骨、脂質、心血管系などの別の内分泌系にも影響を及ぼす可能性があるからである。

中枢系からの制御
(例えば神経など)

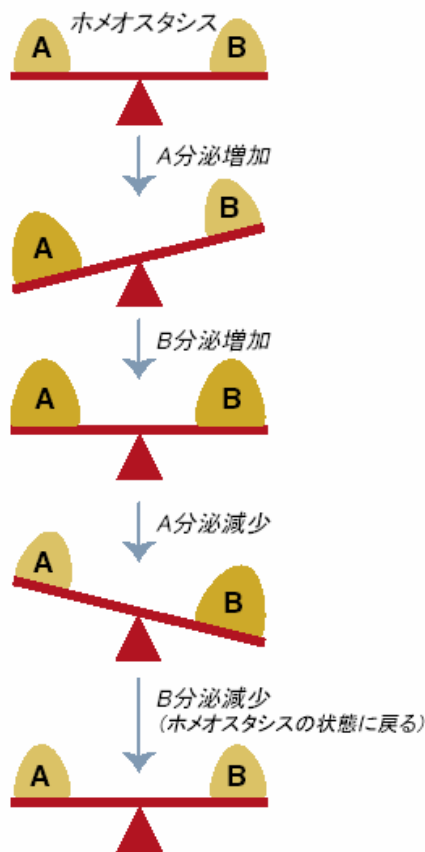
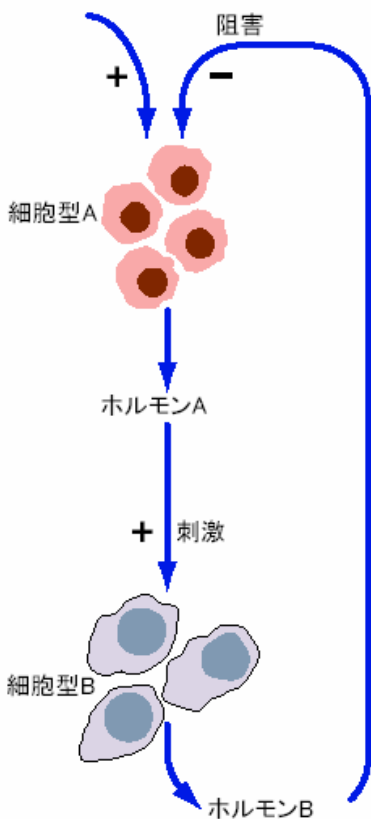


図3.1 内分泌系が作用する基本的な「シーソー」原理を図解した概略図。細胞型AはホルモンAを分泌し、これが細胞型BによるホルモンBの産生を調節する。続いてホルモンBが、ネガティブフィードバックによりホルモンAの分泌を調節する。このようにして、ホルモンAあるいはBの分泌は、右図に示すように、ホメオスタシス(すなわち、AおよびBの適正濃度)を維持するため相補的に上下する。この一般的な原理は、すべてではないが、大部分の内分泌および傍分泌系において機能しているが、実際には、ホルモンAおよびBの濃度調節に相互作用する付加的な要因がある。

3.2.3 内分泌軸のプログラミング

シーソー型機構による恒常性は、全ての内分泌系における主要な特徴であるが、重要なのは、この機構が適切に働く前に、

「シーソー」の両サイド間のバランスが設定あるいはプログラムされる必要があることである。シーソーがどの段階で反対側からの信号にตอบสนองし始めるかはこのプログラム設定により決定される(図3.1)。哺乳類の多くの内分泌系の設定プログラムは、胎児/新生児の発生時期に成立するが、もしこの段階で異常な環境におかれると永久に修復不可能なプログラムミスが起こってしまうことがある(De Kloet et al., 1988; Seckl, 1999)。IUGRの結果として現れる症状はその一例である。IUGRでも出生後正常な成長をする場合が多いが、インスリン抵抗性(インスリン濃度が通常より高い)の発生率が高く、その結果、後に糖尿病、肥満、心血管系疾患が生じる危険性が增大する。

さらに、思春期早発症を引き起こす傾向もある。これらの変化は、自身に適切な栄養供給を行おうとする胎児の適応の結果と考えられ、胎児のグルココルチコイド濃度の上昇に起因する可能性がある(Philips et al., 1998)。また特異的な例では、雌には雄にみられない視床下部のプログラムがある。これは、排卵のためのGnRH誘導によるLH放出というポジティブ応答を引き金とした、エストロゲン濃度の上昇にตอบสนองする。哺乳類では、このプログラムは周産期に設定されるが、ある程度のレベルの雄の性ステロイドをこの時期の雌に暴露すると、このプログラム設定が妨害され、無排卵性不妊症を引き起こす(Dohler, 1991)。しかし、雌の成体を同様に雄の性ステロイドに暴露しても、ネガティブフィードバックにより一時的に排卵が阻害される可能性があるが、プログラム自体は変わらない(図3.2)。

3.2.4 内分泌かく乱化学物質の影響

内分泌かく乱化学物質が身体機能に及ぼす影響の可能性を考える際には次の点が重要である。

- (1) 成人期の暴露は、正常な恒常性機構で補われることにより、深刻なあるいは顕著な影響を示さない可能性がある。
- (2) 内分泌系のプログラム設定過程における暴露は、刺激抑制の信号に対する機能あるいは感受性を永久

的に変化させるおそれがある。

- (3) 同レベルの内分泌信号を受けても、発育段階の時期の違いや季節の違いなどにより異なった影響が生じることがある。
- (4) 異なった内分泌系間のクロストークにより、影響が現れると推測された以外の内分泌系に予期し得ない結果が生じる可能性がある。これは上記の(1)~(3)についてもいえる。
- (5) (4)の観点から、*in vitro*でのホルモン活性の測定から*in vivo*での状態を推定する際には十分慎重に行わなければならない。

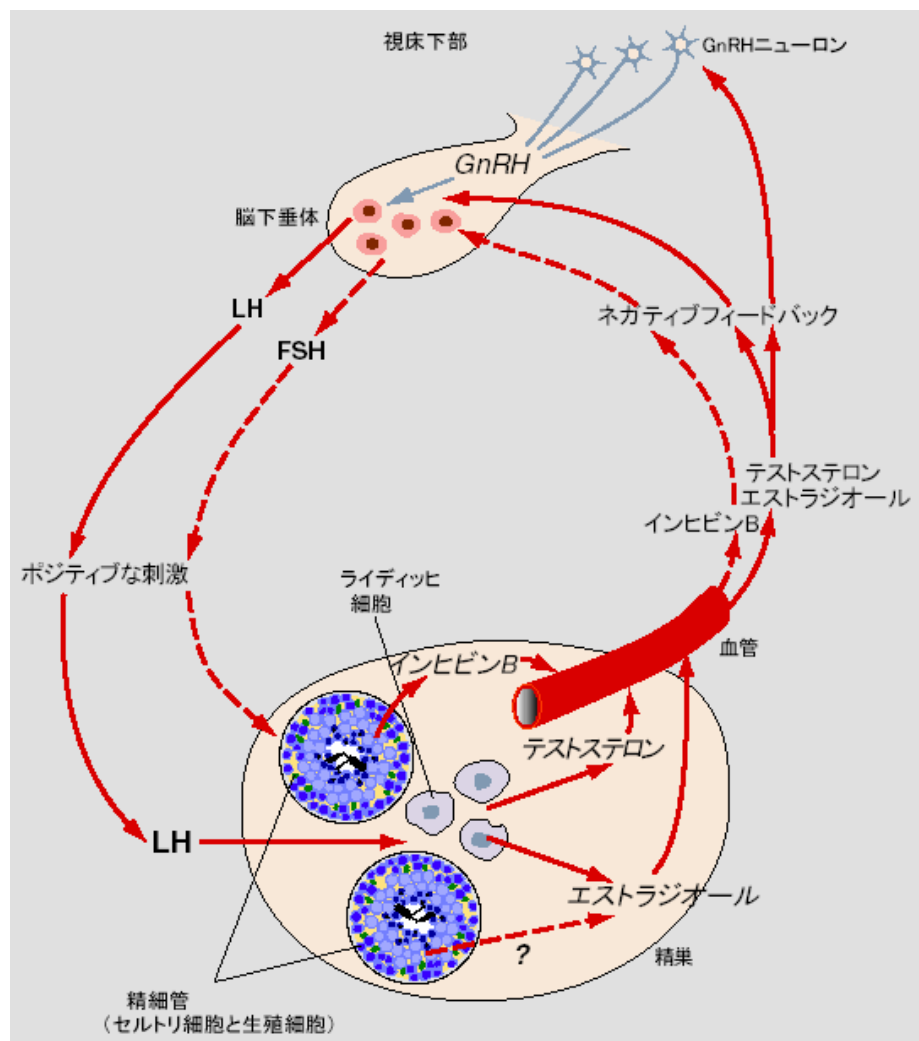


図3.2 哺乳類のHPG軸の主な機能因子の模式図。デカペプチドであるGnRHは、GnRHニューロンの末端から門脈血液系に分泌され、GnRH受容体を発現する脳下垂体前葉中の性腺刺激ホルモン産生細胞に「信号メッセージ」を伝える。GnRHがこれら受容体に結合すると、2種類の性腺刺激ホルモン、LHおよびFSHの合成と血流への分泌が促進される。その後、これらのホルモンは全身の血流にのり、生殖腺の遠隔標的細胞(例として精巣を示す)に到達する。LHは、ライディッヒ細胞に作用してテストステロンの合成および分泌を促し、続いて、テストステロンは血流にのり、視床下部および脳下垂体前葉に働きかけることにより、それぞれGnRHとLHの合成および分泌を抑制する(=ネガティブフィードバック)。同様に、FSHは、セルトリ細胞に作用してタンパク質ホルモンであるインヒビンBの分泌を促進する。インヒビンBは、血流を介して脳下垂体に到達し、FSHの合成および分泌を抑制する(=ネガティブフィードバック)。テストステロンのネガティブフィードバック作用のいくつかは、精巣(ライディッヒ細胞および精原細胞)、あるいは視床下部/脳下垂体におけるテストステロンからE2への変換を介して起こることに留意する必要がある。さらに、テストステロンおよびE2が視床下部や脳下垂体以外の多くの場所で影響を及ぼすこと、また、これらホルモンの傍分泌影響、とりわけ精巣中のテストステロンの傍分泌影響は生存に関わる重要性をもつことにも留意すべきである。ここに示した基本系のこれらの点および他の細かな点については本文中で解説した。

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)には次の3つの要素が含まれている。1) 脳の視床下部から伸びるGnRHニューロン、2) LHおよびFSHを分泌する脳下垂体前葉(腺下垂体)のゴナドトロピン分泌細胞、3) 生殖腺の体細胞(卵巣中の卵細胞および顆粒細胞、精巣中のライディッチ細胞およびセルトリ細胞)である。GnRHは、GnRHニューロンの終末からパルス状に分泌され(Kimura and Funabashi, 1998; Terasawa, 1998)、ゴナドトロピン分泌細胞に働きかけてLHおよびFSHの分泌を促す。そして、それらは性腺におけるそれぞれの標的細胞に作用する(LHは卵胞/ライディッチ細胞; FSHは顆粒細胞/セルトリ細胞)。GnRHの分泌は、他のニューロンによって調節され(Crowley, 1999)、また、性腺刺激ホルモン分泌を促すGnRHの作用も他の視床下部や下垂体のペプチドにより調節される(Evans, 1999)。こうして、LHの刺激により生殖腺の性ステロイドが、またFSHの刺激によりタンパク質ホルモンのインヒピン(雌ではA型、雄ではB型)が血流中に放出されると、視床下部および下垂体のゴナドトロピン分泌細胞へのフィードバックが起こり、その結果GnRH、LH、FSHの分泌が抑制される。インヒピンは、選択的にFSHを抑制し、性ステロイドはLH分泌を抑制する(Crowley et al., 1991)。この機構を示す刺激とネガティブフィードバックの経路の模式図を図3.1に表している。実際には、この構造はより複雑で精密である。例えば、LHおよびFSH分泌に対するGnRHの作用は根本的に異なっており、LH分泌はGnRHのパルスによって非常に急激な(パルス状)の刺激を受けているのに対し、FSHの応答は非常に緩慢で数時間を要する(Crowley et al., 1991; Bousfield et al., 1994)。これは、GnRHが誘導するLHおよびFSHの合成、貯蔵、分泌の基本的な違いから生じる。同様に、性ステロイドホルモン(主に雄のテストステロン、雌のE₂)は、GnRH分泌およびゴナドトロピン分泌細胞の機能の両方に作用してLH分泌を抑制するが、さらに、FSH分泌に対してもネガティブフィードバックをかけている。それに対して、インヒピンは選択的にFSH分泌を抑制している。

3.3.2 標的細胞の感受性

このような典型的な内分泌系の微細な調節機構に加えて、考慮されなければならない重要な要素が他にある。1つは、刺激に対する標的細胞の感受性の調節である。ゴナドトロピン分泌細胞は、GnRHの刺激に対して常に一定で不変の応答をしているのではなく、また、生殖腺における標的細胞も、LH/FSHの刺激に一定の応答を続けているのではない。刺激を与える側に対する標的細胞の感受性は、迅速な応答と長期にわたる応答の両方で制御されている(Conn, 1994; Erickson and Schreiber, 1995)。例えば、異常に高いGnRHパルス、また長期にわたるGnRHやGnRH様物質(分解されにくい)への暴露は、ゴナドトロピン分泌細胞のGnRH受容体の機能消失あるいは低下(ダウンレギュレーション)につながり、より強い刺激にも抵抗性(=感度の低下)をもつようになる。これは

数時間のうちに急速に起こり、「脱感作」が徐々に進行するために長時間にわたり持続する。この脱感作は、GnRH刺激によるセカンドメッセンジャーの信号伝達系が変化することに関係しており、GnRHに対するゴナドトロピン分泌細胞の応答が全体的に低下する。類似したメカニズムが生殖腺細胞でも作動しており、LHあるいは少ないがFSHに対する応答を調節している。言い換えれば、内分泌系の各標的細胞は、刺激に対する自分自身の応答を調節しているのである。このプロセスにはさらに近傍の細胞間、特に生殖腺におけるクロストークを介した微細な機構が存在する(Leung et al., 1992)。例えば、精巣中のセルトリ細胞は、近隣のライディッチ細胞のLH受容体数の調節およびステロイド合成酵素の発現を変化させてステロイド合成反応の調整をすることができる(Sharpe, 1993)。反対にライディッチ細胞から分泌されるテストステロンは、セルトリ細胞の機能に対して重要なパラクリン調節作用を行っている(Sharpe, 1994)。

3.3.3 内分泌ホルモンの代謝

HPG軸を構成する経路においてさらに重要な調節因子は、分泌されたホルモンの代謝である。ホルモンの異化作用の増加や減少の結果、半減期が変化することで分泌量は変わらないままその効果に影響が現れてくる。通常、FSHはLHより半減期が長い(すなわち、ゆっくり代謝される)、このことは、FSH量の変化がLH量の変化に比べて緩慢である理由のひとつである(Bousfield et al., 1994)。さらに重要なのは、性ステロイドに結合するタンパク質の役割である。これには、胎児/新生児におけるアルブミン、AFP、そして、最も重要であるヒトのSHBGなどがある。ヒトの血中テストステロンやE₂の約97%~98%はSHBGと結合しており、フリーで生物学的活性のあるものはわずか2%~3%である(Moore and Bulbrook, 1988; Rosner, 1990)。このような仕組みには2つの重要な効果がある。すなわち、1)性ステロイドの半減期がかなり長くなる、2)性ステロイド作用を制御する新たな間接的経路として、SHBG分泌(肝臓より)の調整により、HPG軸の主要な構成要素に影響を及ぼすことなく、生物活性を示す性ステロイド量を変えられる、ということである。実際に、他の内分泌系に属する重要な制御因子と同様に、性ステロイド自身もSHBG生成の主要な制御(刺激)因子なのである(Moore and Bulbrook, 1988; Rosner, 1990)。他の結合タンパク質についても同様なことが言える(例えばAFP)。

3.3.4 HPG軸におけるパラクリンおよびエンドクリン成分の相互作用

ライディッチ細胞で生成されたテストステロンは、近隣のセルトリ細胞に作用する(パラクリン効果の1例)。このセルトリ細胞への作用は、精子形成を助ける主要な経路であり雄におけるテストステロンの最も重要な役割である(Sharpe, 1994)。卵巣でも同じような作用がみられ、卵細胞で生成されたアンドロゲンが隣接する顆粒細胞にパラクリン効果を発揮して卵胞を成熟させる(Erickson and Schreiber, 1995)。テストステロンの顆粒

細胞への作用で最も重要なことは、アンドロゲンがE₂に変換することであり、これによりネガティブフィードバックも含めて子宮や身体他の場所での多岐にわたる内分泌効果が発揮される。テストステロンのE₂への変換は、雄、雌ともに身体の多くの場所で行われている(Simpson et al., 1997; Sharpe, 1998)。アロマトラーゼや5 α -レダクターゼを発現して、内分泌ホルモン(テストステロン)を局所で作用するパラクリンホルモン(E₂あるいはDHT; 図3.3)に変換するという細胞の働きは、当初の仮説よりもごく一般的な役割(特に雄で)であることが明らかになった。このようなパラクリン作用の場合は、基質の供給そして中心となる内分泌系に明らかに依存している。また概念的には重要ではないかもしれないが、パラクリンによる生成物が「漏出」して循環することがネガティブフィードバック作用に寄与している。現在では図3.3に示されたパラクリン機構の構成要素の一つまたは両方が、雄および雌の生殖系の場合と同様に、骨、筋肉、心血管系、脂肪組織、脳下垂体、脳においても作用していることが知られている(Simpson et al., 1997; Sharpe, 1998)。パラクリン機構は局所的な要求に対応するという意味で、主要な内分泌系のローカルサテライトとしての役割をもつと考えられる。

3.3.5 発生におけるHPG軸の役割

先に述べたように、内分泌系の初期設定の大部分は胎児/新生児期に成立する。この期間に、生殖腺からのステロイドに対する視床下部および脳下垂体ゴナドトロピン分泌細胞のフィードバック感受性が確立され、これにより、GnRHやLH/FSH分泌の抑制を誘起するための性ステロイド量が決定されるのである。この過程がどのように起こるかの詳細は解明されていないが、神経経路のプログラム設定が関与することは明らかである(Dohler, 1991)。同時に、雄および雌のフィードバック中枢の差異がプログラムされる(Dohler, 1991; Gorski, 1996)。雌の生殖系は発情期、月経周期などの生殖周期にしたがって機能する一方、雄の場合は、通常、周期に関係なく連続的でより長期にわたるため、この差異が必要になる。したがって雌の性腺ホルモン合成が周期的であるのに対して、雄では思春期および季節性不妊の特別な時期を除けば比較的一定している。成体雌の脳下垂体が雄でなく雌として確実に応答するためには、発生過程において雄と雌の視床下部の「配線」に適切な変化がなければならない。胎児/新生児期に合成されたテストステロンは、「雄」の視床下部および脳の発達をプログラムする役割を果たしている。また、この重要なプログラム設定時期に雌へのテストステロン投与を行うと、視床下部機能の雄性化が生じ、その結果、成体期における性周期異常や無排卵を引き起こす(Dohler, 1991; Gorski, 1996)。テストステロン、DHTおよびE₂の相対的な役割は、種特異的な様式によりそれぞれ異なっている。これは器官形成や生理的活性化に及ぼす影響についても同じことがいえる。ある種では、この3つのホルモン全てが雄性化の働きをする(Cooke et al., 1998)。重要なことは、性的二型性行動の発

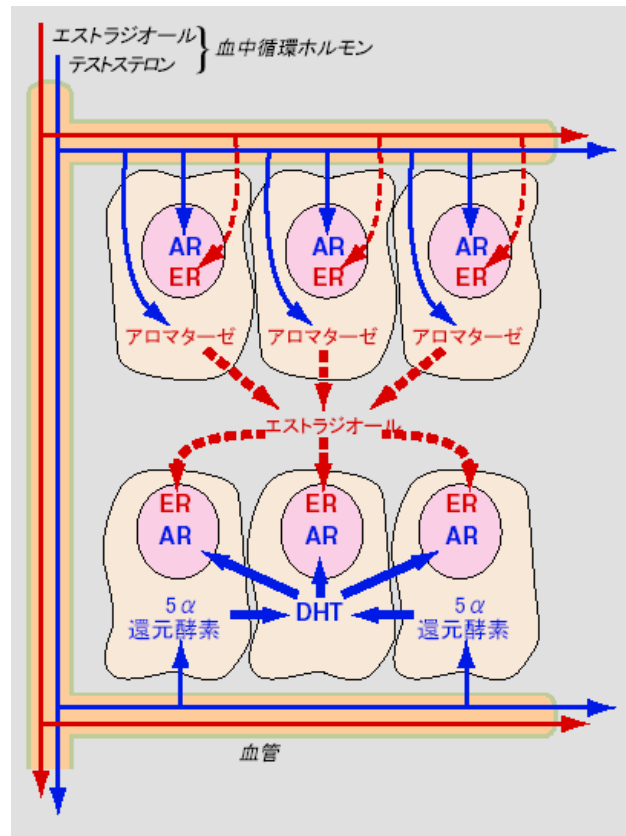


図3.3 アンドロゲンとエストロゲンを例とした内分泌および傍分泌調節系間の相互作用の概略図。テストステロンおよびE₂の両者は内分泌ホルモンとして血流中を循環するが、特異的な細胞型の内部において、テストステロンはE₂に変換される(アロマトラーゼ酵素による)。E₂は、ERsと相互作用するか、あるいはさらに強力なアンドロゲンであるDHTに変換され、ARsと相互作用する。このいずれの変換ステップも、比較的弱い「内分泌」信号を、標的細胞に局所的に作用できるより強力な「傍分泌」信号に効果的に増幅する。全身性および局所由来のE₂は同じERsと相互作用し、また同様に、全身血流由来のテストステロンと局所由来のDHTが同じARsと相互作用しているため、内分泌系と傍分泌系とが、極めて単純な機構を用いていかに有効に相互作用しているかを示している。傍分泌影響を引き出すような高濃度のホルモンの局所的な産出は、当該組織の局所的な必要性に応じて標的細胞の機能を制御する手段であるが、血液由来のホルモンを介して、同じ組織に対する全体的な内分泌の影響はそのまま維持されている。

達における器官形成や活性化の制御には、種による著しい差があることである(Cooke et al., 1999)。例えばラットでは、雌成獣ラットにおける雄のようなマウンティング行動の出現には、胎児期に器官形成に関わるホルモンの影響がなくてもよい。少なくとも何種類かのラットでは、この行動は雌成獣ラットのテストステロンにより誘起することができる。ラットとは対照的に、ヒト以外の霊長類では、アンドロゲンがマウンティング行動を形成するのに重要な役割を果たしている(Goy, 1978; Pomerantz et al., 1985)。ラットの知見をヒトに外挿する際にはこの違いを考慮しなければならない。ラットおよびアカゲザルの両者における無秩序な戯れ行動は、アンドロゲンによって制御された数少ない社会行動の1つである(Goy, 1978)。

3.3.6 哺乳類の性分化におけるホルモンの役割

周産期に精巣から分泌されるテストステロンは、通常、脳の雄性化を導くとともに身体の雄性化にも重要な役割

を果たしている。これは雄性生殖器官の形成に関わるが、この時期には身体全体の多くの器官にも影響が及ぼされる(Simpson and Rebar, 1995)。性分化におけるアンドロゲンの役割はかなり解明されている。哺乳類の胚は、性分化が始まる前には雄あるいは雌の形質を発現する可能性をもっている。生殖腺の性分化に続いて、精巣組織から雄性生殖輸管系と外生殖器の分化が誘導される。表現型の性の発達とは、ウォルフ管(雄)あるいはミュラー管(雌)のいずれかの維持と外生殖器の分化などである。一般に、問題となる組織/器官の雄性化は、図3.3に示されるように、循環するテストステロンが局所でDHTまたはE₂に転換することにより引き起こされるが、一部の組織ではMISも関与している。

雌は単に卵巣からのテストステロン分泌のスイッチを入れられないことによって、雄としての発生を回避しており、表現型あるいは内分泌型としての雌になるのは、この内分泌信号の欠如に大きく依存している(Simpson and Rebar, 1995)。雄性化を促進する上でのテストステロンの中心的役割には、2つの大きなマイナスとなる側面がある。まず一つには、遺伝子型においての雄がテストステロンを産生できなければ雄性化は起こらず、表現型での雌(しかし精巣を有する)になるであろう。二つめに、反対に遺伝子型での雌が大量のテストステロン(あるいは他のアンドロゲン)に暴露されると雄性化される(しかし卵巣を有する)。このような例は共に数多くみられ、最も一般的には、不活性型変異(ARの変異では雄の雄性化が起こらない)が原因となり引き起こされるか、あるいは母親が雌の胎児でのアンドロゲン異常生成(通常は副腎から)が、雌となる過程を雄性化に導くことによる(Simpson and Rebar, 1995)。さらに大事なことは、これらが必ずしも、起こるか起こらないかという絶対的な事象ではないということである。きわめて微妙な影響が生じるような雌の部分的雄性化や、雄の雄性化の部分的欠如が起こりうる。このような影響が外生殖器や他の外面的な形質的特徴(例えば角の有無)に現れる場合は、容易に検出されるかもしれないが、脳やその他の器官に影響が生じれば、推測するのは容易ではないであろう。

脳および外生殖器のように、肝臓や筋肉のような他の器官においても、発生過程のホルモン環境により「刷り込み」が起こるため、生命の様々な段階で正常な内分泌系を乱す生体外物質の標的になる可能性がある。例えば、肛門挙筋 - 球海綿体筋の発達およびそれらの神経制御は、ラットの性的二型性の個体発生におけるテストステロンの器官形成および活性化に関する役割のモデルとして研究されている(Breedlove et al., 1999)。これらの組織はヒトでも性的二型性であり、影響を受けやすい臨界期は妊娠初期の3カ月にある。肛門挙筋および球海綿体筋脊髄核は、雄のラットは雌に比べてかなり大きく、出生前と成熟期後の両段階にテストステロンの暴露が必要とされる。肛門挙筋には5 α -レダクターゼがないため、雄性化の発達を開始させるホルモンは、DHTではなくテストステロンである。

このような様々な「プログラム設定」の変化の中で最

も重要な点は、おそらくそれらの不可逆性であろう。EDCsに関する最大の関心は、動物が出生前後にこのような物質に暴露することで、永久的な有害あるいは異常な変化が生じる可能性という点に集中している。ホルモンかく乱物質の暴露は長期である必要がなく、発生における臨界期での一時的な暴露だけでよい。この点に関しては、いわゆる選択的エストロゲン受容体調節因子(SERMs)(Cosman and Lindsay, 1999)および対応するSARMs(Negro-Vilar, 1999)のように、異なるアンドロゲンやエストロゲンが異なる組織にどのように作用するかについて解明が進んだ結果、さらに不確実性が増した。特定の組織におけるエストロゲンやアンドロゲン経路を選択的に活性化または阻害する化合物の働きが、いくつかの環境化学物質の類似作用の検出を予知する手だてとなるが、生殖系とそれに関わる内分泌系の発達のプログラム設定という観点からは、そのような化合物の影響を予測するのは極めて難しい。

3.3.7 哺乳類以外の種におけるHPG軸

哺乳類以外の脊椎動物の生殖様式は、哺乳類とは著しく異なり、またそれぞれの種によっても違いがある。多くの主要な種では雌雄同体、単為生殖、胎生、雌雄異体の形式が順次あるいは同時に見られる(van Tienhoven, 1983)。さらに繁殖頻度も限定されている。ある種では一生に一度だけ繁殖(一回繁殖型)するが、他の種では何度も繁殖(繰り返し繁殖型)するものがある。1年の大半の時期は生殖腺が休止状態にあり、活動期はごく短期間という場合もある。精巣と卵巣の発達が一年の異なる時期に起こる解離生殖が、多くの種で知られている(e.g., Houck and Woodley, 1994)。しかしながら、これらの動物のHPG軸における作用、フィードバックメカニズムの型、ホルモンは哺乳類のそれと驚くほど似ているのである(総説に関してはNorris, 1997; Bentley, 1998参照)。

哺乳類以外の全ての動物のGTH放出は、哺乳類のものに類似したGnRHデカペプチド分子によって制御されている(Sherwood et al., 1994; Sower, 1998)。哺乳類ではこれらの細胞が鼻板中で発達し、発生の初期段階で視索前野および視床下部へと移動する(Dellovade et al., 1998)。少なくとも2つの典型的なGnRHの型が見つまっているが、そのうち第2の型(通常、ニワトリから最初に分離されたGnRH-IIをさす)は、基本的には神経伝達物質あるいは神経調節因子として機能し、おそらくHPG軸ではなく生殖行動に影響を及ぼしている。さらに、多くの硬骨魚類の脳には3つの型のGnRHが存在する。大きな相違点は硬骨魚類のGnRHの輸送形式にあり、視床下部と脳下垂体を結ぶ視床下部-脳下垂体門脈系が欠如しているために、GnRH軸索から直接脳下垂体前葉への浸透(penetration)が起こる。無顎魚類も門脈系輸送を欠いており拡散(diffusion)が伝達的方式となっている(Gorbman, et al., 1999)。

哺乳類のFSHおよびLHに直接相同性をもたない2つの異なるGTHが存在する。第1のGTHはGTH-Iと呼ばれ、生殖腺の発達および配偶子形成に関わっており、第2の

GTH、すなわちGTH-IIは配偶子放出に関与している。いずれかのGTHが十分な量あれば両方の効果を発揮できるが、*in vivo*では逐次分泌されている。四肢動物(両生類、爬虫類、鳥類および哺乳類)の中で有鱗の爬虫類(トカゲ、ヘビ)だけが単一のFSH様GTHをもつとみられ、他の全ての動物ではFSH様およびLH様の両GTHを産生している。

一般に、テストステロンはすべての脊椎動物で生成される主要なアンドロゲンであり、 E_2 は主要なエストロゲンである。多くの硬骨魚類の雄は11-ケトテストステロンも生成しており、これは多くの種において体内循環する主要なアンドロゲンである。硬骨魚類の雌もテストステロンを生成しており、このテストステロンの循環量は E_2 と同程度と考えられる。また硬骨魚類は重要なプロゲステロン様分子である $17\alpha,20\beta$ -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン($17\alpha,20\beta$ -P)および $17,20\beta,21$ -トリヒドロキシ-4-プレグネン-3-オンを生成し、卵母細胞の最終段階の成熟と排卵を誘起する。これはGTH-IIの影響下で分泌されている。このステロイドは、交尾行動におけるフェロモンとしての作用ももつと考えられる。ある種の硬骨魚類では、副腎皮質細胞から生成されたコルチコステロイド、デオキシコルチコステロンが最終段階の卵母細胞成熟と排卵を引き起こすことが示された。四肢動物ではテストステロン、 E_2 、プロゲステロンを分泌し、これらの生殖的役割は哺乳類の発生と生殖で観察されるものに類似している。全ての四肢動物で分泌される第2のアンドロゲンはDHTである。両生類の雌は硬骨魚類と同じく、生殖期においてエストロゲンと同様にアンドロゲンを大量に産生しているが、雌の爬虫類および鳥類の血液中には通常、アンドロゲンはほとんど見られない。いくつかの違いはあるが、標的細胞に対するステロイドの作用メカニズムや特性は、哺乳類のシステムに類似しているようである。例えば、 $ER-\alpha$ および $ER-\beta$ に加えて、第3の別の亜型の $ER-\gamma$ が硬骨魚類で見つかった(Hawkins et al., 2000)。さらに、硬骨魚類のプロゲステロン受容体は、ステロイドへの結合親和力において哺乳類の対応物質とは異なり、哺乳類のプロゲステロン受容体が結合する多くのEDCsには結合しない(PinterとThomas, 1997)。したがって、脊椎動物の種間にわたるEDCsの影響を推定する際には注意しなければならない。

生殖腺の完全あるいは部分的な性転換は、アンドロゲンによる雌性化などの多くの逆説的な影響を含め、卵、幼生、幼体などの初期段階にエストロゲンやアンドロゲンに暴露されることにより引き起こされる可能性がある(Burns, 1961; Hayes, 1998a, 1998b)。さらに、アンドロゲンは、通常雌の輸管系(ミュラー管)の発達を阻害する一方、雄の輸管系(ウォルフ管)の発達を促進しており、エストロゲンはその逆を行う。アンドロゲンは、MIHまたはMISによるミュラー管の退縮を促進する。エストロゲンはMIHから卵管を保護すると考えられ(Norris, 1997)、また、アンドロゲンの逆説的な作用も報告されている(Norris et al., 1997a, 1997b; Clark et al., 1998)。EDCsは、エストロゲンの模倣や抗アンドロゲン作用を示して、

発生過程や幼若期に暴露された野生生物に対して明らかに深刻な影響を与えているのである。

エストロゲンは、鳥類の卵管細胞での卵白アルブミンタンパクの合成(Schlinger and Saldanha, 1998)、および肝臓でのピテロゲニン合成も刺激している(LeFleur, 1998; Meyer, 1999)。ピテロゲニンは、卵に組み入れられる卵黄タンパクを合成するために卵巣で使われる前駆物質である。ピテロゲニンの合成(卵黄形成)は、卵黄を有する卵を産卵する脊椎動物成体(魚類、両生類、爬虫類および鳥類)のエストロゲン活性に対する強力な生体指標となる。エストロゲンは、血漿ピテロゲニン濃度を上昇させるが、また肝臓における過形成や肥大も引き起こす。雄あるいは未成熟な雌がエストロゲンに暴露すると、肝臓でのピテロゲニン生成が誘導される(Matthiessen, 1998; Matthiessen and Sumpter, 1998; LeFleur, 1998; Meyer, 1999)。したがって、血漿ピテロゲニンは環境エストロゲンへの暴露を測る生物指標として用いることができる。硬骨魚類、両生類、鳥類では、卵黄形成はPRLまたはGHIによって促進されるが、軟骨魚類、トカゲおよびカメではPRLは抑制する働きをもつとみられる(GrauとWeber, 1998)。PRLはさらに養育行動を刺激し、抱卵斑などのエストロゲン依存の第二次性徴を促進する(Jones, 1971)。

プロゲステロンおよびプロゲ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りそれぞれ両生類、硬骨魚類の非遺伝子的な卵細胞成熟を調節している(Paolucci et al., 1998)。卵管からの分泌(Chester Jones et al., 1987)、およびアルギニンバソトシン存在下での両生類の輸卵管収縮の感受性はプロゲステロンに依存している(Guillette et al., 1985)。明らかに、プロゲステロンはコモチガマ(*Nectophrynoideis occidentalis*)の幼生期の発生を遅らせている(Bentley, 1998)。カメでは、哺乳類と同様にプロゲステロンが収縮性を低下させている(Paolucci et al., 1998)。ステロイドが細胞膜上の特定の受容体に結合することによって細胞表面を介した迅速な非遺伝子的作用を引き起こすことは、環境化学物質によるその生理学的過程のかく乱だけでなく、ステロイドによるその補助制御にも影響があることを示している(Revelli et al., 1998)。

3.4 HPA軸

3.4.1 HPA軸の概要

HPA軸は、HPG軸について記述された作用と同様の働きをもつが、大きな違いは関与している調節因子および分泌される分子にある(Becker, 1995)。CRHは視床下部のニューロン終末から分泌され、ACTHの合成および分泌を調節するために、脳下垂体前葉の副腎皮質刺激ホルモン分泌細胞に働きかける。分泌されたACTHは血流によって副腎に運ばれ、そこで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)の分泌を刺激する。後者は、炭水化物、タンパク質および脂肪の代謝、炎症作用、またストレス反応の調整などの重要な役割を持ち、身体全体にわたり多くの影響を及ぼしている(Becker, 1995)。他の内分泌軸のように、標的細胞の産物であるグ

ルコルチコイドはCRHの分泌を抑えるために、ネガティブフィードバックを行うことで視床下部と脳下垂体における量を調節している。ヒトの循環血中グルコルチコイドの多くは、性ステロイドホルモンと同じように結合タンパク質(CBG; コルチコトリピン結合グロブリン)に結合しており、局所におけるCBGからの生体活性ホルモンの放出は、炎症に対する組織の局所反応メカニズムの一つである(Rosner, 1990)。グルコルチコイドが発生における「プログラム設定」に重要な影響を及ぼし、またこれらのホルモンの循環量の変動が、他の内分泌軸の発現時期や設定値にも影響することが次第に明らかになってきた。例えば、短期および長期の疾病の危険性を含むIUGRの様々な影響は、主に胎児期におけるグルコルチコイド濃度の上昇が引き金となって起きると考えられている(Philips et al., 1998)。

ストレスや高濃度のグルコルチコイドの暴露は、成人期の学習および記憶障害に現れるように、脳の発達に深刻な影響を与えることがある。手で触られた新生児ラットの初期の影響では、ストレス反応に対する調節機能が向上し、また加齢に伴う海馬の細胞減少および記憶力低下が抑制された(Francis et al., 1996; Meany et al., 1988)。対照的に、新生児ラットにおけるグルコルチコイドの増加は、ミエリン(髄鞘)形成、樹状突起形成およびシナプス形成の不全とともに、軸索成長が不完全となり学習障害および運動機能に異常をきたす結果となる(de Kloet et al., 1988)。

上述の哺乳類のHPA軸にはさらに多くの微細で複雑な要素がある。まず、副腎は、カテコールアミンとともに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、エンケファリンなどの重要なホルモンの分泌源であり、その全てが身体全体にわたり多くの効果をもたらすものである。これらのホルモンの分泌は、それぞれHPA軸とは関係のないメカニズムによって調節されている。生殖に関してみると、副腎からの他の産物で最も重要なものは弱アンドロゲンのDHEA、硫酸DHEAおよびアンドロステンジオンであり、これらの分泌もACTHにより刺激される。これら副腎由来のアンドロゲンは、標的組織でより強力なアンドロゲンあるいはエストロゲンに変換され(図3.3)、それによって生殖内分泌系およびアンドロゲンやエストロゲンに反応する細胞型の機能に影響を及ぼす(Simpson and Rebar, 1995)。副腎性アンドロゲンの過剰生産が子宮内 (*in utero*) あるいは妊娠している母親で起こった場合には、雌胎児の部分的な性転換などの重大な結果をもたらす可能性がある(Simpson and Rebar, 1995)。ヒトでは副腎性アンドロゲンが思春期初期にも作用し(adrenarche)、恥毛およびわき毛の成長を刺激する役割を果たしている(Ritzen, 1998)。視床下部 - 脳下垂体レベルでは、さらにACTH放出の制御がアルギニンバソプレッシンを介して行われている可能性がある。

3.4.2 哺乳類以外におけるHPA軸

哺乳類の副腎皮質に相同である哺乳類以外のステロイド合成器官は、間腎腺、間腎組織あるいは単に間腎とい

われている(Vinson et al., 1993; Norris, 1997a; Bentley, 1998)。したがって、特に魚類では、HPA軸はしばしば視床下部 - 脳下垂体 - 間腎軸と称される。このステロイド合成器官は、哺乳類の副腎皮質との相同性を表す意味で「副腎皮質性」と呼ばれている。

哺乳類以外のHPA軸は、哺乳類のそれと同様に、最初に視床下部のCRH様ペプチドの分泌に刺激され、続いて脳下垂体からのACTH放出、そして副腎皮質性組織からコルチゾール(大部分の魚類において)、あるいはコルチコステロン(大部分の両生類、鳥類および爬虫類)の分泌が起こる。HPA軸は、ストレスに対する応答調節に重要であり(Iwama et al., 1997)、哺乳類(Schreck, 1996)と同じように抗免疫作用をもつとみられる(Gaillard, 1994)。生体は、ストレスの存在に対して、ホルモンを正常なレベルに戻すことで適応している。長期化したストレスはHPA軸の活性の増加に結びつき、時には慢性的なコルチゾールあるいはコルチコステロンの上昇を生じることがある。極端な場合では、これがHPA軸を消耗して死に至ることもある。ストレスが慢性化した動物は、活性化されたHPA軸を持ちながらも、グルコルチコイド濃度は正常かわずかに上昇した程度である。

多くの哺乳類以外の動物では哺乳類様CRHを分泌することが報告されているが、同じようにACTH分泌を増加させることができる他のCRH様ペプチドが魚類および哺乳類で発見された。哺乳類のACTHは、全ての脊椎動物の副腎皮質からの分泌を刺激する効果をもつとみられるが、これは我々がACTHと呼ぶこれらのペプチドでは、脊椎動物間でアミノ酸配列が保持されていることを反映している。軟骨魚類(サメ、ガンギエイ、エイ)では、特異的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が見つかったが、コルチコステロンも産生している。

硬骨魚類でコルチゾールは、Na⁺およびK⁺バランスを調節するミネラルコルチコイドとしての機能、およびグルコルチコイドとしての機能の両方を合わせもつ。少量のコルチコステロンも硬骨魚類の血漿中にみられる。両生類の幼生および水生両生類は、硬骨魚類のように主要なコルチコステロイドとしてコルチゾールを産生するが、陸生および半陸生の両生類は爬虫類および鳥類の全てと同様にコルチコステロンを分泌する。全ての四肢動物はアルドステロンを産生するが、塩バランスにおける役割は哺乳類以外まだ解明されていない。哺乳類は、グルコルチコイドおよびミネラルコルチコイドに対してそれぞれ異なる標的細胞に存在する2つの全身性のコルチコイド受容体をもつ。他の脊椎動物におけるコルチコイド受容体数の数は、まだ十分に調べられていない。

3.5 HPT軸

3.5.1 HPT軸の概要

この軸は、HPC軸で描かれた作用と非常によく似た働きをする。TRHは、視床下部ニューロン終末から分泌され、哺乳類のTSHの合成と分泌を制御するために、脳下垂体前葉の甲状腺刺激ホルモン産生細胞に働きかける

(Reed and Pangaro, 1995)。TSHは、血流により甲状腺に運ばれ、そこで T_3 および T_4 の合成を刺激し、続いてそれらが血液中に放出されて身体全体にわたり全般的な代謝作用を刺激する。 T_3 は生物学的にははるかに強力であるにもかかわらず、実際に放出される主要な甲状腺ホルモンは T_4 である(Reed and Pangaro, 1995)。多くの標的組織では、 T_4 が T_3 に代謝されてその効果を発揮しており、これは、局所の必要に応じた内分泌系の微妙な調整が、如何により重大な調節や制御を可能にすることができるか、という一つの例である。循環する T_3 のほとんどは、肝臓における脱ヨード酵素により T_4 が代謝変換されて生じている。 T_3/T_4 の循環が視床下部および脳下垂体前葉にフィードバックして、TRHとTSHの放出をネガティブに制御することにより、古典的意味の内分泌のネガティブフィードバックの経路が成立している(Reed and Pangaro, 1995)。脳下垂体におけるフィードバックの大部分は、甲状腺刺激ホルモン産生細胞で T_3 に変換される T_4 による。この循環経路の始点にはもうひとつの調節因子ソマトスタチンがあり、これは視床下部ニューロンから放出され、脳下垂体前葉からのTSH分泌をネガティブに制御している。ソマトスタチンは、さらに脳下垂体前葉からのGH分泌の(ネガティブな)制御という重要な役割を果たしているが、本章でこの内分泌系は論じていない。しかしながら、GHが細胞の成長を刺激するのに対して、TSH(T_3/T_4 による)は細胞の代謝を刺激して、これら2つの内分泌軸の制御がこの段階で結びつくことを示している。

現在の状況では、甲状腺内分泌軸への関心は、以下の2つの観点から生じている。a) ある種のPCBsが抗甲状腺作用をもつ。すなわち、 T_3/T_4 レベルでの影響に拮抗することが実証されている(Gray et al., 1993; Porterfield and Hendry, 1998)。b) ニューロンから筋肉、そして精巢のセルトリ細胞にまで及ぶ様々な組織での最終的な分化において甲状腺軸が果たす重要な役割。甲状腺ホルモンの作用の多くは、それらが他の刺激にตอบสนองする細胞の能力に影響を与えるという意味で多岐にわたる。例えば、GHの標的細胞におけるセカンドメッセンジャーであるcAMPの生成を担う重要な酵素のアデニルシクラーゼの濃度は、甲状腺ホルモンによって高められる。

3.5.2 哺乳類以外におけるHPT軸

哺乳類以外のHPT軸の構造および機能は、哺乳類のHPT軸に極めて類似している(McNabb, 1993; Norris, 1997b)。甲状腺が濾胞構造をもち、また、甲状腺ホルモンの合成および分泌のメカニズムや末梢組織で T_4 が脱ヨード化されて T_3 へ変換する点についても同様である。さらに代謝における分解、排出のパターンも類似している。硬骨魚においての1つの大きな違いは、甲状腺濾胞が結合組織による莢膜に覆われずに分散状態にあり、個々の濾胞の一つ一つが第2および第4大動脈弓間の結合組織間に分布している。ときには、甲状腺濾胞が、腎臓、肝臓および生殖腺などの他の器官にも分散している。したがって、これらの動物における甲状腺の外科的除去は不可能である。

視床下部と脳下垂体の制御の大きな違いは視床下部の段階にある。魚類と両生類において、TRHはTSH分泌の主要な刺激因子ではない。両生類のTSH分泌にはCRHが中心的役割を果たしている(Denver, 1997)。しかしながら、哺乳類のTSHは、全ての脊椎動物において、甲状腺でのヨウ化物の貯蔵と甲状腺ホルモンの分泌を刺激する作用がある。甲状腺ホルモンは、すべての脊椎動物の胚と後胚の発生、特に神経系との関連において重大な役割を果たしている。さらに、幼魚および両生類の幼生の変態にも重要である(Dickhoff et al., 1990; Galton, 1992; Kikuyama et al., 1993; Shi, 1994)。これらの作用は劇的な形態変化をもたらすだけでなく、生息地および食餌の重大な変化に対するの生化学的な適応、すなわちサケ科の魚類のスモルト(2年子)化および両生類変態における甲状腺ホルモンの役割やPRLやコルチコステロイドとの相互作用にも関連するものである。サケ科の稚魚から2年子への変態(スモルト化)は降海に先立って起こる。ギンザケのスモルト化に関する研究(Dickhoff et al., 1990)では、この時期に、インスリンやPRLの早期急上昇と同様に、 T_4 およびコルチゾールがそれぞれ一時的に2~6倍増加することが報告されている。またGHも増加して、その濃度はスモルト期には上昇したままである。

両生類の幼生では、成体への変態には甲状腺ホルモンおよびコルチコステロイドの一時的な上昇をとめない、またPRLも遅れて短期の上昇をする。さらに、脱ヨード酵素の型の特異的变化により、 T_4 の不活性代謝物の逆転型 T_3 への転換が減少して、より活性の高い T_3 への転換を増加させる(Galton, 1992)。また変態期には甲状腺ホルモン受容体型の変化も起こる(Wolffe et al., 2000)。応答器官では多くの遺伝子産物が甲状腺ホルモンにより生成促進され、いくつかのものは変態期において抑制される(Shi, 1994)。

サンショウウオおよび爬虫類の脱皮は甲状腺ホルモンによって制御されている。それに対して、鳥類での脱羽は甲状腺ホルモンで亢進されるが、これは生殖腺ステロイドによって刺激される。このような甲状腺ホルモンの作用は、哺乳類の換毛に対する作用と類似している(Norris, 1999)。

甲状腺ホルモンはさらにGHと相乗的に働き、魚類、両生類の成体、鳥類およびおそらく爬虫類の成長速度を最大限に高めるが、爬虫類については詳しく研究されていない(Norris, 1997)。最後に、甲状腺ホルモンは性成熟を刺激する重要な役割をもち、様々な動物の季節的生殖活動にとって不可欠である(Norris, 1999)。代謝率、体温、および熱産生を調節するという甲状腺ホルモンの役割は、哺乳類および鳥類の両者での恒温性にしたがって独立して進化してきており、魚類、両生類および爬虫類ではこれらのホルモンは同じように働くものではない(Oppenheimer et al., 1995)。

3.6 松果体：光周期変換因子

哺乳動物では、両側の大脳皮質に挟まれた視床上部に松果体が位置している。松果体は、夜間に生体アミンの

メラトニンを分泌することにより様々な体内生理リズムの調節を行い、また光周期の刺激を行動に変換するための重要な役割を担っている。さらに、メラトニンは、皮膚の色素着色および毛髪の成長を調整しており、HPA、HPTおよびHPG軸における視床下部の制御を阻害することができる。また、免疫応答系を高めることが報告されている(Norris, 1999)。鳥類と哺乳類における光入力にはまず視覚系によって受け取られる。しかしながら、ほとんどの魚類、両生類および爬虫類の松果体は、直接的な光受容体としての重要な役割も果たし、またメラトニンの分泌によりHPA、HPTおよびHPG軸の重要な制御も行っているかもしれない。松果体の機能を変化させるいかなる環境要因も脊椎動物の健康に深刻な影響を与える可能性がある。

3.7 HPG軸と他の内分泌系の相互作用

身体の様々な内分泌軸は、独立してそれだけで機能することはない。もし独立して動いたとすると、例えば、季節、食物の供給、捕食動物の存在などの状況の変化に対して、生体が反応あるいは適応する能力を危険にさらすことになってしまうからである。他の内分泌軸における様々な構成要素は、生殖のタイミングや効率を変化させるなど、HPG軸に対する重要な調節作用を示している。このような相互作用の複雑さを、いくつかのオーバーラップするクロストークに注目して図3.4に示した。この相互作用の機能および複雑さを深く理解するために、さらに4つのポイントについて例とともに示している。

3.8 内分泌系の解明の進展

現在、多様な内分泌系相互間の新たなコミュニケーション経路、そして機能的重複が発見されている。1例として、遺伝性肥満マウス(ob/ob)に関する研究から比較的最近発見されたレプチンがある (Rosenbaum and Leibel, 1998)。このホルモンは、脂肪細胞で産生され、満腹感や空腹感および摂食などの特定の行動に重要な影響を及ぼしている。脂肪細胞のエネルギー貯蔵は、インスリン-グルコース内分泌系の重要な要素であり、インスリンがレプチン分泌量に直接あるいは間接的(すなわち脂肪蓄積の変動など)に影響していることが知られている(図3.4)。またレプチンと生殖系の間には重要な相互作用がある (Friedman and Halaas, 1998; Rosenbaum and Leibel, 1998)。動物は、母親に適切なエネルギー貯蔵があり食物供給がよい場合に限り生殖活動を行う。レプチンは、これらの様々な要素を統合するために必要な信号を発信している。食物供給と母親のエネルギー(=脂肪貯蔵量)が低い場合には、亢進されたレプチンが生殖系の機能を抑制することができる。このような経路は、思春期の時期や開始、季節的な生殖活動の制御、および特定の疾病、例えば拒食症などの食欲異常を生じた女性の月経停止などに対して重要な役割を果たしている。哺乳類以外の脊椎動物のレプチンの存在および役割の解明は今後の課題であるが、生殖における栄養状態の重要性は哺乳類で説明した関係と同じく重要であるとわかっており、全ての脊椎動物にレプチンが存在する可能性がある。

この他に内分泌系の複雑さについて最近解明されたも

のでは、遺伝子発現の変化につながる核内ステロイド受容体への結合という古典的メカニズムによる作用に加えて、標的細胞膜上の受容体に結合し生体反応を引き起こす信号伝達経路を活性化することにより、迅速で非遺伝子的な作用を行うステロイドの能力があげられる (Watson and Gametch, 1999)。エストロゲンとアンドロゲンに対する特異的な細胞膜受容体と迅速な非遺伝子的作用が、最近になって視床下部、脳下垂体、性腺、生殖細胞、ステロイド産生細胞、および乳房などの第一次、第二次性徴に関わる生殖機構など脊椎動物の生殖系全体で認められた (Revelli et al., 1998)。非遺伝子的なステロイド作用は、哺乳類における精子の活性化 (Luconi et al., 2001)、精巣の輸出小管における電解質および体液輸送 (Leung et al., 2001)、魚類、両生類でのプロゲステンによる卵母細胞の成熟 (Thomas et al., 1998) などのいくつかの生殖過程において、軟骨細胞の増殖、分化およびマトリックス形成などの非生殖過程と同様に、重要な機能をもっていることが示されたが、多くの組織におけるこれらの生理学的役割はまだ解明されていない。この領域は、今後関心が高まり、EDCsによって引き起こされた影響の全容の検出および特性の解析は、さらに複雑化するであろう。

3.9 内分泌系の発達およびプログラミング

内分泌系間のクロストークは、生涯のそれぞれの段階でそれぞれ異なった結果を示すと考えられる。特に重要な点は、「設定を行っている」段階、すなわち刺激に対する閾値とフィードバックの系路がプログラムされる時期における内分泌軸の変化が強い影響を示すことである。次のような2つの影響が生殖の内分泌軸の変化を引き起こす。一つは、比較的直接的な作用であり甲状腺軸に関わるものである。甲状腺ホルモン(T_3/T_4)の循環量は、様々な組織(例えば、ニューロン、筋細胞)の最終的な分化に影響しており、また、最近の研究では、雄のセルトリ細胞の分化にまで及ぶことが報告されている。未成熟な増殖細胞から、精子形成を補助する成熟した非増殖細胞へのセルトリ細胞の転換は、思春期前期における甲状腺ホルモンの量が引き金となって起こる。 T_3/T_4 が正常値以下(甲状腺機能低下症)になると、セルトリ細胞の増殖期が延長し、反対に、 T_3/T_4 が正常値以上(甲状腺機能亢進症)になるとセルトリ細胞の増殖期が短くなる (Sharpe, 1994; Jannini et al., 1995)。このような変動の結果、最終的なセルトリ細胞数が変化し(それぞれ増加、減少)、それにより最終的な精巣の大きさ、1日当たりの精子産生数が変化する。これは各セルトリ細胞が限られた数だけの生殖細胞しか支持できないからである。甲状腺機能低下および亢進症は、身体の成長および脳の発達を変化させるという点でその他多くの影響をもたらすが(図3.4)、いずれか個々の内分泌軸の機能変化による多面発現的な影響であることを再度強調しておく。

クロストークに加えて、甲状腺ホルモンは動物の成体における脳の活性レベルと同様に、脳の分化にも重大で直接的な影響を及ぼしている (Akaike et al., 1991);

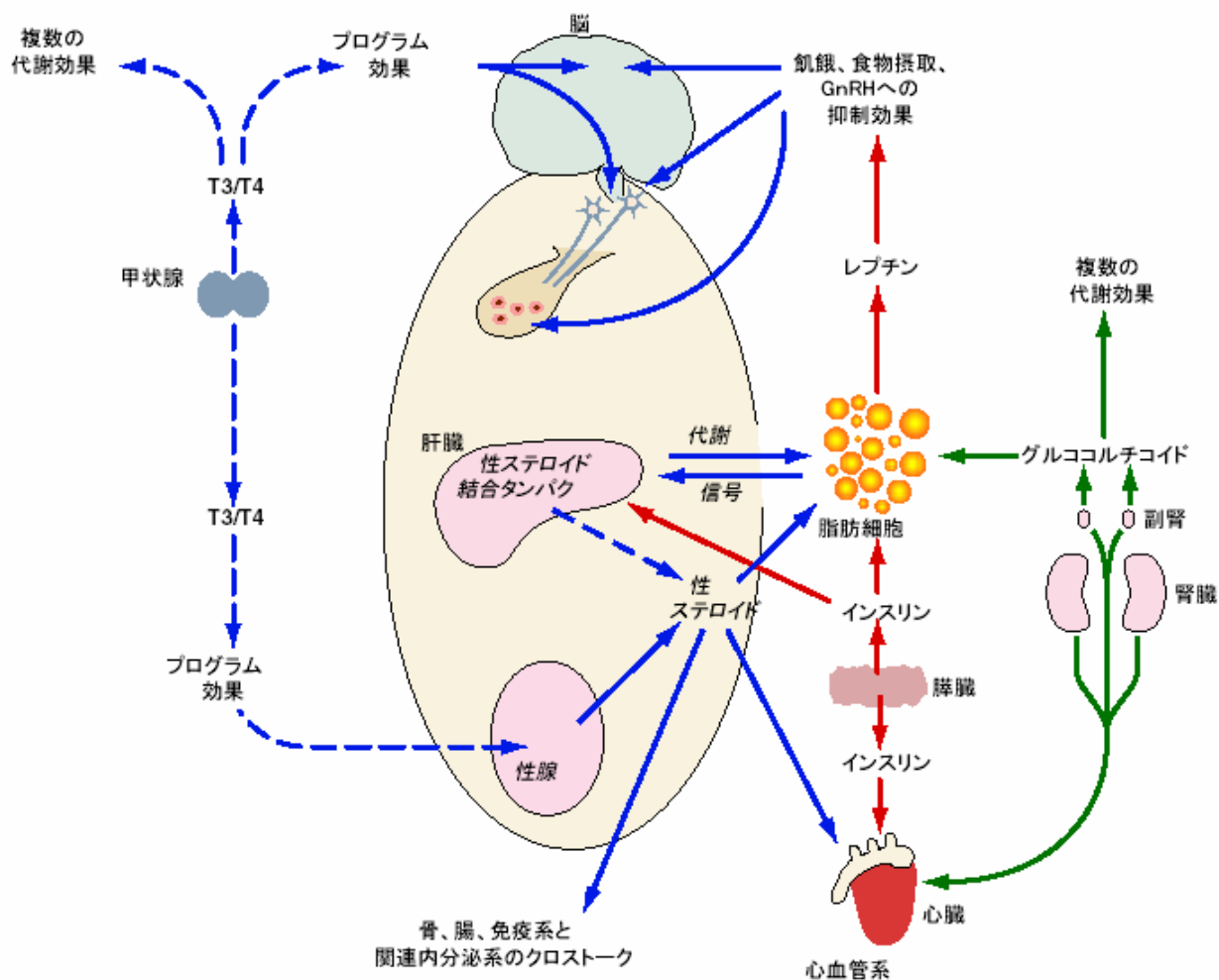


図3.4 哺乳類のHPG軸(中央の影付き部分)と、生体の他の内分泌軸との間に生じるクロストーク(統合)のいくつかを示した概略図。選択した例のみを示しているが、実際には、各内分泌軸は身体全体の機能を統合するために、他の内分泌軸と重層的に相互作用していることに留意すること。この複雑なクロストークからの重要な結論は、ある内分泌軸に誘発された変化が他の内分泌軸の変化を導くことであり、このような相互作用についての理解が不足しているために、影響を予測することが難しいということである。

Porterfield and Hendry, 1998)。ヒトでは、妊娠中または出生直後の甲状腺ホルモンの欠乏は不可逆的な精神遅滞を引き起こす可能性がある。

その他、内分泌軸間での「プログラム設定」のクロストークの顕著な影響の例としては、既に概説したIUGRがあげられる。妊娠齢に比較して低体重児である出生児は、胎児期における発育不全の結果、「インスリン抵抗性」となり、出生時には脂肪の蓄積およびレプチン濃度が極度に低下している。このような出生児には通常追いつけ成長がみられ(Jaquet et al., 1999)、これはおそらく彼らの内分泌が適応変化するためであるが、永久的に高インスリン血症およびインスリン抵抗性が残る。ヒトでは、このような人は糖尿病を発症し肥満になる危険性が增大する(Philips et al., 1998)。さらに、そのような人は高血圧になり、そのために肥満とは無関係な心血管系疾患、脳卒中および腎疾患の危険性が增大する。生殖系もまた有害な影響を受ける。ヒトでは、IUGRの男性出生

児の場合、出生時には停留精巣および尿道下裂の危険性、また成人時には精巣の胚細胞がんの発症や精子数の低下を引き起こす危険性が高い(Sharpe, 1999)。正確にはこのような変化がどのように引き起こされるかは明らかでないが、おそらく性ステロイド濃度の変化が関係するとみられる。考えられる1つの経路が図3.5に示されている。高インスリン血症が肝臓でのSHBG分泌の大幅な減少をまねき、その結果フリー(生物学的に活性)の性ステロイドの循環量が上昇することが現在では詳細に解明されている(Nestler, 1993)。また、アンドロゲンがエストロゲンよりも強くSHBGに結合するため、アンドロゲン/エストロゲン比が変化する。これは、女性の一般的疾患の1つである多嚢胞性卵巣疾患において明白に現れている。このような人は高インスリン血症で、血中アンドロゲン濃度の過剰による多毛となり、また多嚢胞性卵巣および無排卵性不妊も生じる(Dunaif, 1997年)。このような状態を引き起こす共通の危険因子はIUGRである。

3.10 性ステロイドの非生殖系への影響

高インシュリン血症によるSHBGの変化はアンドロゲンおよびエストロゲンの生体活性の変化を引き起こし、生殖機能を変化させる可能性があると考えられる。しかしながら、性ステロイド(特にエストロゲン)は、身体全体にわたりその他の多くの影響を及ぼしている。エストロゲン(程度こそ低いもののアンドロゲンでも)は、雄および雌の骨形成/吸収に重要な役割を果たし、またエストロゲン作用は骨端閉鎖にとって不可欠である(Sharpe, 1998)。性ステロイドの生成あるいはその作用が乱れると、骨粗鬆症あるいは早発/遅延骨端閉鎖を引き起こし、結果として最終身長/体長に影響が現れる。さらに、性ステロイドは、心血管系にまで及ぶ影響をもち、ヒトでは明らかに性および年齢に依存した心血管系疾患を起こす危険のある変化に関与している(Sharpe 1998)。脳(Gorski, 1996; Meewen and Alves, 1999)、消化器系(Sharpe, 1998)、免疫系(Olsen and Kovacs, 1996)および脂肪組織(Simpson et al., 1997)に対しても、性ステロイドの多岐にわたる影響が及び、このような作用がこれらの器官を標的とする他の内分泌軸にも関与あるいは制御している可能性がある(図3.4)。HPG軸に対する直接および間接的影響は、アンドロゲンおよびエストロゲンの絶対量あるいは相対量の変化に結びつき広範囲にわたる影響が現れる可能性がある。これらの影響は、成人において急性/一時的(例えば脳下垂体フィードバック効果)、あるいは慢性的(例えば骨および心血管系への影響)であるが、胎児/新生児においては、発生したどのような影響も永久的(例えば性分化)な可能性がある。

3.11 内分泌クロストークと内分泌かく乱化学物質

既知の性ステロイドホルモンの活性あるいは不活性から、特定の化学物質の生殖への影響を予測することは容易ではない。例えば、インシュリン濃度に影響をあたえるような食事の変化(例えば精製糖の豊富な食事の摂取)は、SHBG産生量の変化(図3.5)による性ステロイドホルモンの生物活性を変化させる可能性がある。しかし、精製糖が性ステロイドホルモン作用をもつと断定することはできない。ある環境化学物質が(弱い)ステロイドホルモン作用を示したとしても、また別の関連した作用をもつこともある。したがって、PCBsの生殖系への影響を考えると、その甲状腺への影響は、PCBsのもつ弱いエストロゲン/抗エストロゲン作用と同等かそれ以上に重要と思われる。他の環境化学物質がエストロゲン作用と同様に抗アンドロゲン作用をもつ場合(例えばDDT異性体やある種のフタル酸エステル)もあり、*in vivo*でのその効果の解釈を混乱させる可能性がある。例えば、抗アンドロゲンの投与が内因性エストロゲン濃度を上昇させると考えられる。これは抗アンドロゲンがネガティブフィードバックループを遮断するため引き起こされ、それを補償するためにLH濃度が上昇(図3.1および3.2)するなどしてテストステロン濃度が通常以上に上昇することで、アロマトラーゼ(図3.3)の基質濃度を必然的に増加させることになる。様々な研究が示唆するように(Simpson et al., 1997)、もしアン

ドロゲンがアロマトラーゼの発現を促進するならば、エストロゲン濃度がさらに上昇するであろう。したがって、*in vivo*でのPCBs、DDTあるいはフタル酸エステルの「エストロゲンの」作用の全体像は、どんな*in vitro*のエストロゲンスクリーニング法を用いてもそれらの活性を測定しても予測することはできないであろう。いくつかのエストロゲンはある組織ではアゴニストであり、別の組織ではアンタゴニスト(例えば、タモキシフェン、ラロキシフェン)となり、同様なことがアンドロゲンにも当てはまることが現在の研究から示唆されている。これらの違いの根拠は完全に解明されていないが、組織特異的に発現するコアクチベータータンパク(あるいはアダプター)が関与していることは明らかであり、エストロゲンの場合にはER- α あるいはER- β がどのように発現しているかが関係している。いくつかのコアクチベーターは、ステロイド受容体スーパーファミリーの中の様々なメンバー間で共有されるために、ある受容体メンバーの作用がアンドロゲンあるいはエストロゲン受容体複合体に働きかけるコアクチベーターの効果を変化させることがあるかも

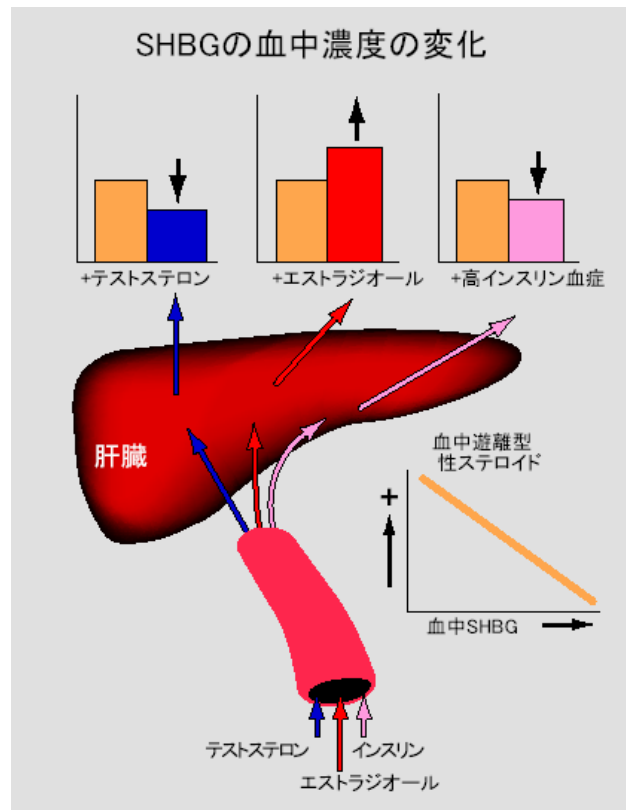


図3.5 特に内分泌かく乱に関連を持つヒトの内分泌軸間の重要なクロストークの一例を示した概略図。ヒトや他の哺乳類の一部では、性ステロイドであるテストステロンおよびE2はSHBGと結合して血流を循環しているため、標的細胞が自由に利用できるわけではない。SHBG(肝臓で生成される)の濃度変化は、テストステロンとE2の産生を変化させることなく(生物学的活性を変化させている。おそらく、SHBGの産生自体がテストステロン(抑制)とE2(促進)によって調節されているとしても驚くにはあたらない。しかし、クロストークを介して、インシュリン濃度の上昇がSHBG産生を抑制し、結果として、生物学的に活性な(=SHBGに結合していない)テストステロンおよびE2の濃度が上昇する。さらに、テストステロンはE2に比べてSHBGに強く結合するため、SHBG濃度が低下すると、生物学的に活性なテストステロンが選択的に著しく増加し、その結果アンドロゲン/エストロゲンの平衡が変化する。すなわち、糖分の豊富な食事など血中インシュリン濃度の上昇を引き起こす因子は、性ステロイドの標的細胞に対する濃度および作用を変化させる可能性がある。

しれない。一方で、非生殖系ホルモンは、これらのコアクチベーターの発現を制御する可能性がある。このような可能性は推測であるが、タモキシフェン、ラロキシフェンおよび次々と発見される他のSERMs (Cosman and Lindsay, 1999)によって得られた結果により、性ステロイドホルモンの作用が変更されるような予測不可能な経路が存在することが強く示唆されている。

上述の考察に基づき、問題の化合物が生殖に関わる内分泌かく乱化学物質かどうかを検証することを目的とするならば、*in vitro*の試験法でその化合物の性ステロイド活性を測定するのではなく、「生殖」作用(つまり生殖系の発生と機能を変化させる能力)について化合物が検査されるべきであることは明白である。

3.12 EDCが関与する発生および生殖毒性の作用機序と表現型

3.12.1 調査の展望

この節は、生殖機能および発生において*in vivo*で有害な影響が示され、その特性がよく記述されたEDCsの作用機序について、例を選んで解説するものである。通常の内分泌系の機能からみると、内分泌かく乱における細胞および分子機構は、受容体の結合だけに制約されるのではなく、例えば、ホルモンの合成、代謝および輸送などの阻害にも関係している。図3.6は、例としてステロイドホルモン作用のいくつかのメカニズムを示しており、EDCsが内分泌機能を変化させる過程の中で重要な鍵となる部分を示している。また、シグナル伝達経路の別の部分においても人工の化学物質によるかく乱を受けやすい場合がある。この節ではステロイド受容体のアゴニスト、アンタゴニスト、ステロイド合成調節物質およびAhRアゴニストの例を用いて、生殖系の発生に対する作用と毒性影響についての細胞および分子機構に視点をあてている。また、必要に応じて、哺乳類以外の種のデータも提示している。EDCsの典型では、必ずしも同じ量あるいは同じ発育段階でなくとも複数のメカニズムによって複数の標的器官が影響を受け、生殖系の発生に変化がもたらされる。毒性物質の多岐にわたる内分泌および非内分泌作用は、*in vivo*においてのみ意味のある作用として解釈することができ、*in vitro*の試験の限界を認識することが重要である。

脊椎動物の内分泌においてはかなりの相同性が存在する。したがって、1つの種において内分泌機能を変化させる有害物質は、おそらく別の種でも有害な影響を生むであろう。しかしながら、いくつかの種間には内分泌機能に著しい差があるので、種間相互における予測には十分な考慮が必要である。ホルモン、ホルモン合成およびそれらの受容体での相同性は高い割合で保存されているが、生殖機能および発生における特異的ホルモンの役割は大きく異なっている。さらに、EDCsの代謝の著しい差は、これらの化学物質への反応に顕著な種差として現れる。

3.12.2 AR介在の(抗)アンドロゲン

3.12.2.1 ピンクロゾリン 一般に哺乳類は1種類のARをもつと考えられているが、これは、ARの1塩基置換によ

って起こるアンドロゲン不完全症候群でみられる表現型のみにおける性転換により証明される(Quigley et al., 1995)。ピンクロゾリンはAR拮抗作用をもつジカルボキシミド殺菌剤である。EDCsの中でも、抗アンドロゲン殺菌剤ピンクロゾリンの作用についての細胞および分子機構は、最もよく解明されているもののひとつである。ピンクロゾリンの代謝物質M1およびM2は、ヒトのARへのアンドロゲン結合を競合的に阻害する。またM1とM2は、ヒトAR導入細胞においてDHT誘導性の転写活性を抑制する。Kelceら(1997)は、ピンクロゾリン処理で、抗アンドロゲン作用による*in vivo*における遺伝子発現の変化が生じることを実証した。ARへの結合とは対照的に、ピンクロゾリンおよびその抗アンドロゲン代謝物は、ともにプロゲステロン受容体に対しては弱い親和性をもつが、ERに対する親和性は示さない。ピンクロゾリン、M1およびM2は、テストステロンをさらに活性の高いアンドロゲンであるDHTに転換するのに必要な酵素の5 α -レダクターゼ活性を*in vitro*では抑制しない(Kelce et al., 1994)。ピンクロゾリンの生物学的影響について *in vivo* および *in vitro*の測定データの比較から、母親の血清中のM1とM2濃度がAR結合に対するそれぞれのKi値に近づくと、雄の仔ラットに奇形が生じることが示された(Kelce et al., 1994; Monosson et al., 1999)。

AR依存性遺伝子の発現を抑制するM1とM2の能力は、*in vitro* と *in vivo*の両方で実証された。さらにピンクロゾリンは、雄のテストステロン処理未成熟去勢ラットでアンドロゲン依存性の組織の発達を阻害し、*in vivo*での抗アンドロゲン作用がより明確に証明された。薬剤フルタミドは、代謝活性化してヒドロキシフルタミドに変換するが、この物質はピンクロゾリンの代謝物M2に構造的に類似しており、それぞれピンクロゾリンまたはM2とほぼ同等の内分泌活性を示す(Imperato-McGinley et al., 1992; Gray et al., 1994; Kelce et al., 1995)。

生殖器に対する抗アンドロゲン作用に加えて、ピンクロゾリンおよびフルタミドは、視床下部-脳下垂体軸の段階における生殖機能にも変化をもたらす。ピンクロゾリンあるいはフルタミドの経口投与(30~100mg/kg/日; Monosson et al., 1999)は、血清中LHおよびテストステロンの量の増加、およびライディッヒ細胞の過形成を引き起こす。同じく抗アンドロゲン作用をもつ*p,p'*-DDE (Kelce et al., 1995)またはMXC (Gray et al., 1989, 1999c)の投与では、ピンクロゾリンおよびフルタミドとは対照的に、血清中のLHまたはテストステロンの量に重要な変化も生じない。胎児期後半からの3~200mg/kg/日の量のピンクロゾリン暴露によって、次世代雄における様々な抗アンドロゲン性の催奇形性が報告されている(Gray et al., 1994, 1999b)。これらにはAGDの雌性化、乳頭遺残、尿道下裂、鼠径部異所性精巣、陰囊、精巣上体肉芽腫、性腺付属器官の縮小あるいは欠損、包皮分離の遅延などがあげられる。ピンクロゾリンの低用量の影響に関する研究では、妊娠ラットに、3~100mg/kg/日を妊娠14日~出産後3日まで暴露した。最低用量群(3.125mg/kg/日)でも、次世代雄にAGDおよび乳頭

遺残に対する著しい影響があらわれた。雄の生殖管の奇形は、50および100mg/kg/日の暴露で観察された。これらのエンドポイント(AGDの短縮、乳頭遺残、性腺付属器官重量への影響、尿道下裂、精巢上体発育不全)がすべてARの障害によって引き起こされるとしても、統計学的に有意な変化を起こす有効用量は様々で広範囲に及んでいる。これらの変化のいくつかは、実験の用量範囲では明確な閾値を示さない。多世代にわたる研究が、雄の生殖系における微妙な抗アンドロゲン作用の検出には不可欠であり、また新しい試験法ガイドライン(新しい抗アンドロゲン測定法を組みこんだ)を用いないと、NOAELsが少なくとも1桁高くなる可能性がある。

思春期のウサギでピンクロゾリン100mg/kgを2ヶ月間経皮暴露した結果、付属性腺重量の減少がみられたが、精子数は著しく増加した。著者らは性腺刺激ホルモン放出の増加を考慮に入れ、抗アンドロゲン作用により視床下部あるいは脳下垂体におけるテストステロンのネガティブフィードバックが障害された可能性を示唆した(Moorman et al., 2000)。

3.12.2.2 その他のARアンタゴニスト DDT代謝物質DDE(Kelce et al., 1995; Gray et al., 1999a; You et al., 1998, 1999a, 1999b)、MXC代謝物質 (HPTE) (Gaido et al., 1999; Maness et al., 1998)、有機リン化合物フェントロチオン(Tamura et al., 2001)、およびジカルボキシミド殺菌剤プロシドン(Ostby et al., 1999)などの他のいくつかの有毒物質でARアンタゴニスト作用が示された。リニユロンは、尿素系除草剤でARへの弱い親和性を示すが、次世代雄に引き起こされた影響は、複数のメカニズムによって哺乳類の性分化に異常を起こすおそれがあることを示唆している(Gray et al., 1999a; Lambright et al., 2000; McIntyre et al., 2000)。この点では、前立腺疾患のために臨床的に使用された植物性抗アンドロゲン剤 permixonもAR結合性を示し、またステロイドホルモン合成を抑制するとみられる(Carilla et al., 1984; Bayne et al., 1999; Plosker and Brogden, 1996)。トリス(4-クロロフェニール)メタノールは、DDTと構造的関連性のある起源不明の環境汚染物質であり、*p,p'*-DDE に匹敵するAR結合親和性をもつ。しかし、100ppmまでを28日間混餌投与された性成熟ラットでは、*in vivo*での抗アンドロゲン作用は認められなかった(Foster et al., 1999)。

3.12.2.3 その他の脊椎動物におけるAR介在の影響 魚類における性的二型性はアンドロゲンおよびエストロゲンの両方の影響を受けることが証明された(Ankley et al., 1998)。例えば、Smith (1974)は、ファットヘッドミノ(ウグイの仲間)における生殖結節の形成と背側粘液分泌腺が17 α -メチルテストステロンによって誘導されることを実証した。芳香化されるテストステロンおよび17 α -メチルテストステロン、芳香化されない11-ケトテストステロンおよび17 α -メチル-DHTを、孵化直後の遺伝子型雌のキングサーモンに対して2時間の処理を行った場合、投与量に依存した性転換が観察されたが、天然あるいは芳香化できる型よりも合成および芳香化できない型ではさらに強力な効果がみられた。これは発生初期におけるア

ロマターゼの役割を示唆している(Piferrer et al., 1993)。ティラピアの稚魚の餌にアンドロゲンを与えることで、ほとんどが雄の群を商業ベースの規模で作り出すことができる。性未分化の*Oncorhynchus aureus*(サケ科)に酢酸トレンボロン25mgを28日間投与すると、98%が表現型雄になった(それに対して対照群では55.7%が雄)。さらに高い用量投与群においては雄の割合が低下したが、これは抗エストロゲン作用があまり強くないためであると思われる(Galvez et al., 1996)。アメリカナズで同様に処理をした場合、対照群の雄に比べて成魚の体重が低下し

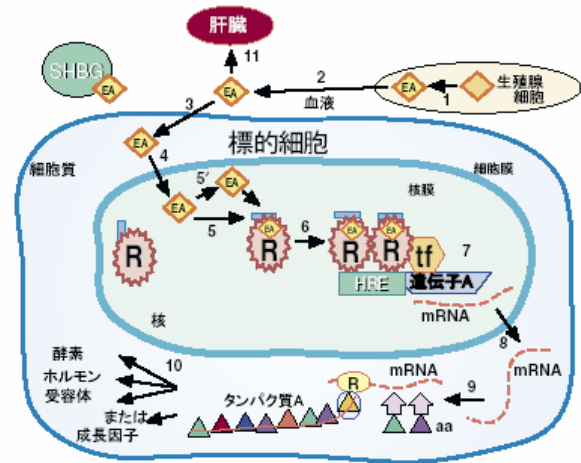


図3.6 環境化学物質によるかく乱に感受性を持つステロイドホルモン作用のいくつかの重要な段階を示した概略図
 (1) E2、テストステロンおよびプロゲステロンなどのステロイドホルモン(EA)は生殖腺細胞内で合成される。医薬品や殺虫剤などのCYP450酵素の阻害剤はここで作用する。
 (2) ホルモンは生殖腺から血中に分泌され、拡散によって細胞に取り込まれるか、SHBGと結合して輸送される。遊離型と結合型の比率を決める因子にはいくつかあるが、結合型ホルモンは、ステロイドのSHBGタンパク質との結合親和性に応じた割合でSHBGから遊離する。有害物質はSHBG濃度を変化させ、また、ホルモン類似物質のいくつかは天然リガンドが結合するようにはSHBGと結合しないため、標的細胞に対して作用しやすくなり、肝臓での代謝に使われやすくなることが報告されている。
 (3) ステロイドホルモンは細胞内に拡散する。
 (4) ホルモンは、未結合な受容体(R)が存在する核の周辺領域に拡散する。
 (5) ホルモン、あるいはホルモン類似物質は、受容体と結合する。生体異物の多くは、ERまたはARと結合することが示されている。ある場合には、血中に分泌された化学物質がホルモン前駆体となり、細胞内で活性ホルモンへと代謝される(5)。例えばある組織では、テストステロンはアロマターゼによりE2に代謝されるのに対し、他の組織では5 α -レダクターゼがDHTに変換する。筋肉のような組織内では、テストステロン自身が活性ホルモンとなる。標的組織においてホルモン前駆体の活性化を阻害するEDCsもある。
 (6) 天然あるいは合成リガンドに結合している受容体(R)は立体配座の変化を受け、鍵となるタンパク質の結合部位に会合してホモ二量体を形成する。
 (7) ホモ二量体は、転写因子(tf)を集めて転写複合体を形成し、ホルモン依存性遺伝子のDNA上のホルモン応答配列(HRE)として知られる特定の配列に結合する。次いで、転写複合体は、mRNA合成(mRNA)を開始する。いくつかの抗ホルモンは、DNAへの結合を妨害する。
 (8) mRNAは、核外の細胞質へと運ばれる。
 (9) 特定のtRNAs(太矢印)およびリボソームに結合したアミノ酸(aa)と結びついて、タンパク質(1条)上の円がmRNAを鋳型として合成される。
 (10) 内分泌作用の指標としてのタンパク質には、酵素、タンパク質ホルモン、成長因子、細胞の構成成分がある。ホルモン依存性マーカーの一例には、卵生の脊椎動物で産生されるエストロゲン感受性のタンパク質であるピテロゲンがある。
 (11) ある場合には有害物質が、血清ホルモン濃度の変化を伴うホルモン代謝の亢進あるいは低下により肝臓機能を変化させ、内分泌機能をかく乱する。例えばあるPCBIは、T4の代謝を刺激して血清T4濃度を劇的に減少させる。何種類かの殺虫剤は肝臓を刺激し、血清ステロイドホルモン濃度を減少させることが示されている。

て体長は短くなり、また性腺が縮小、GSIが減少、血漿中テストステロン濃度が低下することがDavisら(2000)により明らかにされた。性成熟したファットヘッドミノーに対してメチルテストステロンを21日間暴露すると、血漿中性ステロイド濃度の低下、および性腺への有害な影響(相対重量および組織病理学的観点から実証された)が両性ともに観察された(Ankley et al., 2001)。メチルテストステロンのアンドロゲン様の特性は、暴露された雌の雄性化によって明白に証拠づけられた。ピテログニンの誘導は両性で観察されたが、これは投与されたアンドロゲンの芳香化の結果と考えられる。哺乳類は1種のARしか持たないと考えられているが(Quigley et al., 1995)、食魚性のある種はAR1およびAR2と呼ばれる2つのARをもっている(Sperry and Thomas, 1999a, 1999b)。脳のAR1は、AR2とは全く異なるリガンドに対して結合親和性を示し、AR2は、哺乳類ARに類似したリガンド親和性をもつ。AR2は*p,p'*-DDEおよびピンクロゾリン代謝物M1およびM2に結合することが示され(Sperry and Thomas, 1999a)、*in vitro*において脊椎動物の様々な種間でのAR機能の相同性が示された。*In vivo*では、メダカ(*Oryzias latipes*)へのピンクロゾリン処理が間性を引き起こし、これは哺乳類型の性分化を示唆している(Koger et al. 1999)。対照的にMakynenら(2000)の実験では、ファットヘッドミノーのピンクロゾリン処理による性転換はみられなかった。これにはピンクロゾリンの代謝活性化の欠如(Makynen et al., 2000)および性分化の過程におけるアンドロゲンの未知な作用などのいくつかの要因が関与しているかもしれない。しかしながら、上述の結果とは対照的に、この種ではM1とM2はARに結合しなかった(Makynen et al., 2000)。

Takeo & Yamashita (1999)は、ニジマスの2つの異なるcDNAクローンを得たが、これらはrtAR- α およびrtAR- β と名付けられ、完全なARのコード領域をもつ。rtAR- α の予測されたアミノ酸配列をrtAR- β と比較すると85%の相同性が明らかになった。このような高い相同性にもかかわらず、rtAR- α はコトランスフェクションアッセイでアンドロゲン応答性リポーター遺伝子の転写を活性化し、rtAR- β ではしなかったことから、ニジマスでは機能を異にする2つのAR異性体があることが示唆されている。

Ikeuchiら(1999)は、11-ケトテストステロン(硬骨魚類の重要なアンドロゲン)を、ニホンウナギの精子形成を誘導するホルモンとして同定し、ウナギ精巣から受容体(eAR1)のcDNAをクローン化した。また、さらに797アミノ酸残基をコード化して、ウナギ精巣からの2つ目のタイプのAR(eAR2)をクローン化した。eAR2のアミノ酸配列は、eAR1のDNA結合ドメイン(98~88%)およびリガンド結合ドメイン(59~85%)など他のARとの高い相同性を示すが、他のドメインでは相同性が低いことがわかっている。哺乳類細胞の一過性のトランスフェクションアッセイでは、eAR2が、アンドロゲン応答性マウス乳がんウィルスプロモーターからの転写を、アンドロゲン依存的に活性化することが示された。このmRNAの組織への分

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間におけるリガンド結合ドメインのアミノ酸配列の差異が天然および合成リガンドへの結合に及ぼす影響の程度については、まだ明確にされていない。この領域全体における配列の相同性の差が存在することは明らかであるが、変異が起こって機能を損失したヒトARの結合ポケット領域のアミノ酸(Quigley et al., 1995)が、この領域において、他のアミノ酸よりも魚類ARで高度に保存されているようである。

3.12.2.4 他器官における抗アンドロゲン作用: 肝臓および副腎 ピンクロゾリンおよびその代謝物はグルココルチコイド受容体には結合しないにもかかわらず(Kelce et al., 1994)、ラット(Monosson et al., 1999)およびイヌなどいくつかの哺乳類でのピンクロゾリン処理では脳下垂体-副腎皮質軸に変化をもたらすことが指摘された。実際、前者の無毒性量(NOEL)がイヌの副腎に対するピンクロゾリンの影響から確定された。さらに、肝臓機能へのピンクロゾリン(Monosson et al., 1999)およびフルタミド(Wada et al., 1999; Migliari et al., 1999)の影響についても着目すべきである。これらの抗アンドロゲンの肝臓における作用機序は解明されていないが、ARを通じてのアンドロゲンおよび抗アンドロゲン作用が、肝臓の発達および代謝のいくつかの側面に変化をもたらすことが知られている。特に酢酸シプロテロンは、抗アンドロゲン作用、プロゲステロン作用および抗グルココルチコイド作用をもつ薬剤であるが、肝臓の細胞分裂刺激物質としての役割を果たしている(Kasper et al., 1999)。肝臓におけるピンクロゾリンおよびフルタミドの作用機序については、これらの化学物質が長期暴露により有害な影響(雄ラットでフルタミド誘発性肝不全およびピンクロゾリン誘発性肝腫瘍)を引き起こすため、解明に向けた研究が必要である。

3.12.3 ER介在エストロゲン

3.12.3.1 概観 殺虫剤が子宮への応答作用などのエストロゲンアゴニストとして作用する能力は、30年以上前から知られていたが(Bittman et al., 1968)、人為的な化学物質のエストロゲン作用、例えば、ビスフェノールAやDESなどについては1938年に初めて報告された(Dodds and Lawson, 1938)。多くのエストロゲンが*in vitro*試験(例えば、ER結合、乳がん細胞増殖および転写活性)を用いて同定され、また、さらにMXC、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およびB、植物エストロゲン類(ゲニステイン)、エチニールエストラジオールおよびマイコトキシン(ゼアラレノン)などいくつかの物質は*in vivo*においてもエストロゲン作用を示した。また*in vitro*におけるエストロゲン作用が確認された別の物質で、*in vivo*で同様の作用は確認されなかった。したがって、*in vivo*での確認のないまま*in vitro*の結果を解釈するには注意が必要である。*In vitro*においてビスフェノールAおよびE₂(17 β -エストラジオール)のようないくつかのエストロゲンは、エストラジオールのある作用に対してビスフェノールAが拮抗するという予期しなかった作用が報告された(Gould et al., 1998)。植物エスト

ロゲンは大豆(イソフラボノイド)やベリー類、果物、穀物、野菜および木の実(リグナン)などの様々な植物に存在し、エストロゲン様化学物質への別の暴露源となっている(総説: Whitten and Patisaul, 2001)。結合に関する研究では、植物エストロゲンのイソフラボンがER、特にER-βに対して高いリガンド親和性を示しているが、*in vitro*細胞試験ではより低い結果が示された。*In vivo*のデータは、植物エストロゲンがヒトの通常の食事で見られる用量および血漿中濃度で広範囲の生物学的影響をもつことを示唆している。*In vivo*における影響のデータは骨、卵巣、脳下垂体、血管、前立腺および血清脂質で報告された。注意深く循環量を薬物動態学的に比較したデータがないため、種の感受性を正確に比較することができないが、ヒト有効用量(0.4~10 mg/kg/日)は、げっ歯類で影響があらわれる量(10~100 mg/kg/日)よりも一般的に低い。

3.12.3.2 MXC : エストロゲンおよび抗アンドロゲン殺虫剤 エストロゲン作用をもつ殺虫剤MXCは現在も市販されている。このDDT誘導体は、ある種においてはDDT代謝物より容易に代謝されるため、通常は生体内蓄積性をもたない。MXCは、ER-αのアゴニスト、ER-βのアンタゴニスト(Maness et al., 1998; Gaido et al., 1999)、そしてARのアンタゴニストであるため、EDCs作用の多様性の例となりうる。*In vivo*でMXCは、子宮、膈、脳(行動)および骨など多くの器官においてER-αを介したエストロゲン作用を示すが、視床下部-脳下垂体軸では作用を示さない。MXC処理では、ラットで長期大量暴露の後に高プロラクチン血症の誘発、LHの抑制、あるいは下垂体腫瘍の誘発はみられなかった(Gray et al., 1988, 1989, 1999c)。雄の成獣および幼若ラットにおいて、MXCは、アンドロゲンの作用に拮抗するが、これはあるいくつかの組織ではERを欠いているために、MXC代謝物がテストステロンおよびDHT誘導性遺伝子の発現、および組織の成長と分化を阻害していることを示している。多くの天然および合成エストロゲンは*in vitro*試験において、たとえ高濃度の場合でもARアンタゴニストあるいはアゴニストとして働き、ARに対する親和性を示す(Danzo, 1997; Baker et al., 1999)。

MXC自身は*in vitro*のER結合および転写活性試験において、弱い活性を示すか不活性である。純度の高いMXC(>99%)は純度の低いMXC(>95%)に比べて不活性である(Bulger et al., 1978a, 1978b)。MXCは、代謝活性化していくつかのモノヒドロキシおよびジヒドロキシ代謝物に変換してエストロゲン作用を示す。このうちの1つであるHPTEも、ER-αのアゴニストであると同時に、比較的強力なARおよびER-βのアンタゴニストである(Maness et al., 1998; Gaido et al., 1999)。

MXC処理をした雄の成獣ラットは、著しい高用量では精子形成の阻害による生殖能力の変化がみられた(Gray et al., 1999c)。低用量(約25~200 mg/kg/日)では、精子産生、精巣形態、あるいは血漿テストステロン量には影響はないが、精巣上体の精液貯蔵、精巣重量が減少した。離乳期にMXCが投与された場合には、思春期遅延および

性腺付属器官の重量減少など、次世代雄に対して多くの影響を引き起こす。一方で、雌の成獣ラットでは、MXCが雌の性行動(ロードーシス)の誘発という典型的なエストロゲンの影響を引き起こす。思春期遅延の状態においてLHまたはテストステロン循環量には影響がみられないが、血清プロラクチン濃度は上昇した。LHに影響が無いのは、脳下垂体を介して作用するのではなく、生殖器に直接作用することを示唆するものと考えられる。さらに長期暴露では、雄ラットで10ヶ月間(200~400 mg/kg/日)のMXC投与により、10週以内の思春期遅延、生殖能力の減少、および生殖行動の変化を引き起こしたが、E₂のシリコン注入と同様な慢性的持続的影響は起こらなかった。雌ラットにMXCを出産前および後1週間、腹腔内に0、5、50、150mg/kg/日を投与、さらに新生児に対して出生後7日目から直接MXCを投与した実験(Chapin et al., 1997a)では、高用量MXCで一腹児数が17%減少した。中用量および高用量では雄の包皮分離にそれぞれ8および34日の遅延が起こったが、AGDには変化がみられなかった。高用量の雄では未処理雌への受精が減少した。精巣上体精子数および精巣重量は高用量および上位2番目までの高用量でそれぞれ減少した。雌性の影響(膈開口、発情周期)は50mg/kg/日以上で観察された。

3.12.3.3 その他の脊椎動物における外因性エストロゲンの作用機序 外因性エストロゲンのいくつかは魚類ERのうちの1種類に対して、哺乳類ERと同様な親和性をもって結合する(Loomis and Thomas, 1999)。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、*o,p*-DDT、エチニールエストラジオールおよびMXCは、下等脊椎動物(魚類およびカエル)でエストロゲン作用を示す。鳥類および哺乳類では、*o,p*-DDTは雌の生殖管の発達を引き起こしたが、*p,p*-DDTでは起こらなかった(Bitmann et al., 1968)。

外因性エストロゲンのいくつかのものは、生殖腺の間性(Kloas et al., 1999)、雄におけるビテロゲン合成(Kloas et al., 1999; Lutz and Kloas, 1999)、および雌雄同体現象(半陰陽)やエストロゲン依存性の性的二型性(Noriega and Hayes, 2000)を引き起こす。クサガエルの仲間(*Hyperolius argus*, Hayes, 1998a; Hayes and Menendez, 1999)でエストロゲン依存性の体色変化を引き起こす有害物質は、雌ラットにおいて子宮への影響を起こす物質と極めて似ており、ER配列の相違にもかかわらずER-α機能において高い相同性を示している。

対照的に、MXCを代謝活性化することができない下等脊椎動物種では、エストロゲンとして作用しないため、エストロゲン活性をもつMXCは動物界全体にわたり広がるであろう。MXCのヒドロキシル化はエストロゲン活性と排出に必要である。したがって、MXCを代謝活性化できないこれらの種では、この殺虫剤をDDTと同程度に生体内蓄積する傾向にある。雄のナマズにMXCまたはBNFを単独あるいは組み合わせて前処理すると、MXC前処理ではMXCの生体内蓄積量が著しく減少したが、BNF前処理では起こらなかった。また、MXCに続いてMXC/BNFを前処理した場合、血中ビテロゲニンが著し

く誘導されたが、MXCのみではビテロゲニンに著しい増加はみられなかった。このように、この種においてMXCはエストロゲン代謝物を生成する能力が低いにもかかわらず、エストロゲン作用を引き起こすことができることが実証された(Schlenk et al., 1998)。ファットヘッドミノー(*Pimepehales promelas*)での短期生殖試験は性成熟個体で21日までの暴露で行われ、両性において複数の血中ステロイド(テストステロン、11-ケトテストステロン、エストラジオールE₂)濃度が減少し、また雄では血清中ビテロゲニンの著しい増加が起こった(Ankley et al., 2001)。ビテロゲニンが誘導された同じ濃度(3.56 µg/liter)では繁殖力の著しい減少も観察された。雄成魚のシープスヘッドミノー(*Cyprinodin variegates*)に*p*-ノルフェノール、MXCあるいはエンドサルファンを連続42日間まで暴露すると、エンドサルファンを除いた全てで暴露5日以内に投与量に依存した肝中ビテロゲニンmRNAおよび血漿タンパク質の増加が観察された(Hemmer et al., 2001)。MXCのエストロゲン様代謝物のHPTEではなくMXC自身が両生類の卵核胞崩壊に影響を及ぼすことは、細胞表面のヒドロキシプロゲステロン受容体の活性化に依存しており、この作用がERを介したものではないことを示している。本章3.8に記述されているように、最近の研究では、様々な外因性化学物質が、遺伝子的なステロイド作用のかく乱に加えて非遺伝子的なステロイド作用に影響を及ぼすことを報告している(Thomas, 1999)。低濃度(100 nM, 30~40 ppb相当)のエストロゲン様化合物ケボンおよび*o,p'*-DDEが、*in vitro*でAtlantic croaker(ニベ科の魚)の卵母細胞におけるプロゲステロン誘導性卵成熟を妨げることが発見されたことは、新しい形の内分泌かく乱の最初の証拠となった(Ghosh and Thomas, 1995)。続いて、エストロゲン様化合物による卵成熟のかく乱は、MXC暴露した両生類のアフリカツメガエルで確認された(Pickford and Morris, 1999)。さらに、ケボンはAtlantic croakerでの精子運動におけるプロゲステロンによる刺激作用を部分的に遮断することが示された(Thomas et al., 1998)。また *o,p'*-DDTおよびノルフェノールなどのエストロゲン様化合物も、ラットの平滑筋細胞およびcroakerの精巣でのアンドロゲン生成において迅速なエストロゲン様作用(アゴニストとして)を示した(Ruehlmann et al., 1998; Loomis and Thomas, 2000)。最近では、エストロゲン様化合物が受容体を介したメカニズムによって非遺伝子的なステロイド作用のかく乱する直接的な証拠が得られた(Thomas, 1999)。競合実験ではこれらの化合物が、非遺伝子的なステロイド作用のかく乱と同様に、魚卵母細胞および精子のプロゲステロン膜受容体、および魚精巣のエストロゲン膜受容体に結合することが報告された(Das and Thomas, 1999; Thomas et al., 1998; Loomis and Thomas, 2000)。

コイ(*Cyprinus carpio*)の遺伝学的雄個体群に対して4-*t*-ベンチルフェノールを暴露した場合、胚~幼魚期における3日間の暴露では、性分化あるいは始原生殖細胞の増殖に対する影響は確認されなかった。しかしながら、性分化前から性分化期にかけてのさらに長期的な暴露で

は卵管形成が引き起こされ、その増殖は清水に戻しても継続していた。孵化後24~51日間の暴露では、始原生殖細胞数が減少した(Gimeno et al., 1997)。ビスフェノールAは、雄のニジマス(*O. mykiss*)において500µg/literを連続14日間暴露すると、ビテロゲニン量の増加が観察されたが、より低量の暴露ではビテロゲニンは一定で変化しないかあるいは減少していた。しかしながら、応答個体と非応答個体の比率から考えると70µg/literの量で影響があらわれることが示された。500µg/liter暴露における平均肝臓中濃度は4.36 µg/gであった(Lindholm et al., 2000)。

グルタチオンS転移酵素タンパク質に連結した、爬虫類のグリーンアノールイグアナ(*Anolis carolinensis*)のクローンER、ニジマス(*O. mykiss*)の再クローンER、およびヒトERに結合する44種のPCBs、9種のヒドロキシルPCBsおよび8種のアラクロールの比較研究の結果、3種類のPCBsのみ(104、184および188)が3種すべての動物の融合タンパク質への結合をE₂と有意に競合することが明らかになった。ニジマス受容体に比べると、爬虫類およびヒトのデータにはより類似性があった(Matthews et al., 2000)。5種のモノ-オルトPCBs(58、60、68、70および74)および18種のジ-オルト位置換同族体の中の9種(18、44、49、99、101、112、128、138および153)は弱い結合を示し、また、他の3種(41、47および115)ではニジマス受容体に対して中程度の結合を示した。同様に、13種のトリ-オルト同族体はニジマスERのみに作用した。これらのデータは、脊椎動物のステロイド受容体全体にわたってリガンドに対する相対的な親和性に著しい差が存在する可能性を示唆している。

3.12.4 ステロイドホルモン合成阻害剤

3.12.4.1 概観 殺菌剤のいくつかのクラスは、特異的なCYP450酵素を阻害、特にステロール経路におけるラノステロールの14α脱メチル化を阻害することにより、菌の膜合成と成長を抑制するように開発された。ステロイド合成のプロセスは十分に保存されているため、これらの化学物質は哺乳類のステロイド合成をも阻害することができる。ステロイド経路にはいくつかのCYP450酵素が関与しており、各々に対する結合親和性は化学物質により異なっている。しかし一般には、比較的高濃度になるとこれらはCYP450酵素に対して非特異的な阻害剤となる。したがって、これらの影響は生殖系に限らず、哺乳類の副腎および肝臓におけるステロイド代謝、また無脊椎動物のエクジステロイド合成にも及ぶことになる(Schurmerlyer and Nieschlag, 1984; Pepper et al., 1990; Williams et al., 2000)。

3.12.4.2 ケトコナゾール 殺菌性イミダゾールの誘導体ケトコナゾールは、げっ歯類およびヒトのCYP450依存性モノオキシゲナーゼに属する様々な酵素、例えば副腎のコレステロール側鎖切断酵素および11β-水酸化酵素、ラットおよびヒト精巣の17α-水酸化酵素とC₁₇₋₂₀リアーゼなどを阻害する(Schurmerlyer and Nieschlag, 1984; Pepper et al., 1990)。例えば、*in vitro*でヒト精巣モノオキシゲナーゼ活性はケトコナゾール3.1µMで50%減少す

る。抗アンドロゲン治療としてのケトコナゾール使用の副作用には女性化乳房がある。しかし、ステロイド合成に対する影響は精巣特異的ではなく、卵巣と副腎での影響も報告されている。また*in vitro*でのヒトおよびげっ歯類の成体におけるライディッチ細胞機能への影響が報告されている。げっ歯類の成体への投与では、ケトコナゾールはただ一回の投与でも生殖に著しい影響を及ぼすことがある(Bhasi et al., 1986; Heckman et al., 1992; Waller et al., 1990)。卵巣と子宮のステロイド応答に対する影響は、妊娠維持を妨げる傾向があるので判別できるが、テストステロン合成の減少による雄の生殖系の発育への影響を観察するのは困難である。妊娠している母イヌへのケトコナゾール処理では、卵巣プロゲステロン合成への影響により妊娠維持能力に影響があるとみられる。その結果、流産や死産を引き起こし、仔イヌにあらわれる影響の観察が妨げられる可能性がある(Gray et al., 1999a)。

3.12.4.3 アロマトラーゼ阻害剤 アロマトラーゼCYP450はC19アンドロゲンを芳香核をもつC18エストロゲンに変換する。アロマトラーゼを阻害する数多くの治療薬が開発され、閉経後の乳がん治療に用いられてきた(Brodie et al., 1999)。このP450酵素は、様々な組織および多くの種で高度に保存されているが、他のCYP450酵素との全体的な遺伝子相同性(遺伝子が1つではないため)は約30%にすぎない。したがって、この酵素は総括的なスーパーファミリーの中で別の遺伝子ファミリーに属すると考えられている。ステロイド経路における他のP450酵素との配列相同性がほとんど無いために、アロマトラーゼ阻害剤はケトコナゾールなどの薬剤よりも高い特異性を示す可能性がある。この作用を検査するために酵母を用いたスクリーニング試験が提案された(Mak et al., 1999)。トリブチルスズ(TBT)に暴露した軟体動物におけるインボセックスの誘発は、アロマトラーゼの阻害、それに続くエストロゲンの欠乏、およびアンドロゲンの増加が関連するとされている。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、両性における不妊を引き起こす。フェナリモルの投与は、おそらく脳におけるアンドロゲンのエストロゲンへの変換を阻害することにより雄ラットの繁殖行動を抑制しており(Hirsch et al., 1987; Gray et al., 1998)、またE₂は分娩期が近づくにつれて陣痛を誘発する重要な役割をもつために分娩も阻害される。哺乳類におけるフェナリモルの作用はケトコナゾールでみられるものとは異なっており、それはフェナリモルが雄ラットのアンドロゲン合成あるいは妊娠期におけるプロゲステロン合成を阻害するものではないからである。フェナリモルは、さらに無脊椎動物のエクジステロイド合成を阻害し、一方、爬虫類ではアロマトラーゼ阻害剤が雌の生殖腺の性決定を阻害する(Williams et al., 2000)。

フェナリモルは、Wistarラットにおいて雄の生殖能力に用量依存的な低下を引き起こしたが、フェナリモルを妊娠および授乳期などを含めて生涯投与された母ラットからは、解剖学的に正常な子孫が生まれ、影響のないことが確認された(Hirsch et al., 1987)。交尾後に膈内に精

子が確認できないことが不妊に関係があるという観察に基づいて、この結果は雄の性行動の欠如が原因であると思われた。これに続きGrayとOstby (1998)は、フェナリモルを離乳期から成体に至るまで毎日投与した場合、雄ラットの生殖行動に用量依存的な減少が起こることを報告した。これらの結果は、フェナリモルには主に脳におけるテストステロンのE₂への転換を阻害することにより、雄の性行動を低下させる作用があることを示唆している。Hirschら(1987)は、母親がフェナリモル投与された新生児の脳中フェナリモル濃度が3~4倍高くなり、半減期は他の脳の領域に比べて4倍長いことを報告し、これは中枢における作用と一致している。

遺伝的に全個体が雌であるチヌーク鮭(cinook salmon, *O. tshawytscha*)に対して、性腺が分化全能性をもつ時期に非ステロイド性アロマトラーゼ阻害剤であるファドロゾール[5-(5,6,7,8-tetrahydroimidazo[1,5- α]-pyridin-5-yl)benzotrile monohydrochloride, あるいはCGS 16949A]を2時間暴露すると、遺伝的には雌の鮭が雄として成長する。こうして得られた雄がもつ精巣は、大きさおよび機能の両面において遺伝的雄のものとは区別がつかず、生殖能力をもっていた(Piferrer et al., 1994)。ファドロゾールを雌のギンザケ(*O. kisutch*)成魚に投与すると、血漿17 α ,20 β -Pの増加にともない、血漿E₂の低下が観察された。投与10日後に体重kgあたり10mgのファドロゾールを暴露した魚の67%は排卵が起こり、対照群では0%であった(Afonso et al., 1999)。このことは卵成熟およびそれに続く排卵が進行したことを示している。性成熟期間における雄ギンザケへのファドロゾール投与は、脳からのE₂の分泌を抑制し、血漿中17 α ,20 β -Pを増加させた。また投与された雄は通常の雄よりも早く排精が始まった。さらに、ファドロゾール投与された魚は、投与4日以内でテストステロンおよび11-ケトテストステロンが対照群に比べて高濃度となった(Afonso et al., 2000)。

3.12.4.4 5 α -レダクターゼ阻害剤 5 α -レダクターゼは、テストステロンをより強力なARアゴニストであるDHTに変換するのに重要な酵素である。DHTは特に雄の外性器を雄性化する働きをもつ。フィナステリドは、臨床でアンドロゲン依存性前立腺がんの治療、さらに成人男性の脱毛治療に広く使用されている5 α -レダクターゼ阻害剤である。これは環境汚染物質ではないが、DHTが男性の生殖管の発達に重要な役割をもつために例として用いられ、男性生殖系、特に前立腺および性器の発達を抑制する作用は重大である。妊娠6~20日のラットへの経口投与では(Imperato-McGinley et al., 1992)、0.003 mg/kg/日の低用量でAGDが短縮し、0.1 mg/kg/日で尿道下裂の開始が観察され、また100 mg/kg/日では次世代の100%に影響がみられた。25および50 mg/kg/日では前立腺サイズに著しい減少がみられたが、さらに高用量ではそれ以上減少しなかった。フルタミドのAR遮断と異なり、フィナステリドは用量をさらに増加しても、前立腺分化を完全に抑止せず、また外性器を完全に雌性化することもなかった。これらの結果は、ARとの作用レベルにおいてはテストステロンがある程度DHTを補うことができること

を示唆している。しかしながら、ウォルフ管の分化はDHTの阻害に影響されずテストステロン依存性を示しているが、精囊の発達には阻害された。AR遮断は、5 α -レダクターゼ活性の阻害よりも精巢下降を強く阻害することができる(Spencer et al., 1991)。フィナステリドは、生殖結節の尾部から頭部までの尿生殖洞の移動を補佐するのに必要な間葉形成を抑制することで尿道下裂を引き起こすことが示唆されている。さらに、妊娠20~100日のアカゲザルの母親にフィナステリド2mg/kg/日を経口投与すると、雄の胎児における外性器の異常を起こすことができる。同様の投与での雌の胎児、あるいは同妊娠期間に雌雄いずれかの胎児へ1日あたり800 ng/kgまでの連続静脈内投与では、外性器の奇形は観察されなかった(Prahalada et al., 1997)。

3.12.4.5 フタル酸エステル フタル酸エステル類は、多様な種類があり、プラスチックの可塑剤として製造工程中で多く使用される化学物質である。また、以下に述べるように、ある種のフタル酸エステル(例えばジブチルとジエチルヘキシル)は胎児の精巢におけるテストステロン合成能力を変化させることにより発生に影響を及ぼす。何種類かのフタル酸エステルの成体における生殖毒性については明らかにされている。例えば、DEHPはラット成体および幼体の精巢を標的とすることが示されている(Gray and Butterworth, 1980; Sjoberg et al., 1985)。精巢毒性の作用機序は代謝物(モノエステルのフタル酸モノエチルヘキシル(MEHP))を介しており、精巢中の標的細胞はセルトリ細胞であるが、正確な生化学的相互作用はまだ解明されていない(Heindell and Chapin, 1989; Heindell and Powell, 1992)。エストロゲンおよびアンドロゲン両作用との相互関連などフタル酸エステルの内分泌活性作用についても注目が集まっている。

Zacharewskiら(1998)は、リガンド結合競合試験においてDBP、BBPおよびDHPがERへの結合に対してE₂と弱い競合作用をもつことを報告した。ヒトエストロゲン受容体遺伝子Gal4-HEGO、およびGal4調節ルシフェラーゼリポーター遺伝子17m5-G-Lucを一過性に導入したMCF-7細胞を用いた遺伝子発現試験では、10nMのE₂が示す活性を100%として比較すると、10 μ MのDBP、BBP、DHPではそれぞれ36%、42%、20%の活性を示した。

Gal4-HEGOおよび17m5-G-Lucを安定的に導入したHeLa細胞では、BBPだけがルシフェラーゼ活性(32%)を示し、また選択分離培地におけるエストロゲン応答性組換え酵母PL3株ではERを介した最小限の弱い活性がみられた。その他の5種類のフタル酸エステルでは、*in vitro*のどの試験においても有意な反応は観察されなかった。

*In vivo*で、8種類のフタル酸エステルを20、200、2,000mg/kg経口投与した幼若卵巣摘出SDラットでは、いずれも生殖性に関わるような子宮重量の増加はみられなかった。同用量のフタル酸エステルを投与した卵巣摘出成獣ラットでは、膈上皮の角質化を起こすまでの影響はみられなかった。これらの結果、いくつかのフタル酸エステル(DBP、BBPおよびDHP)のみが、高濃度でいくつかの*in vitro*試験においてERを介した弱い活性を示し、8

種類のフタル酸エステルはいずれも子宮肥大試験および膈角化試験に基づく結果から*in vivo*でのエストロゲン様作用を起こさないことが示された。こうした結果から、*in vitro*の試験結果のみに基づき化学物質の危険性を評価するには、十分な注意が必要であることがわかる。

さらに重大なことに、いくつかのフタル酸エステル(例えば、DEHP、DBP、BBP、フタル酸ジイソニル、しかしDEP、DMP、DOTPではない)は、雄の胎児で抗アンドロゲン作用を引き起こす。例えば、雄の仔ラットが性分化時期にDBPまたはDEHPに暴露されると、明らかに非受容体型のメカニズムによるにもかかわらずアンドロゲン依存性器官に奇形が起こる(Gray et al., 1999a, 2000)。重要なことは、重大な影響が従来定義されている「器官形成期」以外の期間に起こるため、これらの作用が標準の発生毒性研究において見落とされていることである(Ema et al., 1992, 1993, 1994; Tyl et al., 1988; Narotsky et al., 1995)。

DBPの多世代試験では、親ラットF₀と比較してF₁ラットは一腹児数が少なく、かつ個体は小さかった。また精子数が50%減少するという著しい生殖能力への影響がみられた。さらに、これらのF₁動物では投与した最高量(~660 mg/kg/日)において、標準の発生毒性試験の用量比較では観察されなかった多数の雄生殖管の奇形が認められた(Wine et al., 1997)。Mylchreestら(1998)は、F₀とF₁の世代間での暴露時期の厳密な差を調べ、妊娠期および授乳期に暴露させて次世代の影響を観察した。その結果、雄の仔ラットの包皮分離遅延およびAGDの短縮とともに、精巢上体における奇形および精子数減少が高い発生率で示された。多世代試験で観察された全ての生殖管の奇形はこのような短期暴露法で再現でき、また次世代雌では影響がみられなかった。しかし、別の多世代試験において、DBPの250mg/kg/日(投与最小量)暴露で雌雄両性のF₁ラットに奇形が引き起こされた(Gray et al., 1999a)。Mylchreestら(2000)は、妊娠晩期(妊娠12~21日)に暴露期間を絞ることにより、彼らが既に確認していた影響を再現し、さらに次世代雄における乳頭遺残の発生率上昇を報告した。すなわち、DBPは、LOAEL100mg/kg/日で生殖管発生に影響を及ぼし、古典的意味でのARアンタゴニストの特性を全て有していた。この値は、他のDBP毒性に対するLOAEL値および大部分のNOAELよりはるかに低い値である。Mylchreestら(1999)は、ARアンタゴニストであるフルタミドとDBPの影響を比較して、多くの影響の型の類似性を示すとともに、DBPの奇形においての第一標的が精巢上体であるのに対して、フルタミドでは前立腺が主な標的であるなどの組織感受性における多くの差異も指摘した。DBPもフタル酸モノブチルもARには直接作用を示さなかった。

DBPおよびDEHPがそれらのモノエステル代謝物と同様に哺乳類(ラットまたはヒト)のARに結合しないという結果から、これらの影響がARアンタゴニストとしての作用によらないことが立証されている(Mylchreest et al., 1999; Parks et al., 2000)。雄胎仔ラットにおける細胞および分子レベルでのフタル酸エステルの正確な作用は解

明されていないが、精巣が第一標的であると考えられる(Mylchreest et al., 1998, 1999; Gray et al., 1999a; Parks et al., 2000)。母ラットへのDEHPおよびDBP処理により、胎子のテストステロン合成(Parks et al., 2000)およびアンドロゲン量(Mylchreest et al., 1999; Parks et al., 2000)が急激に減少し、また、ライディッヒ細胞の形態と機能が明らかに変化した。発生におけるフタル酸エステル毒性に対して特定のARが思春期雄ラットの精巣毒性に対するARと類似していることは、何らかの共通した初期の分子作用がこれらの有害な結果の開始点となっていることを示唆している。フタル酸エステルに誘導される毒性作用のメカニズムは、脊椎動物全体に通じた作用であると考えられる。フタル酸エステルの発生における生殖毒性はモルモット、フェレット(Lake et al., 1976)、ウサギ(DBP; Veeramachaneni, 2000)、ハムスター(MEHP)、およびPPAR α -ノックアウトマウスを含むラットやマウスのいくつかの系統において観察されている。PPAR α -ノックアウトマウスがDEHP処理後に精巣および腎障害を起こすことは、明らかに肝臓におけるMEHPの毒性に関与しているこの受容体が、この他の毒性発現形式には関係していないことを示唆している(Ward et al., 1998)。

魚類における多世代試験で、メダカを環境中の濃度のDBPに暴露させると、F₀でなくF₁で生殖腺機能の異常が認められた(Patyna et al., 1999)が、この種ではエストロゲン様応答は引き起こさなかった(Patyna et al., 1999)。またDBPは、無尾類の発生においてアンドロゲン依存性器官を変化させることが示された(Higuchi et al., 1999; Ohtani et al., 2000)。

3.12.5 AhRアゴニスト: TCDD, PCBs, PCDFs

このクラスのEDCsは、魚類および野生生物で特性が明らかにされた生殖系および個体群に対する多くの影響に関与している(Peterson et al., 1993)。これらの観察された結果は、内分泌かく乱仮説を裏付けるものとして用いられ、またTCDDおよび類似構造をもつ合成ハロゲン化炭化水素によって引き起こされると考えられるため、内分泌かく乱仮説に関連付けてその作用機序を解明することが重要である(Birnbaum, 1994)。TCDDにより引き起こされた影響は、シグナル伝達における作用として分類することができるが、これは、狭義のステロイドホルモン受容体の作用だけでは理解できない。これらの結果の全容からは、ほぼ全てのTCDDの作用がAhRを介しているという仮説が裏付けられる(Okey et al., 1994; Hankinson, 1995)。このAhRは、PolandとGlover (1977)によって最初に発見された細胞質受容体タンパク質である。AhRのシグナル伝達経路はまずTCDDが拡散により細胞内へ入ることから始まり、そこで熱ショック蛋白質90(Hsp90)および38-kDa、イムノフィリン関連タンパク質も含む(Ma and Whitlock, 1997; Carver and Bradfield, 1997)細胞質内のAhRタンパク複合体に高い親和性をもって結合する。リガンドの結合はAhRを活性化し、AhR 関連タンパクの解離を刺激する。そしてリガンド-受容体複合体は続いて核内へ移動し、そこでAhR

核内移行因子(ARNT; Hankinson, 1995; Probst et al., 1993)との二量体を形成する。このヘテロ二量体は、DNA上のダイオキシン応答領域のコンセンサス配列GCGTGを認識して結合することができる(Denison et al., 1989; Dong et al., 1996)。この一連の作用により、CYP450(CYP1A1, CYP1A2; Quattrochi and Tukey, 1989)、NAD(P)H:キノン還元酵素(Favreau and Pickett, 1991)、クラス3のアルデヒド脱水素酵素(Asman et al., 1993)、およびグルタチオンS-転移酵素(Paulson et al., 1990)などの標的遺伝子の転写が促進あるいは抑制される(Nebert et al., 1993; Schmidt and Bradfield, 1996)。

低酸素ストレスにตอบสนองして、ARNTタンパク質はHIF-1 α とも二量体を形成し遺伝子発現を活性化させる(Guillemin and Krasnow, 1997; Semenza, 1994; Wenger and Gassmann, 1997)。制御される遺伝子は、赤血球造血に関わるEpo(Semenza, 1994)、血管新生に関わるVEGF(Forsythe et al., 1996; Goldberg and Schneider, 1994; Maxwell et al., 1997; Shweiki et al., 1992)、糖輸送に関わるGLUT-1(Semenza et al., 1994; Wenger and Gassmann, 1997)などがある。AhR, ARNTおよびHIF-1 α は、basic-helix-loop-helix (bHLH) /PAS転写因子ファミリーに属し、5つの生物界全ての代表的な器官に存在している。ARNT-HIF α のヘテロ二量体が低酸素にตอบสนองすることに加えて、PASタンパク質は発生および分化(Nambu et al., 1991; Isaac and Andrew, 1996)、生物時計の制御(Huang et al., 1995; King et al., 1997)、およびステロイド受容体のシグナル伝達(Yao et al., 1993)にも関与している。ARNT欠損マウスが妊娠10.5日を越えると生育できないという事実は、このタンパク質の重要性をさらに補う証拠である。TCDDに暴露して続いてAhRを介してARNTが加わることにより、ARNT依存の他のシグナル伝達経路が阻害される可能性があるかもしれない(Chan et al., 1999)。すなわち、AhRアゴニストは多くのシグナル伝達経路に作用し、また様々な遺伝子生成物の産生を促進あるいは抑制する能力をもっており、様々な種において発育の多くの異なる段階で広範囲にわたる生物学的影響を引き起こす可能性がある。このような反応のいくつかは、従来の内分泌系を介した作用の定義にはうまく合致しない。したがって、ここでの評価において、AhRへの結合に関連した生物学的影響だけで内分泌系を介した作用機序を解き明かすことは十分でないと考えられる。その代わりに、本章の終わりにリストされた判断基準を用いてAhRを介した作用がこの総説に含まれるべきかどうかを判定した。このような情報が野生生物の研究にあまり利用できないため、野生生物における結果からヒトについて推定する上で困難があった。

妊娠15日でTCDDを1回0, 0.05, 0.20, 0.80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 子宮内暴露させた雄仔ラットは、思春期遅延および生殖器重量の変化とともに生殖能力の低下が認められた(Gray et al., 1997a)。成長と生存率は0.80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で低下し、開眼は促進され(全ての投与群)、また思春期遅延(0.20と0.80 $\mu\text{g}/\text{kg}$)がみられた。投与された仔ラットは、前立腺および精嚢重量の一時的な減少がみられ、また精巣上体の精液貯蔵量低下および陰茎亀頭の永久的な縮小がみられた。

射精精子数は、精巣上体尾部、頭部、体部、あるいは精巢(影響されない)の精子数に比べてかなり減少していた(0.8 µg/kg投与群で45%、0.05と0.2 µg/kg投与群で25%まで)。同様に子宮内暴露された雌仔ラットでは、0.80 µg/kgで膣開口の遅延がみられた。膣糸(vaginal thread)の残存は0.20µg TCDD/kgで27%、0.80µg TCDD/kgで92%が仔ラットに認められた(Gray et al., 1997b)。これらの結果は、思春期前の発生過程における卵巣機能の異常に起因するのではないと思われる。母ラットに1µg/kgを投与した21日齢あるいは28日齢の仔ラットでは、血清E₂濃度および卵巣でのE₂生成に減少はみられなかった。さらにTCDD処理ラットにおいて、部分的あるいは完全な陰茎裂がみられ(0.20 µg/kgで10%、0.80 µg/kgで60%)、同じ用量ではさらに、尿道口長の増加、尿道口から陰茎先端までの距離の増加、尿道口から膣口の距離の短縮がみられた。妊娠率は正常にもかかわらず、妊娠までの時間は0.80 µg/kgの投与で遅延した。20月齢で剖検した結果、TCDD投与群の雌は生殖管に組織病理学的変化が観察された。したがって、TCDDは、エストロゲンおよび抗アンドロゲンに類似した作用および異なる作用の両様式で生殖発生に影響を及ぼしている。胎仔への8~13 pptの低用量TCDDもこのような生殖管の変化に関与している(Gray et al., 1995a, 1995b, 1997a, 1997b; Hurst et al., 1998, 2000a, 2000b)。

妊娠11.5日に2 µg/kgのTCDDを1回暴露した後、対照群およびTCDD処理F₁の雌は両者とも対照群雄との交尾ができた。そのうち20%のTCDD処理F₁雌は妊娠に至らなかった(Wolf et al., 1999)。さらに、妊娠したTCDD投与群F₁の雌の38%は出産間近に死亡し、また、投与群の妊娠親における着床数、出生仔数の減少がみられた。F₂では、出生0日の親へのTCDD投与により離乳までの生存率が劇的に減少した(投与群15% : 対照群78%)。また、TCDDを子宮内暴露させたハムスターのF₁雌では外部泌尿生殖器の奇形が観察され、ほとんどの雌で完全な尿道下裂がみられた。このようにTCDDの有害な影響は、F₁世代は妊娠や授乳期の間接的暴露であるにもかかわらず、2世代(F₁とF₂)にわたり持続された。

神経発生における変化は、実験動物の出生前TCDD暴露による健康への影響の別の指標となる。Mablyら(1992)は、妊娠母ラットへの暴露後の出生後雄仔ラットの性行動における脱雄性化と雌性化を報告した。性行動が調査された時期には、AhR依存肝臓CYP450濃度およびCYP依存酵素EROD活性が対照群との差異がなかったことは、性行動に対する影響は、発生における暴露の影響が長期持続し、また性ステロイド機構の作用が阻害されたことを示している。このモデルで、脳の異なる領域におけるER濃度が測定された(Bjerke et al., 1994)。AhR受容体は発生段階の神経系にすでに存在しているが、正常な発生でのその役割はあるとしてもまだ解明されていない。また、脳の発生におけるAhRの関与についての直接的な証拠もまだない。

3.12.6 卵生脊椎動物における*p,p'*-DDE誘導性卵殻薄化のメカニズム

1960年代から1970年代にかけて北米では殺虫剤DDTが高濃度で環境中に広がり、感受性の高い何種かの鳥類では卵の殻が異常に薄化して抱卵できなくなりその数が減少した(Cooke, 1973)。DDTの使用がアメリカで禁止され環境中の濃度が徐々に低下してからは、これらの種(例えば、ミミヒメウ)の多くは急速に増加した(Ludwig, 1984)。影響の受けやすい種における*o,p'*-DDTおよびその安定型の代謝物*p,p'*-DDEの影響による卵殻薄化の現象はよく知られている。ペリカン、鷯、ムクドリ、カツオドリなどの白亜質の卵を生む種は、DDE暴露の後に殻が非常に薄く、あるいは消失した卵を生むことがある(Gould, 1972; Cooke et al., 1976)。これらの種では、卵殻形成から終了までの過程に最もDDEの影響を受けていた。セグロカモメ(Cooke, 1979a, 1979b)およびアオサギ(Cooke et al., 1976)のような他の鳥類では、DDE暴露により卵殻の全ての層における薄化がみられた。DDE処理に起因する卵殻のミネラル組成の変化についてはほとんど調査がおこなわれていない(Longcore et al., 1971)。

DDEに誘導される卵殻薄化のメカニズム(種間で異なる可能性がある)には、いくつかの可能性が示唆されている(Cooke, 1973, 1979a, 1979b)。しかし、ニワトリやウズラなど最も知られている鳥類の実験種の多くは、DDE誘導の卵殻薄化の影響が生じない(Scott et al., 1975)。卵殻薄化のメカニズムはまだ完全に解明されていないが、この分野の研究では、主にある種の感受性の高い鳥類に焦点があてられた(Lundholm, 1980, 1982, 1984a, 1984b, 1984c, 1985, 1988, 1993, 1994; Lundholm and Mathson, 1983; Lundholm, 1987; Lundholm and Bartonek, 1991, 1992)。提示されたメカニズムは、1) 血液から卵殻腺部へのカルシウム取り込み、排出、輸送の変化によってカルシウムの供給が制限される(Peakall et al., 1975; Haynes and Murad, 1985; Taylor and Dacke, 1984; Hagmann, 1982)、2) 炭酸脱水酵素の阻害により殻形成に有用な炭酸塩が減少する(Bitman et al., 1970; Peakall, 1970a, 1970b; Pocker et al., 1971; Cooke, 1973; Miller et al., 1976; Eastin and Spaziani, 1978)、3) ステロイドホルモンの受容体や機能が変化することである(Lundholm, 1985, 1988)、ことである。

現在、DDE誘導の卵殻薄化のメカニズムに関する有力な仮説としては、卵殻腺部粘膜でのPG阻害があげられている。PGは、鳥類の生殖の制御調整に重要な役割を果たしている(Lundholm and Bartonek, 1992)。In vitro 試験およびそれに続く in vivoの暴露試験で、アヒルの殻腺粘膜におけるPG合成が*p,p'*-DDEにより減少した(Lundholm and Bartonek, 1992)。*p,p'*-DDT あるいは *o,p'*-DDE は、卵殻薄化を引き起こす能力を保持しながらも、これらの同族体は in vitro試験でPGの合成を阻害しなかった。さらに、インドメタシン処理でも卵殻の厚みが減少した。DDE処理したアヒルの卵殻腺粘膜において、フロセミドに非感受性でPG刺激性のHCO₃⁻の輸送が阻害されるという仮説が提示されている。しかし、それ以降の実験ではその仮説は支持されていない(Lundholm,

1994)。

DDEに引き起こされる卵殻の薄化のメカニズムは、かなり複雑であることが示唆されている。卵殻薄化は、影響を受けた卵のカルシウム濃度が低下することに関係しており、また、マガモでは、DDEが卵殻腺部粘膜から腺腔へのカルシウム輸送の減少に関与している。鳥類へのDDE処理は、カルシウム輸送の変化に関係した様々な生化学的影響を与えている。このような多くの生化学的指標は相互に絡み合い、また、DDEの直接の標的がどこであるか、そして単にその作用によってのみ影響が及んだのはどこか、ということを決定するのは難しい。またDDEによる卵殻薄化に対する感受性は、鳥類の種によって異なるという事実からこの状況は複雑になり、多様な卵殻異常の結果からわかるように、異なる種における卵殻薄化は、異なるメカニズムによって引き起こされている可能性がある。

DDEおよび関連化学物質が引き起こす卵殻薄化は、野生生物の内分泌かく乱作用で最もよく引用される例の1つであるが、作用機序に関しては多様な仮説があり、それが内分泌かく乱作用の結果であるという確証はない。腺部粘膜でのPG合成が変化するという結果が、この関与についての最も有力な検証である。

3.13 発がんにおけるEDCの作用機序—アトラジンの影響

雌SDラットにアトラジン(トリアジン系除草剤)400 ppmを104週間にわたって混餌投与した長期投与試験で、乳がんの発生率の増加が観察されたことから、アトラジンの内分泌かく乱作用の懸念が生じた。これらの腫瘍は対照群にも認められたが、投与雌の方が早い時期に出現した。その他の腫瘍は、アトラジン投与された雌あるいは雄SDラット、または雄および雌のFischer344ラットのいずれにも認められなかった(Stevens et al., 1994; Thakur et al., 1998)。

早期発症の乳がんの発見によりアトラジンのエストロゲン様作用の調査がはじまったが、平衡状態下でアトラジンはラット子宮のERへの結合に対してE₂と競合しなかった。細胞質をトレーサーとのインキュベート前に25でブレインキュベートした場合、弱い競合が認められた(Tennant et al., 1994a)。他の研究では多少矛盾する結果が観察されている。成獣Fischerラットに毎日120 mg/kgを7日間投与した結果、正常な性周期の雌が減少し、発情休止期が著しく増加した。交配率は、投与後最初の1週において低下したが、受精したものにおける妊娠率には影響がなかった(Simic et al., 1994)。しかしながら、卵巣摘出SD成獣ラットに300mg/kgまでのアトラジンを3日間強制経口投与した場合、子宮重量の増加および子宮プロゲステロン濃度の増加はともに認められなかった。これはエストロゲン様の作用がないことを示唆している。E₂ (2 µg/kg 皮下投与)が300 mg/kgのアトラジンと共に経口投与された場合、子宮肥大に対する弱い阻害作用(~25%)が認められた(Tennant et al., 1994b)。同様の研究では、未成熟雌のSDラットに0、50、150、300 mg/kgのア

トラジンを3日間強制経口投与した。その結果、子宮重量は増加しなかったが子宮内プロゲステロン受容体およびペルオキシダーゼの活性の減少が認められた。しかし、E₂と組み合わせることで子宮内プロゲステロン受容体との結合および子宮内ペルオキシダーゼ活性の減少などのアトラジンの抗エストロゲン作用は観察されなくなった(Connor et al., 1996)。これと同じ研究では、アトラジンはMCF-7細胞の基本的あるいはE₂に誘導された増殖には影響がなく、またGal4制御下のヒトERキメラを導入したMCF-7細胞におけるE₂誘導ルシフェラーゼ活性に対するアゴニストあるいはアンタゴニスト作用も示さなかった。

生殖機能への影響をさらに評価するために、4日間の規則的な性周期をもつLEラットおよびSDラットの雌を選別し、アトラジン0、75、150、300mg/kg/日を21日間強制経口投与した。両系統のラットにおいてアトラジンが4日間の性周期に乱れを引き起こした。LEラットでは全ての用量で影響が現れたが、SDラットでは効果が現れるには、より高用量(150mg/kg/日)で長時間を要した。発情休止期間の延長は、血清プロゲステロン濃度の上昇および低濃度のE₂により偽妊娠状態を繰り返すことが関係していた。このホルモン条件が乳がんの発生を引き起こすことは実験者も考慮に入れていなかったが、実験での最低用量で発情期が引き延ばされる徴候は観察されていた(Cooper et al., 1996)。

乳がんの早期発症において示された系統による差(Fischer344ラットで非感受性:SDラットで感受性)は、これらの系統での正常な生殖管の加齢における差異によるものであった(Eldridge et al., 1994; Stevens, et al., 1994; summarized in Chapin et al., 1996)。雌のSDラットの生殖周期は1歳足らずで降りし始めるが、これはおそらく脳下垂体へのGnRHの放出を制御する視床下部のアドレナリン作動性神経の感受性が消失することによる。この感受性の消失は、FSHおよびLH分泌を低下させ、最終的に排卵を遅らせる。排卵の遅れが、次にエストロゲンへの暴露を引き延ばし、また膺の角化の持続という明白な結果をもたらす。対照的に、雌のFischer 344ラットのアドレナリン作動性神経は、エストロゲン刺激に対する感受性を消失しないとみられ、また、規則的な生殖周期はより長い期間にわたり維持される。正確に言えば、Fischer 344ラットの生殖系の加齢は、日々のPRLサージの制御不能、黄体活動延長、およびプロゲステロン分泌量上昇によるものと考えられる。したがって、Fischer 344ラットとは異なり、SDラットの加齢における内分泌環境では乳がんが発生しやすく、これらの系統の年齢に対応した乳がんの自然発生率の差を解釈することができる。

離乳期にアトラジンへの暴露を開始した場合、中枢神経系の機能に対する影響と一致して、雄(Stoker et al., 2000)および雌(Laws et al., 1996; 2000b)の両ラットの思春期の発現に変化がみられた。雄ラットでは、出生後23日に12.5mg/kg/日の低用量で投与を開始した場合、包皮分離が遅延した。出生後53日では、50mg/kg/日を投与し

たラットの前立腺重量が減少したが、精巣重量では認められなかった。雌ラットでは、膣開口の遅延には50mg/kg/日が必要であり、また100mg/kg/日において膣開口後の15日に性周期の変化がおこり、雌の方は感受性がそれほど高くはなかった。さらに、PC12細胞に関する*in vitro*の研究では、アトラジンが細胞におけるチロシン水酸化酵素を介したドパミン合成、およびドパミンβ-水酸化酵素を介したノルエピネフリン合成を抑制することが示唆され、その結果、ノルエピネフリンを放出する神経細胞の作用の低下が引き起こされる(Das et al., 2000)。しかしながら、アトラジンがSDラットの生殖軸における神経内分泌系の加齢をどのようにして促進するかについては解明されていない。

アトラジンは、他の脊椎動物の神経内分泌系にも影響を及ぼす可能性がある。排卵した雌のタイセイヨウサケ (*Salmo salar*) は尿中にプライマーフェロモンを放出するが(F型プロスタグランジン)、これは成熟した雄サケの嗅覚により検知され、性ステロイドおよび放出可能な魚精の増加を引き起こす。雄の若いサケへのアトラジンの短期暴露では、PG F_{2a}に対する嗅覚反応が著しく低下した。さらに同様の暴露で、排卵した雌サケの尿による誘引効果に反応する能力が低下した。アトラジンはさらに精巣にも影響を及ぼしアンドロゲン分泌を変化させ、この種における新たな作用機序が示唆された。

3.14 神経毒性におけるEDC関連の作用機序

3.14.1 概要

金属、有機溶剤、農薬、ポリハロゲン化芳香族炭化水素、天然神経毒、および薬剤/依存性薬剤など、作業現場における850種類以上の化学物質が神経毒性を有することが明らかになっている(IPCS, 2001b)。生殖に関わる内分泌系は、はじめに神経内分泌系による制御をうけるため、これらの化学物質はEDCsである可能性があるといえる。しかしながら、神経系と内分泌系間には緊密な相互作用があるが、ホルモン作用に影響を及ぼす可能性が知られている化学物質でさえ、二次的な影響から一次的作用機序を解明することは通常困難である。内分泌かく乱化学物質が神経系に影響を及ぼすメカニズムの大部分は未知であるが、ホルモンの神経機能との相互作用における次の2つの異なる機序を考慮すべきなのは明白である。すなわち、1) 成体において一過性の変化をもたらすホルモン活性の特性に関連した影響、2) 神経発生期における神経行動の機能、特に性別依存性および性的行動を永久的に変化させるホルモン依存のプロセスに対する組織的な影響、である。両作用はともにエストロゲンあるいはARなどの特異的ホルモン受容体が関与しているか、あるいはホルモンの影響を受けることが報告されている神経伝達物質に対する受容体の変化するためである可能性がある。例えば、GABA受容体、ムスカリンおよびニコチン受容体、NMDA受容体、σ受容体、および神経ペプチド受容体は、セカンドメッセンジャーにつながる膜受容体とともにステロイドホルモン作用にも関係している(Mensah-Nyagan et al., 1999)。

さらに複雑なことには、神経伝達物質への影響の性質およびそれが内分泌系を介するものであるかは、構造的に極めて近い化合物であっても異なる可能性がある。例えば、胎児期/新生児に3,4,3',4'-テトラクロロビフェニルを暴露すると、前頭葉皮質のドパミン濃度、および黒質のドパミンとその代謝物濃度が上昇したが、2,4,2',4'-テトラクロロビフェニルでは前頭葉皮質および尾状核のドパミン濃度が著しく減少した。両者ともこの変化は成体になるまで持続するものであった(Seegal et al., 1997)。この研究では、脳内ドパミンの減少は、アセチルコリン受容体の機能の変化にともない、PCB同族体の誘導によりドパミンの合成が抑制された結果であることが示唆された。しかし、脳内ドパミンの持続的な増加は、発生の重要な時期におけるステロイドホルモンの機能の変化により引き起こされる可能性がある。コプラナーPCBの同族体は、AhRに結合する能力に加えて、エストロゲンのヒドロキシエストロゲンおよびカテコールエストロゲンへの代謝を増強する(Gierthy et al., 1988)か、あるいはERの機能を抑制するかのいずれかによりエストロゲン作用も変化させる(Safe et al., 1991)。

PCBsなどの神経伝達物質濃度を変化させる化学物質が、神経内分泌系の機能、さらには生殖系にまで影響を及ぼす可能性があるにもかかわらず、この潜在的な内分泌かく乱作用の重要なメカニズムについてはごく少数の報告しかない。アラクロール1254に暴露したAtlantic croaker (ニベ科の魚)の生殖障害は、LH分泌の減少、およびLH分泌を刺激する神経伝達物質である視床下部におけるセロトニン(5-HT)濃度の低下に関連している(Khan and Thomas, 1998)。その後の研究では、5-HT濃度の低下はこの5-HT合成の律速酵素として働くトリプトファン水酸化酵素が阻害されるためであることが示された(Khan and Thomas, 2001)。PCB暴露後に5-HT活性が低下すると、視床下部の黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRH)濃度およびその分泌が減少し、その結果、性腺刺激ホルモン分泌細胞のLHRH受容体の機能低下、およびLHRH刺激に対するLHの応答が減少する(Kahn and Thomas, 2000)。さらに、トリプトファン水酸化酵素に対する特異的阻害剤であるパラ塩化フェニールアナリンは、PCB混合物が生殖障害とともに神経内分泌系に及ぼす影響とよく似た作用を示した。しかし、5-ヒドロキシトリプトファンをPCBと共に投与した魚ではこの生合成の段階を迂回し、PCBの影響を打ち消す結果となった(Khan and Thomas, 2001)。さらに神経伝達物質の機能の変化に関連した神経内分泌系のかく乱が、鉛を暴露したCroakerについて報告されている(Thomas and Khan, 1997)。

成熟した神経系とは対照的に、発生期における化学物質への暴露による差異は、現在の状況においては毒性学および神経生物学的意味で特に重要である。結果の性質や有害性は、化学物質に暴露される時期に依存すると考えられる。性ステロイドや甲状腺ホルモンなどのいくつかのホルモンは脳の発達において、時間と厳密に相関した制御に影響を及ぼすことが知られている(Gray and

Ostby, 1998)。神経生物学の視点から、一般に発生時期、特に脳の発達期における制御因子のかく乱は重要である。なぜなら、後になって現れる長期持続的あるいは非可逆的な神経行動上の変化は、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、a) 小脳の神経増殖速度を増加させる、b) 神経の増殖・分化のタイミングをとる、c) 脳内の特定領域への神経移動パターンを制御する(Porterfield, 1994)、ことにより脳の発達に影響を与えることがわかっている。ヒトにおけるヨード欠乏症、先天性甲状腺機能低下症、あるいは母親の甲状腺機能低下症によって引き起こされた地方病性クレチン症は、精神遅滞、嚙唾、言語障害あるいは運動障害などの一般に知られている神経行動障害をともなう(Porterfield, 1994)。しかし、甲状腺機能障害の程度は明らかに重大である。

成体において、生殖腺ホルモンが生殖行動や非生殖性の神経行動の変化に関連した影響を受けることが示されるか、あるいは化学物質への暴露による性的二型の非生殖性の行動変化が内分泌に起因するものでないと示された場合には、生殖系の内分泌かく乱作用が神経行動の変化の原因である可能性が考えられる。ホルモン受容体を発現した神経、およびグリア細胞に対する直接的な毒性影響も考慮しなければならない。ホルモン濃度の変化は、ホルモン産生器官への細胞毒性の影響による可能性があり、その結果ホルモン合成や分泌が妨げられる。例えば、PCBの暴露は甲状腺の微細構造の損傷、あるいはサイログロブリンのタンパク分解を阻害し、それによってT₄の分泌が減少する(Collins and Capen, 1980)。さらに、PCB暴露によって甲状腺ホルモンの代謝が亢進すること(Barter and Klaassen, 1992)、および血清中の輸送タンパクのT₄結合部位が遮断されることにより、甲状腺ホルモン濃度に影響が現れ、血清からの排除、組織への作用能力の低下が起こる。

ある神経行動の機能に対しどのような内分泌かく乱作用が基となって引き出されるメカニズムかという問題は、結局は細胞より微細なレベルにおける調節機能に関して何が解明されているかに依存している。しかし、より高度な神経機能を構築する基盤となる事象は、検証された多くの評価項目をもっても解明するには至らない。次に述べる2例は、化学物質に誘導される神経内分泌系および神経行動系の影響に対して可能性が考えられるメカニズムを解くために試みられた実験研究である。しかし、これらの研究はメカニズム解明への第一歩にすぎない。

3.14.2 神経系における性分化

一般にげっ歯類の脳における性分化は、アンドロゲンをエストロゲンに転換する酵素、アロマターゼ(CYP19)の作用に依存すると考えられている。アロマターゼは検証された限りの全ての哺乳類の脳で検出されている(Lephart, 1996)が、げっ歯類以外の種での性分化における役割については未だ解明されていない。アロマターゼは、HPOA、分界条、扁桃体、および線条体など脳の複数の領域で発現している。その調節機構は、アンドロゲン依存性や最大活性を示す発生段階などに関連し

て脳の異なる領域によって違いがあるようである(Lephart, 1996; Lauber et al., 1997a, 1997b; Küppers and Beyer, 1998; Roselli et al., 1998)。複数の性的二型神経核が存在するHPOAでは、妊娠の終期に鋭いピークをもつ活性がみられるが、これは出生後最初の5日以内に標準値に下がる(Lephart, 1996)。

母乳で検出されたPCB同族体の型に応じて調整した、オルト位塩素置換型、およびコプラナー同族体を含んだPCBs混合物を母ラットに暴露すると、出生時の雄仔ラットでアロマターゼ活性が低下し、同時に甘み嗜好の上昇、および成体になった次世代の雄ラットでの精巣重量とテストステロン濃度の減少が認められた(Hany et al., 1999)。雌ラットでは甘み嗜好性が雄と比べてより強く現れるため、視床下部のE₂の減少が脳における雌性化を促進して、さらに成体になると雌性化行動が引き起こされることを示唆している。

3.15 免疫系におけるEDC関連の作用機序

免疫系の主要な機能は、感染性因子や腫瘍細胞に対するの防御をおこなうことである。様々な細胞型およびその液性伝達物質は、共に厳密に調整をとりながら免疫系の機能を司っている。恒常性の維持には神経内分泌系と免疫系の間での双方向の情報伝達が必要である。免疫系に対して脳の影響は、その大部分が神経内分泌系から分泌されたホルモンによって及ぼされている。実際に、ホルモンの受容体は免疫系の細胞上で検出されているが、一方でサイトカインの受容体は内分泌腺および脳に存在している。この神経調節経路の役割はほとんどわかっていないが、ほぼ全てのリンパ組織に神経が分布していることにも注目すべきであろう(reviewed by Heijnen et al., 1991; Weigent and Blalock, 1995; Besedovsky and Del Rey, 1996; Johnson et al., 1997)。

HPA軸は、中枢神経系と免疫系間の伝達の主要な伝達経路である。脳下垂体からのACTHの誘導により副腎でグルココルチコイドホルモン(ヒトではコルチゾール)が合成されると、免疫反応が抑制される。別のメカニズムでは、オピオイドペプチドなどの神経ペプチドの直接的な作用を介して免疫細胞に対する刺激あるいは抑制を行っている(Van den Berg et al., 1991)。これらの伝達のために、免疫系の細胞は、CRH、ACTH、PRL、β-エンドルフィン、GH、性ステロイドなどの多くのホルモン、神経ペプチドおよび神経伝達物質の受容体をもつ。さらに、免疫系の細胞は、炎症性サイトカイン、特に腫瘍壊死因子-α、IL-1、IL-6などを産生しており、これらは免疫系の内分泌ホルモンとしての役割をもち、離れた場所で生成されてHPA軸やそれに同調する系の中心的な機構に働きかけている。

HPA軸の最終的なエフェクターであるコルチゾールは、複数の重要な免疫抑制作用をもつ。組織学的には、胸腺がこのホルモンの影響を受ける最初の器官である。コルチゾールは、白血球の産生、輸送、機能に影響を及ぼすが、これは、しばしばリンパ球減少症や単球減少症を引き起こすことがある。さらに、コルチゾールは単球の走化性、殺菌活性、Tリンパ球の増殖を抑制する働きをもつ。

またグルココルチコイドは、多くのサイトカイン産生を抑制する。そして、免疫細胞やその他の細胞表面上の接着分子とその受容体の発現を抑制して、サイトカイン、主にIL-6によって誘導された急性の反応を増進する。

PRLは免疫系の様々な要素を調節することが示されている。低プロラクチン血症は、リンパ細胞増殖の不全、Tリンパ球から産生されるマクロファージ活性化因子の減少と関連がある。内因性オピオイドペプチドである α -エンドルフィン、 β -エンドルフィン、 γ -エンケファリンなども脳下垂体で産生される。脳内のエンドルフィン受容体と類似したものが、脾臓細胞やおそらくいくつかの型の白血球に存在している。 β -エンドルフィンはT細胞増殖およびIL-2産生を亢進することが示されている。神経内分泌系の制御下にある胸腺の生体活性の1つは、胸腺ホルモンの分泌である(Savino and Arzt, 1999)。胸腺上皮細胞で産生されるノナペプチド、チミュリンはGHとPRLによって調節されている。脳下垂体と胸腺の間の相互作用は、抗成長ホルモン血清を注射したマウスに生じた胸腺依存性の免疫不全によって実証される。

免疫反応を変化させる作用は、性ステロイドにおいても報告されている。雄と雌の性ホルモン、 E_2 およびテストステロンのバランスは、免疫反応性にまで影響を及ぼしている。一般に、男性ホルモンのテストステロンは免疫活性作用をもつ。 E_2 や、DESなどの合成非ステロイド性エストロゲン様化合物は特定の免疫系に対する有力な抑制因子である。このような影響は、げっ歯類において、胸腺萎縮、胸腺依存性細胞免疫応答の抑制、自己免疫疾患の亢進、ナチュラルキラー細胞活性の抑制、髄鞘への毒性および単核食細胞系の活性化などで観察された(Luster et al., 1984)。妊娠期におけるリンパ組織では著しい変化がみられ、妊娠中の血清 E_2 濃度の増加がリンパ球減少症や細胞免疫の抑制に関わっている(Clarke, 1984)。ステロイドおよび非ステロイド化合物のエストロゲン活性の度合いを評価することによって、Lusterらは(1984)免疫毒性がエストロゲン活性と大部分関係していることを証明した。

ヒトでは、神経内分泌系および免疫系はともに出生時には未完成であり、後の成長段階で発達し完成する。免疫系は、コルチゾール応答を生じる能力が減少している新生児においてはグルココルチコイドによる制御に対する感受性が高い。すなわち、感受性の高い発育時期に、免疫系におけるグルココルチコイドの重要な調節効果を保存するという免疫系の適応反応を表していることが示唆される(Kavelaars et al., 1996)。このことは、個体発生の間に神経内分泌系がEDCsに対しても非常に高い感受性をもつ可能性があることを暗示している。免疫系に関していえば、TCDD(Vos and Moore, 1974)、ヘキサクロロベンゼン(Michielsen et al., 1999)などの様々な化合物を用いた動物実験で示されるように、出生前後の期間が最も有毒物質の影響を受けやすいことは明白である。

これらの考察から、発達途中および発達後の免疫系の機能に影響を及ぼす複数の内分泌伝達経路が存在し、それがEDCsの標的である可能性が示される。

3.16 内分泌かく乱現象の根拠

前述の例は、重要なかく乱や有害健康影響発現の多様性を説明するために、実験室レベルでEDCsの作用機序の特徴が解明された事例である。これらの例で示され、また本書の別章の内容を考慮する上で有効な因果関係を定義するための原則をいくつか以下に示す。

- (1) 健全な生物で内分泌影響に感受性がある組織への応答を分離して検知できること。
- (2) 表現型の発現から生理学、細胞生物学および最終的には分子生物学まで、生物組織の多段階における応答を解析すること。
- (3) 毒性影響が明白な実験条件下でのホルモン作用(遺伝子発現や遺伝子発現の抑制を含む)の変化、ホルモン分泌、ホルモン代謝あるいはホルモン相互作用を直接計測すること。
- (4) 内分泌系のかく乱を示す用量-反応の観察結果が生体の重大な反応であり、一般的な全身毒性の二次的影響ではないこと。
- (5) 既知の薬理学的操作での暴露から生じる表現型と比較できること。
- (6) 特定の内分泌系の調節障害が有害な健康影響を与えていることが分かっている発育段階での感受性の差異を示すこと。
- (7) 健全な生物の内分泌系において、推定作用機序に相反する薬理学的操作によって、表現型あるいは毒性影響を回復できること。
- (8) *in vitro*での結合、転写活性化、あるいは細胞応答の研究から得られる内分泌作用に対する支持データ。

もちろん、内分泌系の正常な機能の変化により化学物質への暴露が健康に有害な影響を与えたと判定するために、あるひとつの状況でこれらの全ての要素がある必要はない。しかし、暴露が「内分泌かく乱をもたらす」条件を分類するためには、まとまった根拠のあるアプローチが必要である。本評価の第7章では、特定の結果を特定の暴露に結びつけるために推定される基本的メカニズムに特に重点をおき、ヒトおよび野生生物両者の自然個体群にまで拡張し、原因と結果の評価を行っている。