

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 $\alpha$ -レダクターゼ活性の阻害よりも精巣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)は胎児の精巣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巣を標的とすることが示されている(Gray and Butterworth, 1980; Sjoberg et al., 1985)。精巣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、精巣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E<sub>2</sub>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Gal<sub>4</sub>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E<sub>2</sub>が示す活性を100%として比較すると、10 $\mu$ 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、腔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腔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(Emm 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F<sub>0</sub>と比較してF<sub>1</sub>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F<sub>1</sub>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、F<sub>0</sub>とF<sub>1</sub>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、精巣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F<sub>1</sub>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の奇形についての第一標的が精巣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、精巢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、胎仔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、ライディッシュ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の毒性に対して特定のARが思春期雄ラットの精巢毒性に対する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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -ノックアウトマウスがDEHP処理後に精巢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、F<sub>0</sub>でなくF<sub>1</sub>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EDC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)。

低酸素ストレスに反応して、ARNTタンパク質はHIF-1 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ のヘテロ二量体が低酸素に反応することに加えて、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、前立腺および精囊重量の一時的な減少がみられ、また精巢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、あるいは精巣(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0.20 µg TCDD/kgで27%、0.80 µg 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1 µg/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E<sub>2</sub>濃度および卵巣でのE<sub>2</sub>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F<sub>1</sub>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F<sub>1</sub>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F<sub>1</sub>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、出生数、出生数、出生数の減少がみられた。F<sub>2</sub>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F<sub>1</sub>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、F<sub>1</sub>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(F<sub>1</sub>とF<sub>2</sub>)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、鶉、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い、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当てられた(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)。

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HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>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Fischer 344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、平衡状態でアトラジンはラット子宮のERへの結合に対してE<sub>2</sub>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°Cでプ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300 mg/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。E<sub>2</sub> (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、E<sub>2</sub>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E<sub>2</sub>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E<sub>2</sub>誘導ルシフェラーゼ活性に対しての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、300 mg/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(150 mg/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E<sub>2</sub>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(Fischer 344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歳足らずで降下し始めるが、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、また腔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12.5 mg/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、50 mg/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ーパミン合成、およびドーパミン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<sub>2a</sub>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受けるため、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的な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に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、前頭葉皮質のドーパミン濃度、および黒質のドー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ー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、脳内ドーパミンの減少は、A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ー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、脳内ドー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)濃度の低下に関係している(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、嚔吐、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まなう(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T<sub>4</sub>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T<sub>4</sub>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E<sub>2</sub>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 $\alpha$ -エンドルフィン、 $\beta$ -エンドルフィン、 $\gamma$ -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。 $\beta$ -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。