

- 48 菅原和信, 豊口禎子(1998), 授乳と薬剤, 薬局:49(9)37-42.
- 49 黒島淳子(1998), 妊婦・授乳婦と漢方薬, 薬局:49(9)45-48.
- 50 荒木博陽, 五味田裕(1998), 妊婦・授乳婦への医薬品情報提供と服薬指導, 薬局 49(9)49-54.
- 51 U.S.Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research(1999), Improving Public Health Through Human Drugs, Report to the Nation.
- 52 National Environmental Policy Act; Revision of Policies and Procedures; Final Rule (1997),Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration.
- 53 National Environmental Policy Act(1986), Council on Environmental Quality Executive Office of the President, 40CFR Parts 1500-1508.
- 54 Zurrer PS (2000), Drugs down the Drain, C&EN51-53.
- 55 Huang C-H, Sedlak D.L.(2000), Analysis of Estrogenic Hormones in Wastewater and Surface Water Using Elisa and GC/MS/MS, Division of Environmental Chemistry Preprints of Extended Abstracts:40(1)74-166.
- 56 オーストラリア医薬品評価委員会 (先天異常部会による評価基準)、妊娠中の投薬とそのリスク
- 57 医薬品・治療研究会(2000), 正しい治療と薬の情報, The Informed Prescriber:15(7,8)
- 58 Daughton C.G., Ternes T.A.(1999), Pharmaceuticals and Personal Care Products In the Environment : Agents of Subtle Change?, Environmental Health Perspectives 107(sup6)907-937.
- 59 Blackburn E(2000), Children's Environmental Health Protection, Risk Excellence Notes:2(7)1-12.
- 60 Friede A, O'Carroll P.W.(1996), CDC and ATSDR Electronic Information Resources

- for Health Officers, *Journal of Public Health Management and Practice*(2)10-24.
- 61 VICH GL6(2000), Environmental Impact Assessment (EIAs) for Veterinary Medicinal Products (VMPs)-Phase I.
- 62 NJ Ayscough, J Fawell, G Franklin and W Young, Review of Pharmaceuticals in the Environment, R&D Technical Report p.390.
- 63 DETR(1999), Government Interdepartmental Group on Endocrine Disrupters Report of activities Between November 1995 and May 1999.
- 64 A.Dawson(1998), Natural and anthropogenic environmental oestrogens : the scientific basis for risk assessment. Comparative reproductive physiology of non-mammalian species, *Pure&Appl.Chem.*,70(9)1657-1669.
- 65 A.Dawson(2000), Mechanisms of Endocrine Disruption with Particular Reference to Occurrence in Avian Wildlife : A Review, *Ecotoxicology.*,9,59-69.
- 66 Center for Ecology&Hydrology(1999-2000), Annual Report.
- 67 Formerly the Institutes of Hydrology, Terrestrial Ecology, Freshwater Ecology, and virology & Environmental microbiology, Centre for Ecology & Hydrology.
- 68 DH(1999), 1999 Annual Report of the Committees on Toxicity , Mutagenicity, Carcinogenicity, of Chemical in Food, Consumer Products, and the Environment.
- 69 DH(1999), 1998 Annual Report of the Committees on Toxicity , Mutagenicity, Carcinogenicity, of Chemical in Food, Consumer Products, and the Environment.
- 70 Institute for Environment and Health(1995), Environmental Oestrogens: Consequences to Human Health and Wildlife, Assessment A1.
- 71 P.T.C.Harrison, P.Homes, C.D.N.Humfrey(1997), Reproductive health in humans and wildlife : are adverse trends associated with environmental chemical exposure? *The Science of the Total Environment* 205,97-106.
- 72 M.R.Taylor and P.T.C.Harrison(1999), Ecological Effects of Endocrine Disruption :

Current Evidence and Research Priorities. *Chemosphere*, 39(8)1237-1248.

- 73 R.E.Hester and R.M.Harrison(1999), Endocrine Disrupting Chemicals, Issues in Environmental Science and Technology, 12.
- 74 Assessment A4, IEH assessment The Ecological Significance of Endocrine Disruption, Institute for Environment and Health.
- 75 B.Halling-Sorensen(2000), Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive Farming, *Chemosphere* 40, 731-739.
- 76 L.Migliore, S.Cozzolino, M.Fiori(2000), Phytotoxicity to and uptake of flumequine used in intensive aquaculture on the aquatic weed, *Lythrum salicaria* L, *Chemosphere*:40,741-750.
- 77 A.J.Baguer, J.Jensen, P.H.Krogh(2000), Effects of the antibiotics oxytetracycline and tylosin on soil fauna, *Chemosphere*:40,751-757.
- 78 M-L.Loke, F.Ingerslev, B.H-Sorensen, J.Tjornelund(2000), Stability of Tylosin A in Manure containing test systems determined by high performance liquid chromatography, *Chemosphere*:40,759-765.
- 79 K.Kummerer, A.Al-Ahmad, B.Bertram, M.Wiebler(2000), Biodegradability of antineoplastic compounds in screening test : influence of glucosidation and of stereochemistry, *Chemosphere*:40,767-773.
- 80 A.B.A.Boxall, D.Oakes, P.Ripley, C.D.Watts(2000), The application of predictive Models in the environmental risk assessment of ECONOR, *Chemosphere*:40,775-781.
- 81 F.S-Lauridsen, M.Birkved, L.P.Hansen, H.C.Holten Lutzhoft, B.Halling-Sorensen, (2000), Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in Denmark after normal therapeutic use, *Chemosphere*:40,783-793.

付録 3-A 翻訳

本訳は抄訳であり体裁は必ずしも統一してない

## **Hormonally Active Agents in the Environment**

Committee on Hormonally Active Agents in the Environment

Board on Environmental Studies and Toxicology

Commission on Life Sciences

National Research Council

National Academy Press

Washington, D.C.

環境におけるホルモン活性化学物質

訳/要約

浜田知久馬

有菌幸司

田辺信介

江馬 眞

武田量雄

手島玲子

松木容彦

吉岡義正

松井三郎

# Hormonally Active Agents in the Environment

## 環境におけるホルモン活性化学物質

### 目 次

	頁
1. 序	1
2. ホルモン様作用物質	4
4. 薬量学	20
5. 生殖と発生への影響	24
6. 神経学的影響	37
7. 免疫影響	47
9. ヒトでのホルモン活性物質と発癌性	52
10. エコシステム	67
11. 環境ホルモン様活性化学物質のスクリーニング及びモニタリング法	75

## 1章 序

ホルモン様活性物質(Hormonally Active Agents:HAA)は、人間や野生動物に有害な影響を与える可能性がある。この問題について検討するため、NRC(National Research Council)は学際的な専門家による委員会 the Committee on Hormonally Active Agents in the environments を設立した。この委員会の役割は

- ・ 環境におけるホルモン関連化学物質に関する文献を批判的にレビューする。
- ・ 既知あるいは疑わしき毒性のメカニズムと、魚、野生動物、人間に対する影響を評価する
- ・ 不確実性、知識の限界、利用可能な証拠の問題点を評価する。
- ・ 観測された事象を評価するための科学的な概念の枠組み作り
- ・ 推奨すべき研究方法、モニタリング方法、研究の優先順位について検討する。

である。

この委員会のアプローチは3段階のステップより成り立つ。

- (1) ホルモン様の活性を持つ、環境中の化学物質を特定する。
- (2) これらの化学物質の影響について、実験動物、人間、野生動物を使って検討した、科学的な文献を評価する。
- (3) 観測された影響が、これらの化学物質のホルモン様作用が原因であるか考察する。

委員会は責任を果たすために、事実を単純に編集するのではなく、文献をレビューする必要があった。委員会は次のような手順で評価を行った。

- (1) 仮説を解釈する。
- (2) 仮説を評価するのにどの情報源が適切であるか判断する。
- (3) 利用可能な情報源を特定する。
- (4) データまたは解釈が矛盾したときは、異なった判断材料に対して、違った重みを与えて検討する。
- (5) データによって観測された事実を説明できるように、代替の仮説を確立し評価する。
- (6) どのような間違いは許されて、どのような間違いが許されないか考察する。
- (7) 仮説とデータの検証によって意味ある結論と推奨に到達するための基準を確立する。
- (8) これら全ての点についてコンセンサスを得る。

しかしながら、委員会は次の点についてはコンセンサスを得ていない。

- (1) 内分泌攪乱仮説を特定するための方法
- (2) 性ホルモン以外をどれだけ重要視するか。
- (3) 利用可能な情報源
- (4) 第一種と第二種の過誤を含めて、得られた結果をどのように評価すべきか
- (5) HAA をどう定義するか?
- (6) 低用量での効果と用量反応曲線の重要性

- (7) 感受性の時間に対する変化をどう扱うか
- (8) ある動物種から得られた情報を他の動物種にどう外挿するか
- (9) 用量, 濃度, 曝露の定義と定量化

#### ・内分泌攪乱物質仮説

最も単純化すれば、仮説は、「環境中のある種の化学物質は、エストロゲンや他の性ホルモンの作用をまねて、内分泌システムを、有害な作用を伴って攪乱する」となる。ただし攪乱という用語は、主観的であり、異なった解釈を与える可能性がある、また有害な作用を客観的に判断するのも困難である。そこで委員会では、内分泌攪乱物質という用語の代わりに、ホルモン様活性物質という聞きなれない用語を用いることにした。しかし、ホルモン様活性の調整が、様々なメカニズムを通して起こり得るので、依然あいまいさは残っている。

#### ・利用可能な情報源

委員会のメンバーはこの分野の研究活動に従事しているため、公表されていない結果や文献を入手することが可能であったが、これらの情報源は独立な peer review を受けてないので評価には含めなかった。またインターネット上の情報、政府機関の報告書、企業からの報告も同様の理由で含めなかった。

#### ・結果の評価

委員会における内分泌攪乱物質仮説を評価するにあたり最大の問題は、結果が複数の研究で食い違ったとき、信頼がおけるのか、陰性の結果をどう考慮すべきかという点であった。委員のうちの何人かは実験的証拠とメカニズムに重点を置いたし、他の委員は研究間の結果の一致性と、類似化合物における結果を重視した。

#### ・HAA の定義

#### ・用量反応関係

HAA 曝露の影響を評価するためには、HAA について用量反応曲線の形状を知ることが重要である。委員の間では、逆 U 字型の用量反応曲線の可能性について見解が分かれた。通常の毒性試験では、単調な用量反応関係と、ある用量より下では効果がない閾値が存在することを前提にして、試験がデザインされるが、HAA の場合、中間の用量では、活性がないが、その下の用量では活性が存在する、すなわち、単調な用量反応曲線が得られない場合がある。例えば、DES を出生前のマウスに投与すると、生まれてきた子供の前立腺重量は、逆 U 字型の用量反応曲線になる。高用量では、前立腺を小さくするが、低用量では増大する。更に低い用量では効果がみられない。

- ・感受性の時間に対する変化

出生前後の間、化学物質の曝露に対して、組織の感受性が特に高くなることが知られている。脊椎動物の分化の時間的経過に関する情報が増しているにもかかわらず、特定の HAA の作用のタイミングについての情報は十分ではない。

- ・種間の外挿

種間の結果の外挿についても委員の間で意見が分かれた。ある動物種で有害な効果が検出されれば、他の種でも疑ってみる必要があると考える人もいたし、それぞれの種ごとに有害作用との関連を確立する必要があると考える人もいた。HAA の環境における効果は、1つないし数種について観察された結果に基づいて確立されるので、外挿の問題は非常に重要である。用量反応関係について、種間で定量的に外挿するのは、不可能であるが、分類学上近い種間で、毒性について同様であると考えerことは賢明である。

- ・環境中の用量、濃度、曝露

環境中で生物が化学物質に曝露されたときの濃度によって、有害な作用が生じるかどうかに関心がある。この濃度は、通常の実験における用量よりかなり低い。委員会は、実験結果から、環境に対する作用を予測するにあたって、どのような情報が必要かについて、意見は一致しなかった。

- ・環境中の化学残余

環境中では、化学物質は常に混合物として存在する。これらの混合物を環境中から抽出して実験を行うことは、化学物質間の相互作用を調べる上で有用であるが、どの化学物質が関与しているか特定することはできない。また曝露から作用が出るまでには時間的なラグがある場合もある。

- ・環境化学

化学物質は、環境中で、有機物質と混在し、吸収や代謝に影響を受ける。環境中の化学条件は、曝露に利用可能な濃度に影響を与える。

- ・環境中の曝露経路

曝露は環境化学物質と生物との接触である。曝露量は、環境中の化学物質の濃度と接触時間の関数である。曝露には、ピーク曝露、平均曝露、最小曝露、瞬間曝露等が考えられるが、曝露の有無を主な関心として、曝露の方法の詳細は問題にしない。環境中の曝露の影響を調べるのが目的であれば、曝露経路について、実験デザインの段階で考慮しなければならない。



## 2章 ホルモン様作用物質

本報告書で使う単語、「ホルモン様作用物質 (hormonally active agents ; HAA)」は、メカニズムの如何によらず、ホルモンのように作用する物質を意味する。

エストロゲン作用を持つ物質は、環境ホルモン問題が指摘された当初から内分泌攪乱物質として懸念されており、最も多く研究されている HAA である。したがって、本委員会が評価する予定の物質の大半はエストロゲン作用を持つ物質となる。

ホルモン系に影響を与える、反エストロゲン、反アンドロゲン、aryl hydrocarbon (Ah) レセプター-agonist や、その他の有害物質も取り上げる。もちろん、これまで発表された文献は、様々なホルモン系 (甲状腺系) が HAA の対象と成りうることを示している。

このように、本章では、すでに発表されている文献を反映して、ゼノエストロゲンが強調されるが、これは、他の HAA が重要でないという意味ではない。

本章は、委員会で評価された合成 HAA を同定し、またファイトエストロゲンのように自然に発生する HAA についても考察する。自然発生の HAA における生物学的な影響は深く考察しないものの、これらの物質は環境で偏在し、HAA 曝露の背景レベルと混同されている可能性がある (第三章参照)。

委員会の責任目標の一つは、可能な限り HAA に関連する影響の作用メカニズムを特定することであった。したがって、本章では、エストロゲン作用を持つ化合物の作用メカニズム、たとえばリガンドがレセプターとどこで結合し、レセプターが mRNA の転写を変化させ、最終的にタンパク質合成の cytoplasmic translation を変えるといったメカニズムのモデルとして考察する。

HAA が、ホルモンに反応する遺伝子や遺伝子生成物の誘導など、従来のホルモンレセプターと結合して測定可能な反応を促進する能力を持つとすれば、それは、その HAA が、内分泌系に影響を与えるという決定的な証拠である。しかしながら、化学物質は、他の様々なメカニズムにより、通常ホルモンプロセス、ホルモン合成や、代謝、器官系の相互作用、あるいは hypothalamic-pituitary-gonadal-axis 反応など、を攪乱する可能性を持つ事も忘れてはならない。

### ホルモンレセプターで仲介される作用

生物が環境要因から影響を受けるということは、その要因と生物との間に物理的な相互作用がある、ということである。生理学システムのほとんどには、レセプター (Jensen and Jacobson 1960; Gorski et al. 1968) という検知器または感覚分子が関わっている。レセプターは様々な生物の標的細胞に普遍的に存在している (自然に存在しない場合もある) 特定のコントロール分子と作用する。中立、ホルモン、あるいは成長レセプターの多くは、生物の成長や生理学の様々な段階に関わっている。

エストロゲンレセプター (ER) は細胞中核に存在し、核転写誘発因子リガンドとして機能するステロイドおよび甲状腺ホルモンレセプターの superfamily のメンバーである。ステロイド・甲状腺ホルモンレセプターは、この superfamily の様々なメンバーに共通のある構造を含んでいる。図 2-1 は、ER リガンドが標的細胞内に移動し、中核内の ER と相互作用している様子をモデル化した図である。

ステロイド・ホルモン結合ドメインは、ER の C-転写ファクターとよばれる領域にあって、ホルモン作用により中核転写因子の活性化を誘導する役割を担っている。ステロイド・ホルモン・レセプターによって仲介される遺伝子発現の誘導は、複雑なプロセスである。すなわち、中核レセプター複合体の形成、ホルモンに反応する要素との結合、RNA polymerase II 転写-initiation 複合体と関連する他の転写ファクターや協働体との相互作用などが関わっている (Murdoch and Gorski 1991)。

転写を促進するプロセスは複雑で、標的遺伝子の 5'-プロモーター領域の基部および末端部のシーケンスと結合するタンパク質との相互作用が必要である。他にも、様々な協働体などいろいろな作用が、ステロイドホルモンによって誘導される遺伝子発現を調節する働きをする (Beato et al. 1995)。

ステロイドホルモンレセプターが中核に局在する事や、それらのリガンドが親脂性であることは、エストロゲン様物質や毒物が、標的細胞の基本的な遺伝子コントロールメカニズムへ簡単にアクセスできることも意味する。つまり、これらの遺伝子コントロール物質グループとそれらのレセプターは、生理学的メカニズムを攪乱する様々な環境的要因にさらされやすいシステムとなっている。

次のセクションでは、ER の性質や、その他のステロイド、またはステロイド様ホルモンレセプターを取り上げる。

### エストロゲンレセプター

エストロゲンレセプター (ER) の特徴は、広範囲にわたる化学物質に反応し、それらと共に、全く異なる構造物を形成する能力にある。その様々な構造が、様々な細胞または生理学的作用に影響する。たとえば、ER は様々なリガンドに作用するため、エストロゲン作用も反エストロゲン作用も起こす。

他の章でも取り上げられているように、有機化合物の多くは様々な生物学的変化をもたらすエストロゲン作用あるいは反エストロゲン作用を引き起こす (第五章から十章参照)。

ER と作用するリガンドの多様性から、構造と機能の関係を予測するのは困難である。

結合は非常に特異的で、stereoisomer を区別するのが可能である (Noteboom and Gorski 1965)。レセプターの結合性と占領性は、エストロゲンおよび反エストロゲン結合の量的な一面である。異なるリガンドレセプター複合体による量的な一面と構造は、以下で取り上げる。

## レセプターの結合性

ER と、エストロゲンおよび反エストロゲンの解離率の違いは、生物学的に重要である。estradiol と ER との結合は、平行定数が $-0.1nM$ である。なぜなら、結合のオン率が比較的速く、解離率またはオフ率が比較的遅いからである。0 度では、estradiol の解離率はほぼ 0 である。37 度では、解離率は上昇し、半減期は 2 時間程度になる。他のリガンドも解離率が異なる。estriol や estrone は、解離率が速く、半減期は数分間でしかない。人間やその他の動物のレセプターにおいて結合性の違いはあまりない。予想通り、種が異なってもレセプターの構造は似ていた。しかし注意すべき点は、リガンドと生物学的作用との関連性を決める要因はレセプターの半減期だけに留まらないということである。その他にもシステムの半減期も考慮しなければならない。これはリガンドの代謝と排泄の影響を受けている。

estriol のように迅速に解離するリガンドは、「弱いエストロゲン」と呼ばれている。大量に注入されると生物学的反応が大きくなる。しかし、ホルモンの注入直後に起こる反応だけしか観測されていない。細胞の分裂など、後に起こる他のエストロゲン反応は観測されていないのである。弱いエストロゲンが頻繁に注入されると、長期的な反応に変化が起こるのが確認されている。エストロゲン濃度がレセプターの大部分を占領するまでになると、弱いエストロゲンでは長期的な反応と短期的な反応が見られた。したがって、化合物の多くは、ER と継続して作用すると、たとえ結合の平衡の結合性が低くても生物学的な影響を示す。しかしこの場合、エストロゲンレセプターと結合するサイトの大半が占領されなければ影響は表面化しない。結合性が estradiol の百分の一の場合、百倍の濃度が必要になる。植物エストロゲンや環境エストロゲンは、estradiol と比較して結合性は百分の一から一千分の一である。estradiol のようなリガンドは弱いエストロゲンとされているが、身体から迅速に排出しないというわけではない。解離率と排出は、直接には関係はない。なぜなら、排出率は複数の代謝的な要因で決まるからである。たとえば、物質の排出はプラズマタンパク質キャリアの力学や、肝臓や腎臓の作用や、標的細胞自体でのエストロゲン化合物の代謝と関係がある。この意味で、レセプターとの結合性が低いエストロゲン化合物でも、体内で長い期間循環すると生物学的に危険である可能性がある。

レセプターと結合している場合、迅速に解離するエストロゲンを正確に測定するのは困難である。純粋な平衡状況下なら、結合性の正確な見積もりと、占領されたレセプターの正確な見積もりは可能である。しかし、レセプター結合の迅速アッセイは純粋な平衡を測定していない。たとえば、レセプターあるいはリガンドが木炭のような固形物と結合している場合、結合していないリガンドがレセプターから洗い落とされると、結合した物質は平衡状態ではなくなる。したがって、低結合性リガンド（つまり環境エストロゲンのほとんど）は、アッセイの最中にレセプターから解離する。

## レセプターの占領度

ラットの子宮細胞には 20,000、つまり 10nM の ER が存在する。Clark et al. (1972)は、生理学的状況下では、レセプターの半分までが占領されると発表した。Ruh et al. (1973)は、estradiol、estriol、あるいは estrone を含んだ媒体でインキュベートされた子宮で、占領された ER がそれぞれ異なることを実証し、特定のタンパク質の誘導と一致していたことを示した。MCF7 細胞はヒトの乳ガンセルラインから得たもので、エストロゲンによってコントロールされた増殖の cell-culture システムの代表として使われる。MCF7 細胞にはそれぞれ 50,000 の ER が存在する。増殖反応が最高になるのは 0.1nM estradiol で、大規模な反応は 1pM 程度の濃度でも起こる。この状況下の細胞培養では、各細胞につき 1000ER から 5000ER だけしか占領されないと予想していた。したがって、細胞内で区別が困難なレセプターが、生物学的に重要である可能性がある。

### リガンド・レセプター複合体の多様性

エストロゲンおよび反エストロゲンリガンドが ER の構造に違いをもたらすという証拠もある。estradiol が ER と結合すると、レセプターの表面は疎水性から親水性へと大きく変化する。この表面の変化は、4-hydroxytamoxifen が ER と結合した場合だと、変化の規模が大きく異なる。結合した ER がエストロゲン擬態と結合した場合、構造が異なるか決定付けるには、その他のエストロゲンおよび反エストロゲン化合物を研究するべきである。

### ER のサブタイプ

ER で仲介された転写活性は、細胞および遺伝子の関係だけに依存するのではなく、ER サブタイプにも依存する。

1996 年以前は、一つの ER (ER $\alpha$ ) に対するエストロゲン反応だけが知られていた。しかし、ER サブタイプ (ER $\beta$ ) の発見により、エストロゲンおよび反エストロゲン反応の組織およびリガンドに特異的な誘導の範囲が広がった。ER $\alpha$  と ER $\beta$  は共通のドメイン構造を持ち、リガンド結合の AF-2 および DNA 結合のドメインで相同が見られるが、N-ターミナル AF-1 ドメインでは相同が 25%以下になる。ER $\alpha$  と ER $\beta$  は様々な組織や細胞で重複発現や差異発現が見られるが、いずれのタンパク質も、ゲル mobility shift アッセイでエストロゲン反応要素 (ERE) と結合するホモダイマーまたはヘテロダイマーを容易に形成する。ER $\alpha$  と ER $\beta$  は、表 2-1 と表 2-2 にあるエストロゲンステロイドホルモンや、自然に起こるエストロゲン化合物や、合成エストロゲンを結合させる。最近のある報告書は、ER $\alpha$  と ER $\beta$  に対して、60 種のエストロゲン化合物の結合性について述べた。ER サブタイプとの結合で大きな違いを見せた化合物は少しだけだった。たとえば、ジェニスタインの ER $\beta$  に対する相対結合性は、ER $\alpha$  に対する相対結合性より 20 倍も高かった。しかし、ER $\alpha$  あるいは ER $\beta$  に依存する転写活性アッセイでは、ジェニスタインの作用はいずれの ER サブタイプに対しても同じだった。リガンドによって誘導された ER $\alpha$  および ER $\beta$  のエストロゲン・反エ

トロゲン作用の同定には、更なる研究が必要である。

#### その他のステロイドおよびステロイド様ホルモンレセプター

ステロイドとそれに関連したホルモンにおける中核レセプターには、アンドロゲンや、甲状腺ホルモンや、adrenal glucocorticoidのレセプターがあり、いずれもHAAの標的とされている。レセプターは、ERと共通する特徴が多い。リガンドと結合していないglucocorticoidレセプターに関しては、中核か細胞質かの議論がなされている。いずれの場合でも、glucocorticoidと結合している時は必ず中核である。アンドロゲンレセプターや、テストステロンそのものより、その代謝物である $5\alpha$ -dihydrotestosterone (DHT)との結合性の方が高い。DHTは、アンドロゲン標的組織の一部で形成されるが、全てで形成されるわけではない。したがって、生物全体におけるテストステロンの影響は組織ごとに異なり、テストステロンをDHTへ変える $5\alpha$ -reductase酵素が存在するかによる。このことから、他の化合物がアンドロゲンレセプターと反応できるかの能力は、化合物の性質や、テストステロンあるいはDHTのような性質を持つのか、リダクターゼの基質であるか、による。

甲状腺ホルモンレセプターは、oncogene Erb-aのprotooncogeneである。突然変異したoncogeneは、甲状腺ホルモンと結合しないが、constitutivelyに活性化される。甲状腺ホルモンレセプターと結合できる化合物の範囲を考慮する研究はERほど多くないが、そのような化合物が環境から発生している可能性も考慮しなければならない。

#### ホルモン様作用物質 環境エストロゲン

##### 合成エストロゲン化合物

1960年代から1970年代に行われた研究で、数種類の殺虫剤など合成化合物のエストロゲン作用が同定された。これにはo,p'-DDT (dichlorodiphenyl-trichloroethane)、Kepone、フェノール化合物、PCB混合物、PCB同族体など合成化合物が含まれる。PCB混合物にはプラナー/コプラナーPCBの全て（つまりオルトCl置換物のないPCB）と、非プラナーPCBの全て（オルト置換されたPCB）を含む。hydroxyl-PCB同族体は、ERと結合し、メスのネズミの子宮でエストロゲン反応を誘導するのが後に判明した。E-screenアッセイやその他のin vitroバイオアッセイの開発により、合成エストロゲンのリストには有機塩素化合物や、フェノール類や、フタレート類や、酸化防止剤なども含まれるようになった。表2-1は、様々なアッセイでエストロゲンの性質を持つとされた合成化合物の一部をまとめたも

のである。これらの化合物の構造は分子量や、置換基の構造や、配置などが大きく異なり、ERへ結合するリガンドの多様性を見せる(図2-2)。合成エストロゲンの相対有害性は非常に多様で、標的器官や細胞など、特異的なエンドポイントに発現する。bioavailabilityはpharmacokinetic不確定値や、他の細胞ファクター(ステロイドホルモン結合globulin transthyretin)への優先的な結合や、親脂性分子と作用するその他のタンパク質によって変化する。数種のゼノエストロゲンの相対エストロゲン有害性が、E-screen細胞増殖アッセイで同定され、結果は構造に依存していた。エストロゲン有機塩素殺虫剤の有害性は、estradiolより $10^6$ 倍(molar base)も低かった。それに対し、2',4',6'-trichloro-4-biphenylolおよびoctyphenolは、MCF7細胞増殖アッセイで、estradiolより $10^4$ 倍から $3 \times 10^4$ 倍高かった。血液との相互作用でbioavailabilityの変化も考慮するin vitroアッセイでは、一部の環境エストロゲンにおいては、in vivo有害性(効果的な投与量)が特に胎児の面でこれまでの見積もりと大幅に異なる可能性があることを示している。

HAAの一部はヒトの組織(脂肪、血清、人乳)や、食料から検出されていて、人間がこれらの化学物質と接触する可能性がある。たとえば、Brotonら(1995)は、プラスチックコーティングで縁取られたカンヅメ内の汁から、bisphenol-Aを検出している。また、bisphenol-Aは、歯科で使われる複合材やsealantからしみる事もわかった。

#### 天然エストロゲン化合物

様々なバイオアッセイにより、菌の代謝物など植物で発生する自然の発生物もエストロゲン作用を示すことが判明した。果物や野菜にフラボノイドが見つかり、様々な大豆製品からも高い濃度で見つかり、人間は毎日微量のフラボノイドを摂取し、摂取量が高いと胃ガンや、結腸ガンや、乳ガンなどの発生率が低くなるのが判明している。二つの報告書がフラボノイドの健康面での効力についてまとめている。フラボノイドは抗ガン作用に重要なER反応を多岐にわたって引き起こし、エストロゲンに依存する有害な反応の原因でもある可能性がある。しかし、フラボノイドはエストロゲン作用の他に様々な生物学的反応を誘導し、抗ガン作用を示す。複数の研究は、フラボノイドのエストロゲン作用を特徴付けした(表2-2)。化合物の一部はいくつかのアッセイで微妙にエストロゲンのように作用するのが判明している。coumestrolやequolなどのフラボノイドから得た化合物や、食料で見つかるenterolactoneやnordihydroguaiaretic酸(NDGA)などのリガンドや、zearaleneoneやzearalenolやzearalanolなどの菌類代謝物も、エストロゲン作用を示す。

上記の合成エストロゲンでも述べられているように、天然エストロゲンの有害性も大きく異なる。たとえば、E-screenアッセイでは、estradiolと比べてzearalenolの有害性は100倍低く、zearalenoneの有害性は100倍低く、coumestrolの有害性は10000倍も低かった。更に、phytoestrogenの相対有害性は、血清タンパク質への結合を経てin vitroで

変更できる。たとえば、成人男性からの血清の場合、MCF7細胞での equol とエストロゲンレセプターの吸収および結合は血清抜き媒体と比較して11倍も高く、これは血清抜きで行われたアッセイは equol のエストロゲン有害性を低く見積もってしまうことを意味する。

天然エストロゲンの食事による摂取と、食料によるエストロゲン等価全体への相対的貢献度について、これまで議論されてきた。天然およびゼノエストロゲンの人間への曝露におけるマスバランスについては、更に研究すべきである。エストロゲンフラボノイドは迅速に代謝されるが、これらの化合物は血清や尿から検出できる。

### エストロゲン化合物のバイオアッセイ

ゼノエストロゲンと自然に発生するエストロゲン化合物の潜在的エストロゲン作用を測定するアッセイシステムが、これまでに数種開発されている：細胞増殖、ER バインディング、estradiol に反応する遺伝子または遺伝子生成物の誘導、そして transient あるいは安定に transfect された細胞バイオアッセイシステムについて、以下でまとめる。第十一章で、これらのアッセイをより詳細に取り上げ、利点と欠点について考察する。

### レセプターバインディングアッセイ

様々な化学物質のエストロゲン様作用は、ER への初期結合に左右される。直接結合の研究を行うのは実用的でない。なぜなら、アッセイには、特異性が非常に高い radioligand が必要だからである。しかし競合結合アッセイは、ER 結合の測定に頻繁に利用されている。この種のアッセイは、結合性が事前に分かっている radiolabel 競合者と比較して、試験物質が ER の結合性がどの程度か調べるのに使われる。

ステロイドホルモンが、動物内でそれらに準じたレセプターと結合することは、ホルモンの一部が硫酸塩、glucuronides、そしてその他の酸化生成物へ変化することから複雑になる。更に、ステロイドホルモンは血清タンパク質など、血液内の構成物と作用する。血清タンパク質は HAA の移動や細胞による吸収を変化させられる。たとえば、Welshon et al. や Nagel et al. は、細胞増殖アッセイや競合結合アッセイを使い、血清が細胞の吸収作用に影響することを実証した。すなわち、coumestrol、ジェニスタイン、ビスフェノール、オクチフェノールなどのエストロゲン化合物の吸収作用である。プラズマキャリヤータンパク質サイトやレセプターを巡る競合は、平衡競合プロセスである。プラズマタンパク質とその他の血液構成物や、プラズマや細胞レセプターとの平衡は、リガンドレセプターの量を決定付ける。リガンドレセプターは生物学的に作用的なレセプターの形態と思われる。

### 細胞増殖アッセイ

標的器官に対し細胞増殖を誘導させるというエストロゲンの能力は、エストロゲン作用の証明とされる。したがって、エストロゲン性を評価する信頼性の高いバイオアッセイは、エンドポイントとして細胞増殖を測定する。これは、エストロゲンで反応する標的器官か

ら得た確立したセルラインにある細胞分裂インデックスを *in vitro* で測定することでできる。たとえば、Soto と Sonnenschein は、E-screen アッセイを使って MCF7 細胞（ヒトの乳ガンセルライン）の増殖における様々なエストロゲン化合物の影響を調べた。

#### レセプターに依存する遺伝子発現アッセイ

*in vivo* および *in vitro* の研究は、エストロゲンによって誘導された遺伝子や遺伝子生成物をいくつか同定した。エストロゲン曝露のバイオマーカーとして使うためである：pS2、progesterone レセプター、vitellogenin A2、cathepsin D、protooncogene 数種、prolactin、変化増殖因子  $\alpha$  (TGF  $\alpha$ )、creatine kinase B、lactotransferrin、epidermal 増殖因子 (EGF) レセプター、calbindin D9k および D28k、heat-shock タンパク質 27、子宮 peroxidase 作用、インシュリン様増殖因子、結合タンパク質-4、lactate dehydrogenase、そして complement C3。これらの遺伝子または遺伝子生成物はそれぞれエストロゲン化合物によって誘導できるが、誘導反応は標的器官または細胞に特異的か、あるいは遺伝子生成物が他の HAA のクラスで誘導できる。たとえば、プロラクチン合成は表皮細胞増殖因子、thyrotropin 排出因子、そして phorbol エステルで誘導できる。別のエストロゲンで誘導可能なマーカーである ovalbumin の合成は、progesterone のような他のステロイドや、glucocorticoid によって励起される。EGF はネズミの子宮や膺の典型的なエストロゲン反応をいくつか誘導する。estradiol で誘導した遺伝子または遺伝子生成物の誘導は、エストロゲン化合物用のスクリーニングバイオアッセイとして使える。しかし、他のホルモンや化学物質による誘導の複合作用により、誤って陽性反応が出る危険性がある。

#### 再結合性レセプター・レポーター遺伝子アッセイ

再結合性レセプター・レポーター遺伝子構築物を使う *in vitro* バイオアッセイがいくつか開発され、エストロゲン化合物や混合物を検出および定量した。transient transfection アッセイは、レポーター遺伝子とリンクした estradiol に反応する遺伝子 (pS2 や vitellogenin A2 など) からの 5'-flanking 領域を含むプラスミドを頻繁に使う。セルラインの一部では、エストロゲン反応性にはヒト ER 発現プラスミドの cotransfection が必要で、ER レベルは cotransfect された ER の変動する量によって制御される。ヒトセルライン内の再結合性レセプター・レポーター遺伝子を使った結果は、感度が E-screen アッセイに匹敵することを示している。しかし、E-screen アッセイは試験化学物質の増殖作用を測定し、細胞増殖に必要な遺伝子全ての転写を必要とするが、*in vitro* アッセイはリガンド結合、または単一の遺伝子あるいは遺伝子生成物の誘導を測定することに注意すべきである。

#### エストロゲンレセプター-antagonist



エストロゲンレセプターantagonistは反エストロゲンとも呼ばれ、ER陽性のホルモンに反応する乳ガンの治療のための薬物として研究されてきた。反エストロゲンはERと結合する。しかし、ERのantagonistあるいはagonistとしてのその後の作用は、動物の種類や、標的器官あるいは細胞や、反応によって変わる。乳ガンの治療に使われる非ステロイド系反エストロゲンとして広く使われているTamoxifenは、ER agonistともER antagonistとも同定されている。Tamoxifenとその作用的代謝物4-hydroxytamoxifenは、ネズミで子宮の成長を促し、progesteroneレセプターを発現させ、MCF7細胞の増殖を誘導し、エストロゲンに反応するいくつかの遺伝子の発現を増加させる。それに対し、ステロイド系反エストロゲンICI 164,384とICI 182,780は、主に反エストロゲン作用を示す。

合成エストロゲンやbioフラボノイドの潜在的な反エストロゲン作用は、詳細に研究されていない。表2-3には、研究された化合物を上げている。

Makela et al.は、エストロゲンの coumestrol、ジェニスタイン、そして zearalenoneが、細胞培養アッセイで反エストロゲン作用を示さなかったと報告している。それに対し、Markaverich et al.は、luteolinおよび quercetinがラットの estradiol で誘導された子宮肥大を抑制し、MCF7細胞の estradiol で励起された増殖も抑制したと報告している。ER結合および in vitro レポーター遺伝子アッセイでは、quercetinはエストロゲンの作用を示さないが、luteolinは微妙にエストロゲンの作用を示す(つまり部分的に agonist 作用する)。Ruh et al.は、微妙にエストロゲンの作用を示す bio フラボノイドである naringenin は、estradiol によって誘導された子宮肥大や、過酸化酵素作用や、PR濃度、そして未成熟のメスのラットの [3H]thymidine 吸収を抑制し、エストロゲンに反応する pS2-Luc プラスミドで急激に transfect された MCF7細胞のルシフェラーゼ活性を抑制した。これらのデータは個別の bio フラボノイドから得たもので、大豆も反エストロゲンであるという報告を組み合わせると、食料は曝露によってエストロゲンにも反エストロゲンにも成りうることを示唆する。

hydroxy-PCB 同族体が、人の血清で確認されている。これらの化合物は MCF7細胞や、estradiol と反応し、安定して transfect された HeLa細胞で、ER agonist および antagonist 作用が研究された。人の血清内の七種の主な hydroxy-PCB は、ラット子宮 ER との競合的結合は最低限か検出不可能な程度で、MCF7細胞 ( $10^{-5}$ M から  $10^{-8}$ M) の増殖は誘導しなかった。hydroxy-PCB 同族体のエストロゲン作用は、二種のエストロゲン反応 in vitro バイオアッセイで更に研究された：一つでは、HeLa細胞は Gal4:セト ER chimera と 17mer-regulate されたルシフェラーゼレポーター遺伝子で安定して transfect され、もう一つでは MCF7 が estradiol 反応する vitellogenin A2 プロモーターと chloramphenicol acetyl transferase (CAT) レポーター遺伝子を含んだプラスミドで急激に transfect された。どの hydroxy-PCB ( $10^{-5}$  から  $10^{-8}$ M) も安定して transfect された HeLa細胞や MCF7細胞の CAT 作用でルシフェラーゼ作用を誘導しなかった。hydroxy-PCB の反エストロゲン効果が、細胞を estradiol と hydroxy-PCB で処理された細胞を使った同じバイオアッセイで研究された。hydroxy-PCB の全てが一つかそれ以上のエストロゲン反応を示した。同族体の一つで

ある 2,2',3,4',5,5',6-heptachloro-4-biphenylol は、estradiol で誘導された細胞増殖や、CAT 作用 (MCF7 細胞) そしてルシフェラーゼ作用 (HeLa 細胞) を抑制した。ペンタクロロフェノールも estradiol で誘導されたマス ER や vitellogenin mRNA レベルをマスの hepatocytes で抑制し、ER と競合的に結合する。その他のゼノエストロゲンのエストロゲンおよび反エストロゲン作用も、複数のエンドポイントの面から研究し、標的器官や細胞の面からも研究されるべきである。なぜなら、エストロゲンや反エストロゲン反応は非常に特異的である可能性があるからである。

### 環境反エストロゲン

Kelce et al. は、p,p'-DDE (1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene) がアンドロゲンレセプターと競合的に結合すると報告した。しかし、妊娠したラット (gestation 14 日目から 18 日) の子宮に 100 mg/kg/d 曝露させると、乳首閉合が見られた。これは反エストロゲン効果である。25-d-ol のオスのラットに曝露させると (57 日目まで 100 mg/kg/d)、思春期の始まりが遅れ、睾丸の影響を制御するためテストステロンを投与された去勢したラットでは、p,p'-DDE を 200 mg/kg/d を四日間曝露させると精囊と前立腺の重さが減った。どの反応も反エストロゲン活性と一致しており、再結合想定アンドロゲンレセプターとアンドロゲン反応するプロモーター・レポーター構成物を使った細胞培養研究によって、結果が再確認された。反アンドロゲンやエストロゲンはオスのネズミに対し悪影響を及ぼすこともあるため、オスの生殖問題におけるゼノエストロゲンの理論上の影響には「ゼノ反アンドロゲン」も含むべきである。他の持続性の高い有機塩素化合物も反アンドロゲンである可能性もあり、研究すべきである。p,p'-DDE が反アンドロゲンとして同定されたのも重要である。なぜなら、この物質は魚介類や、野生動物や、ヒトの組織において持続性の高い主要有機塩素汚染物質だからである。DDT が殺虫剤として使われ続けている地域では、p,p'-DDE 濃度がヒトや野生動物で非常に高くなることがある。

dicarboximide fungicide である vinclozolin 代謝物も、反アンドロゲン特質を持つこともある。テストステロンのより有害なアンドロゲンへの変化 ( $5\alpha$ -reductase を経て) を抑制する vinclozolin の能力や、アンドロゲンレセプターへ結合する vinclozolin の能力を同定するための in vitro アッセイは、vinclozolin も、その分解生成物 (2-[[[(3,5-dichlorophenyl)-carbamoyl]oxy]-2-methyl-3-butenoic 酸と 3',5'-dichloro-2-hydroxy-2-methylbut-3-enanilide) も、 $5\alpha$ -reductase 作用を抑制しないことを示した。vinclozolin は、アンドロゲンと比べて、アンドロゲンレセプターとの結合に対する競合力は弱いものの、その代謝物は効果的なアンドロゲンレセプター-antagonist である。

### Ah レセプター-agonist

2,3,7,8-TCDD や、関連したハロゲン化芳香族炭化水素 (HAH) は、HAA と同定された産業および燃焼副産物である。HAH は Ah レセプター-信号経路を経る。実験動物においては生

学および毒性反応は様々で、年齢、菌株、性別、そして実験動物種によって異なる。子宮に TCDD を曝露すると、その子はメスでもオスでも悪影響が見られる。オスで見られる反応の多くは反アンドロゲンとエストロゲンで報告されているものと似ている。たとえば、胚の段階で TCDD に曝露されたオスのラットは、生殖能力の低下や、アンドロゲンステータスの減少や、性的挙動でメス化が見られた。胎児の段階で大量の HAH を曝露した人間の子供に対する懸念もある。TCDD とその関連 HAH のリスクアセスでは、合成化合物からの曝露の他に、野菜やその他の植物生成物で見つかる indole-3-carbinol など、自然に起こる Ah レセプターagonist からも曝露を考慮しなければならない。

TCDD やその関連 Ah レセプターagonist は、ネズミの子宮やヒトの乳ガンセルラインに対し反エストロゲン作用を引き起こす。それらの標的組織では、TCDD はエストロゲンによって誘導される肥大を抑制し、ネズミの子宮や乳ガン細胞の増殖を抑制する。Ah レセプターagonist は、様々なエストロゲン誘導遺伝子や関連した作用を抑制する。反エストロゲン作用と関係のあるメカニズムには、Ah およびエストロゲンレセプター信号経路との間の crosstalk が関わっている。Bertazzi et al. は、イタリアのセベソで TCDD を曝露した女性の間では、乳ガンなどの発生率が減った。これは人間の間でも反アンドロゲン反応があったことを意味する。タバコの煙に含まれる PAH のような他の Ah レセプターagonist も、反エストロゲン作用を誘導するという報告もある。別の二つの研究も、喫煙者の中で endometrial ガンの発生率が低下することを報告している。

#### その他のホルモン有害物質

その他に数種の有害物質がホルモン擬態であるか、あるいは内分泌反応経路を攪乱する。hydroxy-PCB やその他の hydroxylate された有機塩素代謝物は、transthyretin と結合し、この化合物が甲状腺ホルモンレセプターagonist とされている。3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl で処理された妊娠中のマウスの研究では、胎児の transthyretin に 3,3',4,4'-tetrachloro-4-biphenyl が蓄積されていて、逆に胎児の血漿中の T4 濃度が減っていた。transthyretin と結合する hydroxy-PCB やその他の化合物による transplacental 影響も研究すべきである。

#### エストロゲン作用のメカニズム

ER はリガンドによって誘導された転写ファクターであり、ステロイド・甲状腺・レチノイド核受容体 superfamily の一員である。ER は、特定の遺伝子の時間的および組織選択的な発現を仲介する。これらの反応はリガンド構造、細胞および遺伝子プロモーター内容に依存している。ER 作用の一般的なメカニズムは、リガンドと結合した ER ホモダイマーと、完全あるいは不完全な palindromic 5'-promoter ERE motif との結合と、その後起こる基礎転写ファクター複合体との相互作用である。別の研究は、エストロゲン反応はより複雑で、ER 相互作用を他の中核ファクターと結びつけている。中核ファクターには協働体や、

p300/CBP など、ヒストン アセチレイションやクロマチン構造を影響するものが含まれる。ER は、他の DNA 結合した転写ファクターと相互作用することで遺伝子発現に変化を加えることができる。エストロゲンで仲介された転写作用は、ER がプロモーターDNA を結合させない ER-AP1 や ER-Sp1 相互作用で、見るのが可能である。ER 作用の複雑さが増していることは、ER やその他の核受容体 superfamily による遺伝子発現の差別的制御と一致している。

エストロゲンと結合していない時でも、ER は標的細胞の中核で見つかる。ER が中核内のどの物質と結合しているのかは不明だが、DNA の複雑な chromatin 構造か、タンパク質が有望である。真核細胞のクロマチンは整頓された形で配置され、中核内では明確な領域を持つ染色体がある。これは中核マトリックスというタンパク質のネットワークによるものと思われ、ER が中核マトリックスとの関わりがあるという報告もある。エストロゲンが有無に関係なく、ERE という特定の DNA シークエンスとの結合性がたかい。これらの 15~20 base ペアのシークエンスは、上流の適切なプロモーターシークエンスに結合された場合、エストロゲン反応をレポーター遺伝子に伝えることができる。これら全てが、遺伝子における共通のコントロール要素である強調型シークエンスの特徴を持つ。定量研究は、ER はリガンドの有無に関係なく、0.1nM 程度の ERE との結合性を持ち、これは estradiol や diethylstilbestrol (DES) における ER の結合性ほぼ同じである。したがって、ステロイドレセプターには結合性の高いリガンドサイトが二つあり、一つがステロイド用で、もう一つが DNA 用である。これは図 2-4 で表されていて、ER と、転写が始まったサイトの上流にある ERE が相互作用している。この図では、ER が ERE サイトで他のタンパク質と相互作用している。これはホモダイマーを収獲する別の ER ユニットか、ヘテロダイマーを生成する別のタンパク質である可能性がある。最後に、ER は別のタンパク質と相互作用しているのが見られる。このタンパク質は転写装置の一部か、少なくとも関連している。

反応要素ではシークエンスが異なる。ER は、単独のベースペア変化と、結合性の大幅な変化を区別できる。また、canonical vitellogenin gene ERE と大幅に異なる一部の DNA シークエンスを認識できる。

認識されているのは ERE の表面で、シークエンスが直接認識されているのではないのは明らかである。したがって、まだ認識されていない別の反応要素シークエンスの存在もあり得る。

占領されていないレセプターが細胞から抽出された時、heat-shock タンパク質を持つ大きな錯体となっている。heat-shock タンパク質は環境からの負荷に対する反応として生成されている。この部分は注目されていて、現段階では heat-shock タンパク質がレセプターの機能でどう働くのかは不明である。heat-shock タンパク質は、細胞質での合成後、レセプターの結合と中核への転移における付添人として機能する可能性がある。また、heat-shock タンパク質は、レセプターにステロイドが結合する前にレセプターが DNA へ結合してしまうのを防いでいる可能性もある。