

エストロゲンあるいは反エストロゲンが細胞内のレセプターと結合した後、レセプターリガンド複合体は中核へ強く結合し、抽出が困難になる。この複合体は、エストロゲンに対する生物学的反応と量的に一致していた。ER の特定の DNA シークエンスとの結合は、ER の作用の一部だが、エストロゲンによってコントロールされていないようである。ER がエストロゲン抜き enhancer 様反応要素と結合した場合、エストロゲンを曝露した細胞中核の ER への結合性は、タンパク質とタンパク質との相互作用の結果である。これらの相互作用の性質そのものは研究されていないが、エストロゲン化合物がどのように機能するかの解明で重要である。

polymerase II と関係のある転写ファクターと ER が相互作用することについての報告もある。polymerase II は mRNA を合成する RNA-transcribing 酵素である。また、転写ファクターと ER と相互作用する共同抑制タンパク質がエストロゲンに対する反応で重要だという報告もある。この分野は研究が成されている最中で、簡単なモデルでは表せないほどの数の相互作用例が報告されている。今後数年でこの分野の解明が進み、エストロゲンホルモンが転写をいかに活性化しているかを説明するモデルが完成すると思われる。

ER 相互作用する別のタンパク質のもう一つの側面に、自己相互作用がある。レセプターは高い濃度でホモダイマー、ヘテロダイマー、あるいは双方を形成するとして知られている。溶解可能なシステムでは、ER は、エストロゲン結合に協力的なホモダイマーを形成する。しかし、intact 細胞では協力的なエストロゲン結合や協力的なエストロゲン反応は見られない。このことから、ER がホモダイマーとして存在しているのかという疑問がわく。ER が別のタンパク質とペアになって ERE と結合するヘテロダイマーになるのかもしれない。レチノール酸レセプターのような別のステロイドレセプターは、ヘテロダイマーを形成する。これはホルモン擬態の問題と関連がある可能性もある。なぜなら、ヘテロダイマーパートナーは環境的要因から影響を受けるかも知れないからである。

中核タンパク質と ER 相互作用がこれらのレセプターの重要な機能であるなら、ER と相互作用するタンパク質の中核構成の多様性が、ER およびリガンドに対する細胞の反応で重要になる。更に、ER と結合している様々なリガンドが ER に対しそれぞれ異なる配置状態を示すなら、異なる ER・タンパク質複合体が起こる必要がある。なぜなら、細胞中核タンパク質の構成とエストロゲンリガンドに差があるからである。

エストロゲンの神経効果は、エストロゲンに対し上記より複雑な反応を示すことになるかも知れない。エストロゲンが、上記と同様の中核機能の変化により神経システムをコントロールするという報告がいくつかある。しかし、神経細胞におけるエストロゲン反応に関する文献では、中核遺伝子発現の変化による結果であった場合より迅速であるという報告もある。Naftolin は、エストロゲン投与からわずか 1 分後に発生した神経膜にある 17β -estradiol の影響について報告した。Tamoxifen は反応を阻んだが、 17α -estradiol は全く影響をもたらさなかった。Pappas et al. は、ER は細胞膜で微量に見つかりと報告している。微量の ER は免疫細胞化学で見落とされる可能性があり、現在では別

の ER 検出法が使用されている。

動物模型を使った研究は、エストロゲンやアンドロゲンが、細胞の死滅を抑制し、細胞増殖を誘導し (STEP1)、そしてその後細胞増殖を抑制することで (STEP2)、標的器官の epithelial 細胞数を制御すると示している。これらの影響は、実験模型では、性ホルモン濃度を操作することで分離できる。このことは、全く別々のメカニズムで制御されていることを示唆する。

細胞増殖の誘導におけるエストロゲンの役割に関して三つの仮説がある (STEP1) :

- ・直接陽性の仮説は、エストロゲン自体が標的器官の増殖の引き金となっていることを提案している。
- ・間接陽性の仮説は、エストロゲンが増殖ファクターの合成を誘導し、その結果 stroma-epithelium paracrine あるいは autocrine 相互作用を経てエストロゲンに敏感な細胞の増殖が起こる。しかし、ER knockout マウスに投与された増殖ファクターは、メスの生殖器で増殖効果を誘導せず、間接陽性の仮説と相反する。
- ・間接陰性の仮説は、plasma にある抑制分子 (estrocology-I) がエストロゲンの標的細胞の増殖を抑制すると示唆する。エストロゲンは、この血清にある抑制物の効力を中和するだけで細胞増殖を誘導している可能性がある。

エストロゲンを投与し続けると、標的細胞の増殖が停止する。STEP2 は、エストロゲンの直接の効果と思われる。なぜなら、最終的には STEP1 の増殖ファクターや抑制物ではなく、ホルモンによって仲介されているからである。

エストロゲンによって誘導された反応の変化

エストロゲンによって誘導された反応は、細胞内の環境によって変化する。ER と反エストロゲン 4-hydroxytamoxifen の複合体は、骨組織に対し agonist な影響をもたらすことがあるが、乳房組織では反エストロゲ的な影響をもたらすことがある。同じ細胞種でも、成長段階によっては細胞内環境が異なるため、同じ ER ステロイド複合体に対し別の反応を示すことがある。分子的には、標的細胞にあるレセプターと別の細胞タンパク質との間の相互作用を意味する。化合物の一部が ER の順応を引き起こし、中核内の別のタンパク質との相互作用に繋がる可能性がある。様々な影響に対する反応により細胞の生理学的状況が変化すると、細胞核内のタンパク質の種類も変化し、ER 複合体は全く別のタンパク質や転写ファクターと関わり合うことになる。これはホルモン擬態の研究を進めている者にとって新たな研究分野となっている。

ER と環境エストロゲンとの関係が重要なのは、ER がほとんどの脊椎動物において、成長初期段階から存在が見られることから分かる。このことは 1970 年代、DES を大量に投与された女性から生まれた子供で生殖器の異常が見られたことから、医学界で注目されるよ

うになった。最も注目を浴びたのが、通常は稀なはずの膵腺ガンの発生で、DES を投与された女性から生まれた女子が成長した段階で見られた。このガンは治療を受けた母親には見られなかったが、母親が DES 治療を受けた 15 年から 20 年後に、その後生まれた女子の間で見られた。したがって、異なる細胞環境の組み合わせと、胎児段階での ER の存在で、予想外の問題が発生したことは、化学物質質への反応に細胞環境がもたらす影響の重要性を印象づけた。

マウスとラットの胚への影響が、McLachlan et al. によって研究された。付録にそれについて触れている。この研究は、胚および胎児の組織にレセプターが存在すると、エストロゲンコントロール物質のメカニズムを形成し、成長中の胚および胎児に影響を及ぼすことを示した。胚レセプターの通常の機能についてはまだあまり解明されていないが、成長段階にある生物に対するエストロゲン agonist 投与の実験結果から、エストロゲンレセプターが脳や、生殖器や、その他の組織に影響していると思われる。

免疫細胞化学は、ER がマウス blastocyst 内に存在することを示している。PCR 法は、受精していないマウスの卵母細胞内と blastocyst で ER mRNA が存在することを示した。また、PCR 法により ER mRNA がヒトの卵母細胞にも存在することが分かった。成長が進んだ段階で、ER が男女の生殖器でも存在が確認されるようになり (12 日目から 15 日目の胎児)。15 日目から 28 日目まで、ER は女子で増加し、男子で減少するが、男子でもかなりの量が残る。

免疫細胞化学法により、胎児 ER が blastocyst の細胞全てで存在することが明らかになった。しかし、マウスの成長段階では、様々な細胞種にある ER の有無が変化する。ER は、出産後もオスとメスの生殖器に残る。量的な変化は起こるが、いずれもエストロゲン反応システムを持ち、生理学的および環境的に発生したエストロゲンに反応するようになっている。

ER が不足する人間は、一例だけ報告されている。この男性は明らかにエストロゲン不足の症状が見られたが、なぜ他に ER 不足の人間や動物が報告されていないのかという疑問がわく。提案された一つの理由は、ER は通常から胎児に影響をもたらす、不足すると死滅するからだということである。しかし、ER に異常が出るように操作されたマウスは、正常に成長し、実際の外形表現型は通常通りだった。これらの結果は、メス・オス共に生殖力がなく、低エストロゲン反応特有の生殖器の異常が見られたものの、生殖器の出生前の成長が ER によって仲介された反応とは無関係であるということを示している。

ER の prepuberal 発生は、それが何を意味するかは不明である。エストロゲンや潜在的なエストロゲン擬態が環境で十分な濃度に達すると胎児 ER が生物そのものを破壊することは明らかである。

総論と結論

エストロゲンレセプターや、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

オーは、様々な化合物と結合し、HAA の潜在的な輸送物として通常の細胞経路に影響をもたらす。ステロイドホルモンレセプターは、基本的な遺伝子コントロールメカニズムを制御する。これらが HAA と相互作用すると、通常のプロセスが攪乱される。生物学的影響は、細胞種、標的細胞内の HAA 濃度、そしてレセプターに対する化合物の結合性に依存する。HAA の多くは ER に対する結合性が低く、反応を誘導させるには化合物が比較的高い濃度が必要であることを示唆する。細胞の増殖や胎児の成長は低い濃度のエストロゲンでも敏感に反応することから、HAA の影響は大きくなるという報告もある。部分 agonist である tamoxifen のような HAA は、組織や種によって異なる反応をもたらす可能性がある。しかし、エストロゲン作用を示す化合物の多くは細胞反応が同じのようである。

本章で取り上げた HAA のエストロゲン特質や有害性には大きな差があり、構造に依存している。また、*in vitro* アッセイはエストロゲン作用のスクリーニングツールとして使用されているが、その結果から特定の HAA が生物の通常ホルモン経路を妨害するか断定することはできない (第十一章)。

ER によって仲介された反応のメカニズムには、エストロゲン反応要素など ER と特定の DNA シークエンスとの相互作用や、他の転写ファクターとの相互作用や、他の信号経路との crosstalk や、細胞膜によって仲介された反応などが含まれる。エストロゲンと HAA はエストロゲンに反応する細胞増殖や、その他の関連した反応を、共通経路を経て誘導するようである。オスもメスもエストロゲンに反応するが、ER 発現や細胞種のエストロゲン反応は、出生前と後で変化する。ホルモンでコントロールされた細胞経路における HAA の作用は、本報告書の他章で取り上げられている。

4章 薬量学

ホルモン様活性を示す化学物質 (HAAs) の生体リスクは、薬力学や薬効学に関係した多くの要因によって変動する。HAAs の化学的・物理的性質とそれに暴露された生物種の機能は、その化学物質が体内に蓄積し障害をもたらすに至るかどうかが決める。HAAs の場合、化合物の疎水性と生体組織の脂肪含量がとりわけ重要である。化学物質の取り込みや排泄速度、それに半減期などはHAAs の種類や生物種によって大きく異なるし、投与の量や期間によっても変動する。また、生物のどのライフステージで化学物質の暴露があるのか、ということも理解しておく必要がある。本章では、用量-作用関係について考え、環境中のHAAs が標的臓器や細胞に蓄積し、生物学的にリスクを及ぼす濃度に到達するかどうかについて考察した。さらに、毒物力学的視点、すなわち吸収速度、細胞と外部媒体との間の分配効率、血液による輸送速度、血液と体脂肪/標的細胞との間の分配効率、代謝速度、排泄速度等についても考究した。

動物による生体異物の取り込みと排泄は、室内実験系および自然環境下において研究が行われている。生物は、様々なルートを通して環境中のHAAs に暴露されるが、通常化学物質は、腸、皮膚、呼吸器を通して体内に侵入する。汚染物質の濃度は食物連鎖の栄養レベルに応じて増幅し、一般に長寿命生物は、その組織中に高濃度の汚染物質を蓄積している。高いオクタノール-水分配係数 (K_{ow}) をもち、生体内で分解されにくい物質は、水圏生態系で濃縮される。生態系の頂点に位置する動物 (白クマ、鯨類、猛禽類など) は、高い濃度でこの種の物質を体内に蓄積している。有機汚染物質の場合、その親油性は取り込みや蓄積および排泄を決めるきわめて重要な要因である。親油性の高い物質の場合、吸収は受動拡散に従い、組織中の脂肪含量が重要な要因となる。水溶性と非水溶性媒体との間における化学物質の分配は、組織中における化学物質の蓄積性を推定する指針として利用されてきた。オクタノール-水分配係数は (K_{ow}) は、HAAs や他の生体異物の生物蓄積性を予知する指針として活用されてきた。一方、親油性の低い物質の吸収メカニズムは充分明らかにされていないが、能動輸送に従っているようである。ところで、化学物質の生体内半減期はその種類や動物種によって大きく異なる。一般に半減期の長い物質は、胚の発達やホルモン系に常時影響を及ぼす可能性がある。一方、半減期の短い物質は、暴露の期間やタイミングによって影響を及ぼすことがあるが、常時リスクを与える可能性は小さい。汚染源が一過的であれ偏在的であれ、分解の遅いHAAs の暴露は長期化する。いずれにしても、化学物質の取り込み、排泄、蓄積に関して、とりわけ関心が集まっているのは胎仔(児)期における暴露であり、胎盤を経由して母親から移行した有害物質の毒性に対して胎仔(児)は敏感であると考えられている。環境汚染物質はヒトの母乳や牛乳から検出されており、これらのルートを通した新生仔(児)への暴露および取り込み、排泄、蓄積についても充分理解しておく必要がある。

血液は、生体内の標的臓器や細胞へ化学物質が分布する媒体として、中枢的な役割を果

たしている。一般にHAA sの組織中濃度は、血液中よりもはるかに高い。親油性の高い物質の組織/血液濃度比は大きいことが明らかにされているが、親水性の化合物の比は1に近い。化学物質の組織分布を理解することは、その毒性影響を解釈する上で欠かせないが、体内負荷量を基にした化学物質の影響評価も重要である。何故ならば、個々の組織中の濃度が生物種間の感受性の違いを比較する時に用いられると、差がみえないことがある。脂溶性の化学物質は血清中に遊離しているのではなく、タンパクやリポタンパクまたは血液中の循環細胞に結合しており、それは内因性ホルモンの存在形態と類似している。遊離しているホルモンのうち、生物学的に活性なフラクションは細胞内に侵入できるため、細胞内のステロイドレセプターと結合する。それは、標的器官に到達したときのみその活性をあらわす。ホルモンと結合している血清タンパクは特異的であるが、非特異的な部分もある。外因性のエストロゲンと内因性のエストロゲンは、血清中の異なったタンパクと結合するため、細胞内への侵入の様式が違っているとされている。標的細胞内において、ステロイドは特異なレセプターと結合することにより生物学的有効性を発揮すると考えられている。さらに、ヒトのステロイド結合タンパクとHAA sの結合は、内因性のホルモンと置き代わっておこるため、標的細胞へのホルモンの輸送に影響を及ぼす。母体から胎仔(児)への化学物質やホルモンの輸送、あるいは胎仔(児)の中での化学物質やホルモンの輸送に関するタンパクはとくに重要である。しかし、胎仔期に存在する生物活性の高いステロイドの作用を、標的細胞内でなく血中の総ステロイド濃度で議論すると、解釈を誤ることになる。

HAA sの標的となる主要な臓器、つまりホルモンを産生、制御し反応する臓器としては、脳、生殖腺、肝臓、子宮、乳腺、副腎、前立腺、胎盤などがあり、発達中の胚や胎児の臓器も含まれる。しかし、ヒトや野生生物体内の標的臓器/組織のHAA s濃度や薬力学に関する情報は乏しい。生体内には、化学物質が脳や胎仔(児)へ移行するのを防ぐため血液-脳関門や胎盤関門が存在するが、これらの機能は水溶性の化学物質に対して有効であり、脂溶性のHAA sの移行に対しては、あまり効果がない。

標的臓器中のHAA s濃度の測定は、その物質が標的細胞に影響を及ぼす濃度であるか否かを判断する指針にはならない。やはり、標的細胞そのものの濃度を検知することが必要である。しかし、標的細胞に注目した測定の研究はきわめて少ない。分子の変化は標的細胞への化学物質の移行を意味し、HAAによる影響を受けタンパクの細胞内局在化が起これば敏感な標的細胞を検知する手がかりとなる。一般に脂肪組織はHAA sを蓄積し、これら化学物質のたまり場として機能する。卵や母乳中へ蓄積することになれば、胎仔(児)や新生仔(児)は多量のHAA sに暴露されることになる。

実際、HAA sは酸化、還元あるいは結合反応を通して代謝される。代謝のプロセスは複雑で、HAA sとホルモンが作用することによっておこる多様な代謝のメカニズムを理解することは、これらの化学物質の暴露に関与するリスクを評価する上で必須である。代謝はHAA sを不活性化する過程であるが、反面ホルモン活性のない親化合物からホルモン

作用をもつ活性代謝物を生成する過程でもある。ステロイド代謝に関与する酵素、すなわちチトクロームP450 (CYP) の機能は、HAA sに暴露されると変化する。HAA sを代謝する酵素は、これら化学物質の毒性に関与する細胞の感受性に強い影響を及ぼすかもしれない。例えば、HAA sがエストロゲンの代謝過程に作用する場合、細胞内の必要な酵素が不足するため、代謝活性化した通常の細胞以上に、化学物質のエストロゲン活性に対して敏感になることはないであろう。胚胎期、幼生期、胎仔期におけるチトクロームP450酵素の発現は、HAA s暴露の発達段階の影響に深く関与している。HAA sやホルモンの代謝に関与するCYP酵素の多様性とその役割についての知見は、いまだヒトを含む多様な生物種へ一般化できるものではない。しかし、魚介類の脂溶性HAA sの代謝分解力は、哺乳類に比べ弱いことが知られている。基質との親和性、触媒作用の効率等酵素の機能は、特異な代謝物生成の速度と量を決める。CYP遺伝子の多様性は、様々な代謝物の生成にかかわっている。ステロイド代謝の研究の大半は、肝臓に局在する酵素を調整して実施されてきた。もし化学物質の暴露が肝臓においてステロイドを水酸化する酵素を誘導するのであれば、ホルモンの排泄が促進され、その体内濃度は減少することになる。他の標的臓器でも類似のHAA sの影響が起こるかどうかは、未だはっきりしていない。標的臓器においてCYP酵素にHAA sが作用する方が、肝臓において作用するよりも深刻であろう。

HAA s暴露の影響は、生物種によって大きな違いがあり、現時点では、ある種の動物で得られたデータを他の種へ外そうすることはむづかしい。様々な生物種で、酵素に結合する基質の構造-活性相関を明確にすることは、成果を普遍化する手だてとなろう

HAA sの用量-作用試験には、挑戦的な課題が残されている。何故ならば、HAA sはマクロ分子を攻撃する活性分子として作用することによって影響を生起するだけでなく、体内の信号発信システムと相互作用する安定な分子として働くことにより影響が発生するからである。限られた数のHAA sで行われてきた *in vivo* 研究のデータではあるが、非単調的な用量-作用相関がいくつかの事例で示唆されている。HAA sに対する用量-作用曲線の形状の報告は、毒性試験のプロトコールや用量-作用試験の方法に含蓄をもたせた。

最後に、本章では内分泌攪乱作用の検知に関して以下のことを提言したい。

- ・深刻な影響が懸念される化学物質の場合、研究はHAA sの直接的および間接的影響の区別、およびHAA sの一次的および二次的影響の区別を明確にするよう計画されるべきである。また、作用の基本的なメカニズムを明らかにする研究は、多様な反応を検知できる *in vivo* および *in vitro* の試験を実施すべきである。
- ・環境中のHAA s暴露に対する種特異的、組織特異的な影響は、種を超えて外そうできるようにさらに研究を深化させるべきである。
- ・HAA sの *in vivo* 試験システムは、生物の成長過程で最も敏感と思われる出生前後に設定し、その暴露量も環境中で通常検出されるレベルで行われるべきである。

- ・多様なHAA s でみられている作用の用量－作用関係の特徴の理解は、現実の環境で認められる濃度レベルで *in vivo* および *in vitro* の試験が行われるべきである。

5章 生殖と発生への影響

野生生物集団の生殖と発生に対する環境汚染物質の有害な影響については、以前から科学文献で報告されている。野生生物の生じる生殖障害として報告されているものには、形態異常、卵殻の厚さの低下、個体数の低下、子孫の生存可能性の低下、ホルモン濃度の変化ならびに社会的性的行動の変化がある。

発生の重要な時期に強力な合成エストロゲンであるジエチルスチルベストロール (DES) に暴露させて有害作用を再現した実験室での実験 (Newbold 1995; 付録も参照のこと) から、エストロゲン様の特性を有する化学物質が、生殖ならびに生殖に有害である可能性があることに関心が集まった。

ヒトでの女性生殖管に対して DES が出生前に暴露されることによる有害な結果については、Herbst and Bern (1981) ならびに Mittendorf (1995) が詳細にレビューしており、現在でも引き続き鋭意研究が行われている。環境ホルモン活性物質 (environmental hormonally active agents (HAAs)) に暴露されることで、動物でもヒトでも同様の影響を受けるかどうかについては、明確にはなっていないが、DES を動物に暴露させると、オスとメスの子孫に変化が生じるので、エストロゲン様、抗エストロゲン様、ならびに抗アンドロゲン様の活性を有する他の化合物に暴露されることによって有害な影響が生じる可能性があることを考える必要がある。器官発生の重要なステージで、低濃度のある種の化学物質に暴露されることで、異常が生じ、そのことで、後の段階で器官系の機能に不可逆的な変化を招くおそれがあることも懸念される。そのような損傷は、遺伝子の突然変異では生じないもので、発生と細胞分化中に遺伝子を制御するプロセスにより生じるものと思われる。成体におけるホルモンの影響は、通常一過性のものであり、化学物質が存在しなくなると、ホルモンの影響は消失する。これとは対照的に、発生中に遺伝子の活動を変化させる環境化学物質は、はるかに強い影響を及ぼしたり、回復不可能な影響を及ぼしたりするであろう。そのような化学物質の評価は、成体に対する化学物質の影響を評価することよりも困難である。有効暴露レベルは、成体における有効暴露量よりも低いであろうし、生じる影響は、暴露の時点と時間的に相当に異なっており、因果関係を明らかにすることが困難になる。

本章は、実験的研究、ヒトならびに野性生物集団で観察されている HAAs 暴露と生殖や発生に対する影響との間の関連性を示した文献の批判的分析である。本章で扱うのはごく一部 (主にエストロゲン様) の HAAs であり、野生生物での評価は、ごく一部の脊椎動物種に限られる。脊椎動物では、内分泌系がおどろくほど保たれているが、実際の働きについては大きな違いがある。生殖線の逆転 (gonadal reversal) は哺乳動物では生じないが、Seveso からのデータ (Mocarelli et al. 1996) ならびに職業的に暴露されたコホート (Goldsmith et al. 1984; Potashnik et al. 1984; Potashnik and

Porath 1995)からは、出生児の性比を変化させる何らかの選択プロセスが関与していることが示唆される。性分化のホルモンコントロールは、鳥類と哺乳動物では、同じホルモン（例えば、エストラジオール）が関与していても、異なっている。様々な脊椎動物族での生殖系の発生には、他にも重要な違いがある。従って、異なる動物族に対しては、HAAsは異なる影響を及ぼす可能性がある。このため、脊椎動物の発生と生殖に対する様々なHAAsの暴露の影響についてだけでなく、一つのHAAsの暴露の、異なる動物族における生殖と発生に対する影響についても解明することが必要である。

実験室研究は、特定のHAAsについて検討されている。これには、エストロゲン受容体と結合することが知られているいくつかの化学物質を含む。すなわち殺虫剤（ジクロロフェニルトリクロロエタン(*o,p'*-DDT)、メトキシクロル、クロルデコン)；プラスチックに使われているモノマー（ビスフェノールA)；洗剤、コスメチック、化粧品、その他の家庭用品に使用されるアルキルフェノール界面活性剤（オクチルフェノール)；ならびに可塑剤（ブチルベンジルフタレート(BBP))である。他の化合物は、アンドロゲン受容体に結合することが知られている。すなわち：殺真菌薬のビシクロゾリンや1,1-ジクロロ-2,2-ビス(*p*-クロロフェニル)エチレン(*p,p'*-DDE)、DDTの持続性*in vivo*代謝産物である。ポリ塩化ビフェニール(PCBs)ならびに2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-*p*-ダイオキシン(TCDD)も、いくつかの機序を介して発生に障害を及ぼすおそれがある。これらの化合物は、最も研究が進んでいるHAAsであるのでレビューすることにした。以下に論じた研究は、これらのエストロゲン様、抗エストロゲン様、抗アンドロゲン様の物質に*in vivo*で暴露されることで生じる可能性のある発生ならびに生殖に対する影響を明らかにするものである。本章で論じる化合物のリストは、完全なものとはとても言えるものではなく、すべてのHAAsを代表するものでもないものと思われる。

ここで評価しているヒトでの研究には、DDE、PCBsならびにTCDDへの暴露が含まれる。同様に評価したのは、ヒト集団での精子濃度の地域的・時間的変動に関するデータである。野生生物集団での有害な生殖に関する影響についての考察がある。可能であれば、これらの知見に関連した実験室研究を示す。野生生物に関するセクションでは、いくつかの代表的脊椎動物種（魚類；鳥類；ワニ；カメ；サンショウウオ；カエル、ヒキガエル、フロリダパンサー)におけるHAAs暴露の影響について記述する。

情報の評価にあたっては、暴露の重要な時期と、環境中で通常認められる濃度と、生殖発生に対する影響の関連性を示すデータを調べるのが不可欠であるが、これらの情報のほとんどは、まだない（詳細については、第1章参照）。原因と効果の関係が明らかであるか肯定的に仮定できる場合には、すでにわかっている、あるいは疑いのある毒性学的機序について論じる。

Laboratory Animal Studies of Selected HAAs

一部の HAAs の実験動物での研究

ジクロロジフェニルトリクロロエタン (DDT)

エストロゲン様 DDT アイソマーの *o,p'*-DDT を 1 mg/kg 腹腔内に 1 回投与した未成熟のメスのラットでは、子宮の湿潤重量が有意に増加し (Welch et al. 1969)、出生後 2-4 日に 1 日あたり 1 mg の *o,p'*-DDT を皮下注射されたメスの新生ラットでは、思春期が早期に始まり、受胎能が早期に消失する、“遅延無排卵症候群” と呼ばれる症状が生じた (Heinrichs et al. 1971)。Gellert et al. (1974) は、生後 2-4 日に 0.1 mg の *o,p'*-DDT を皮下注射すると、オスのラットで繁殖能力に著しい障害が生じ、前立腺や精囊の重量が低下すると報告している。

DDT の抗アンドロゲン代謝産物である *p,p'*-DDE を、100 mg/kg/日、妊娠 14-18 日に投与したラットから生まれたオスの仔ラットでは、肛門性器間距離が減少し、乳頭が生じた (オスの齧歯類では、アンドロゲンは通常は乳頭の保持をブロックする) (Kelce et al. 1995)。離乳したオスのラットに、生後 57 日まで 100 mg/kg/日の *p,p'*-DDE を餌に混ぜて投与した場合、思春期の開始が遅れ、4 日間 200 mg/kg/日の *p,p'*-DDE を餌に混ぜて投与した去勢成体ラットでは、精囊と前立腺の重量が低下した (Kelce et al. 1995)。

妊娠中に DDT に暴露されると、マウスでの運動能力 (Tilson et al. 1979) ならびにラット (Lilienthal et al. 1990; Lilienthal and Winneke 1991) およびサル (Schantz and Bowman 1989; Schantz et al. 1989) での学習能力に障害をもたらすことも示されている。これらの研究については、第 8 章で論じる。

DDT や DDE が、実験動物の生殖系に構造的機能的異常をもたらす機序については、現在でもあまり解明されていない。第 2 章で論じるように、DDT アイソマーである *o,p'*-DDT は、エストロゲン様のと特性を有しており、DDT の代謝産物である *p,p'*-DDE は抗アンドロゲン物質として作用する。Kelce et al. (1995) は、 $3.5 \mu\text{M}$ の *p,p'*-DDE を投与すると、ラットの前立腺細胞のアンドロゲン受容体の 50% を占拠していると報告した。これは、ラットの子宮細胞のエストロゲン受容体の 50% を占拠するのに必要な *p,p'*-DDE の濃度よりも約 1/200 である。Soto et al. (1997) は、*p,p'*-DDE がエストロゲンの部分的アゴニストであることも示した。彼らは、MCF7 ヒト乳癌細胞の増殖を増すには、 $10 \mu\text{M}$ の *p,p'*-DDE の投与量が必要であるが、増殖量の増加は、エストラジオールの飽和投与で認められる最大増殖応答の 25% に過ぎないことを報告した。これらのことを総合すると、*p,p'*-DDE のアンドロゲン受容体との結合能やアンドロゲン受容体への干渉の程度は、エストロゲン受容体への結合能や、エストロゲン様応答の刺激の程度よりもかなり大きなものであることをこれらの知見は示している。HAA としての *p,p'*-DDE の主な活性は、従って環境抗アンドロゲンであり、環境エストロ

ゲンとしてのものではない。発生期の動物に対する p, p' -DDE の抗アンドロゲン特性は、DDT のエストロゲン様特性よりも重要であると思われる。 p, p' -DDE は、組織中に数十年間残留するが、 o, p' -DDT は、ヒトの血清中で検出されることははるかに少ない (Stehr-Green 1989)。しかし、発生期の臨界期に、 o, p' -DDT やその他の持続性のない殺虫剤 (例えば、メトキシクロル) に暴露されることで、マウスの胎児発生に影響を及ぼし、なわばり行動の変化などの一部の影響は、成体になってから初めて表面化する (vom Saal et al. 1995)。

メトキシクロル

メトキシクロルは、ホームガーデンや穀物、家畜に使われている殺虫剤である (ATSDR 1994)。メスのラットおよびマウスの生殖系に対するメトキシクロルの影響については、広く研究がなされてきた (Cummings 1997)。メトキシクロルは、繁殖能力、妊娠早期、ならびに子宮内発生に有害作用をもたらす。思春期排卵の早期化、膾角質化の持続、繁殖能力消失の早期化、ならびに、子宮、卵管の異常な細胞タイプが、新生児に $0.5 \mu\text{g}/\text{日}$ の投与量で投与した後に生じることが認められている (Welch et al. 1969; Gellert et al. 1974; Gray et al. 1989; Eroschenko and Cooke 1990; Gray 1992)。交尾させたメスのラットに着床期前後に投与すると、メトキシクロルを $300 \text{ mg}/\text{kg}/\text{日}$ (約 $100 \text{ mg}/\text{日}$) 投与することで、受精卵の着床がほぼ完全にブロックされた (Cummings and Gray 1989; Gray et al. 1989; Cummons 1990)

発生中にメトキシクロルに暴露されると、オスのラットやマウスの生殖系や行動の変化をもたらす。妊娠後期に油に $20 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ のメトキシクロルを溶かして与えたマウスのオスの仔では、成体になってからのなわばりマーキング行動が増加した。これは、 $20 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ の o, p' -DDT や $20 \text{ ng}/\text{kg}/\text{日}$ の DES で認められた効果と同様のものがある (vom Saal et al. 1995)。オスのマウスに生後 1 週間 1 mg のメトキシクロルを毎日腹腔内投与すると、血漿中のテストステロン濃度が低下し、成体での前立腺ならびに精囊の DNA 量が低下した (Cooke and Eroschenko 1990)。妊娠期間を通じてメスのラットに $50 \text{ mg}/\text{kg}/\text{日}$ のメトキシクロルを投与すると、オスの仔の精巣や精巣上体が小さくなり、精子数が減少した (Gray et al. 1989; Gray 1992)

メトキシクロルが、実験動物の生殖系ならびに生殖行動に影響を及ぼす機序については解明されていない。メトキシクロルは、肝臓でジメチル化してモノ-ヒドロキシ-メトキシクロル (投与量の 30%) もしくはビス-ヒドロキシ-メトキシクロル (投与量の 23%) になって初めて、*in vivo* でエストロゲン様の作用を発揮する (Kapoor et al. 1970)。より強力なエストロゲン様代謝産物はビス-ヒドロキシ-メトキシクロルである (Welch et al. 1969; Bitman and Cecil 1970; Bulger et al. 1978; Bulger and Kupfer 1983)。 p, p' -DDE とは異なり、メトキシクロルは、*in vivo* では長時間残留しないが (ほとんどが 24 時間以内に排出される)、土壌中で比較的長時間残留する (数ヶ月間)

(Miur and Yarechewski 1984; AYSDR 1994)。

クロルデコン

クロルデコン[デカクロロオクタヒドロ-1,3,4-メテノ-2H-シクロプタ(cd)ペンタレン-2-one]は、バナナや、着果前のミカンの木、タバコ、ならびに観賞用灌木の害虫駆除に1960年代から1970年代に使われてきた(ATSDR 1995)。クロルデコンと同様の化学構造を有するミレックス殺虫剤が、フシアリの駆除のためにはるかに多く用いられてきた。

15 mg/kg/日のクロルデコンを妊娠14-20日の妊娠ラットに与えると、生まれた21頭のメスの仔のうち12頭で、膈発情が持続しており、残り9頭のラットでは、生後6カ月で無排卵であった(Gellet and Wilson 1979)。この効果は、エストロゲン暴露後に認められるものと合致していたが、オスの仔では、エストロゲン様の影響は認められなかった。生後暴露に関する研究では、成体メスラットに1.5 mg/kg/日のクロルデコンを7日間投与すると、持続的な膈発情が認められた(Hammond et al. 1979)。成体メスマウスに、出産から1-10日にクロルデコンを125 μ g/日投与すると、膈上皮が完全に角質化した。これは、10 μ g/日のエストラジオールを投与して得られた結果と同様のものであった(Eroschenko and Palmiter 1980)。オスでは、精子発生が、エストラジオールで完全に抑制され、クロルデコンで低下した。新生メスラットの生後2日目ならびに3日目に0.2もしくは1 mg/kg/日のクロルデコンを投与すると、発情期が早期に始まり、発情周期が早期に消失した(Gellert 1978a)。

ウズラを用いた研究で、Eroschenko (1981)は、200 ppmのクロルデコンを含む餌をオスのウズラに3週間与え、精巣の重さが浮腫により有意に増加し、精細管が拡大し、胚上皮がびらんしていると報告した。異常精子も認められた。6週間暴露することで、一部の動物の精巣は萎縮し始めた。

エストロゲン受容体に対するクロルデコンの結合親和性は、エストラジオールと比較して約0.02% (1/5,000)であった(Eroschenko and Palmiter 1980)。

ピンクロゾリン

ピンクロゾリン(3-(3,5-ジクロロフェニル)-5-メチル-5-ビニルオキサゾリジン-2,4-dione)は、果物や野菜、ホップ、芝生のような様々な植物のカビ対策に用いられているジカルボキシミド抗心筋剤である。ピンクロゾリンを、100もしくは200 mg/kg/日の量で妊娠14日から出産3日後までの妊娠および授乳ラットに投与すると、オスの仔は、出生時の外見からはメスの仔と判別することができず、オスが乳頭を保持していた(Gray et al. 1994)。これらの知見は、外性器に対するアンドロゲンの男性化作用と、乳頭の発生に対するアンドロゲンの男性化(脱女性化)の作用がピンクロゾリンによりブロックされたことを示している。成体では、外性器と内性器の肉眼

的異常のため、ビクロゾリンを投与したオスは不妊であった。

ビクロゾリンは、アンドロゲン受容体アンタゴニストである (Kelce et al. 1994)。摂取後に代謝産物に分解され、それが、アンドロゲン受容体の結合に対して、内因性アンドロゲンと拮抗する。

ポリ塩化ビフェニール (PCBs)

PCB は、現在では米国では製造が法的に禁止されているが、変圧器やコンデンサーに使用するため多量の PCB が生産された。209 種の PCB congener のうち、塩素の量の多い数種が残留性が高く、食物連鎖の中で生物濃縮される。

早期に PCB 混合物に暴露されたラットでは、DES 暴露により生じたものと同様の生殖に対する影響を生じ得る (Bitman and Cecil 1970; Sager 1983; Sager et al. 1987; Subramanian et al. 1987; Lundkvist 1990; Jansen et al. 1993; Bergeron et al. 1994; Birnbaum 1994; Gray et al. 1995; Li and Hansen 1996)。授乳期に 32 もしくは 64 mg/kg/日の PCBs を与えたラットのオスの仔は、精囊の重量が有意に減少し、精巢の大きさが有意に大きくなった (Sager 1983; Sager et al. 1987)。これらの効果は、甲状腺ホルモンレベルの変化によるものと思われた (Jannini et al. 1993)。投与オスを暴露していないメスと交尾させると、着床率は有意に低く、生児出生数も有意に低く、吸収率が有意に高かった。32 もしくは 64 mg/kg/日の PCBs に授乳期に暴露させた母親から生まれたメスの仔では、思春期が遅れ、膣開口が遅れ、最初の発情が遅れた (Sager and Girard 1994)。成熟すると、子宮の湿潤重量が、発情周期の全てのステージで低下しており、着床前段階と着床後の段階での成功率が低いため、繁殖能力が低下した。PCBs を腹腔内に投与したメスのラットでも、子宮重量が有意に上昇した (Jansen et al. 1993)。

メスのモルモットに、妊娠中に 2.2 mg/日 (1.8 - 3.2 mg/kg/日) の PCBs を矯正投与すると、メスの仔は、子宮開口が遅れ、オスの仔は、精巢の絶対重量と相対重量の両方が有意に低下した (Lundkvist 1990)。

コプラナー PCBs に出生前ならびに出生後に暴露させると、甲状腺ホルモンの濃度と取り込みを変化させることができる。妊娠ラットに、0.2、0.6 もしくは 1.8 mg/kg/日の HCB (3,3',4,4',5,5'-ヘキサクロビフェニール) あるいは、1 mg/kg/日の TCB (3,3',4,4'-テトラクロロビフェニール) と 0.6 mg/kg/日の HCB を組み合わせたものを経口投与すると、胎児、新生児ならびに離乳期の全チロキシン (T_4) 濃度ならびに遊離 T_4 濃度が低下した。このことは、末梢での T_4 代謝が増加していることを示していた (Morse et al. 1993)。タイプ II チロキシン 5'-deiodase の脳ホモジェネート中の活性の増加も認められた。このことは、これらの PCBs に暴露された胎児および新生ラットの脳の中で局所的な甲状腺機能低下状態が生じていることを示唆するものである。PCB 混合物の Aroclor 1254 を妊娠ラットの妊娠 10-16 日に 5 もしくは 25 mg/kg/日の

投与量で経口投与すると、胎児の血漿や脳にヒドロキシル化 PCB 代謝産物 (2,3,3',4,5'-ペンタクロロ-4-ビスフェノール) が選択的に蓄積された。このことが、胎児の血漿ならびに脳の T₄ 濃度の低下の原因であると考えられている (Morse et al. 1996)。

アカゲザルでの生殖毒性試験で、メス 80 頭に、繁殖前、繁殖中 (未投与のオスと)、ならびに繁殖後に 6 年間、5 - 80 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ の Aroclor 1254 を与えた。妊娠率に用量依存的に有意な低下傾向を示し、胎児死亡率が有意に用量依存的に増加する傾向を示した (Arnold et al. 1995)。母親の年齢が混乱因子にはならなかった。この研究中に、これらの動物の一部で子宮内膜症は認められたが、病変の発生率や重篤度を、PCB 投与量と関連づけることはできなかった。同様に、女性での最近の研究では、PCBs への暴露や、塩素系殺虫剤への暴露が、一般集団で子宮内膜症と関連がないという結論が得られている (Lebel et al. 1998)

生殖に対する影響に加え、出生前に PCBs に暴露すると、PCB に汚染された魚を与えたラットで、学習障害や活動レベルの変化などの神経発生障害を生じることが示されている (Tilson et al. 1990; Daly 1992) これらの研究については、第 6 章で詳細に論じることとする。

第 2 章で論じるように、PCB 混合物、congener、ならびにヒドロキシ-PCB は、エストロゲン様ならびに抗エストロゲン様の特性を有していることを示すエビデンスがある。加えて、コプラナー PCB は、アリルヒドロカーボン- エストロゲン受容体クロストークを通じて、抗エストロゲン作用を示す (Krishnan and Safe 1993)。しかし、PCB の実験的研究の結果の意味を解釈するのは困難である。環境検体からのほとんどの PCB 抽出物は、実験室での研究に使われている市販の PCB 混合物に似ていないからである (WHO 1993)。PCB が環境中を循環するにつれて、様々な congener が次第に分布を変化させるようになる。最も塩素付加が進んだ congener が、通常は最も毒性が高く、選択的に蓄積される。

2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシン (TCDD)

TCDD は、殺虫剤や木材防腐剤などの塩素化合物の製造の副産物であったり、紙やプラスチック含む廃棄物の焼却の過程で生じたり、化石燃料をもやすことにより生じる (例、IARC 1997)。一連の研究 (Maby et al. 1992a, b, c) により、妊娠 15 日目に、0.064 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ないし 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の TCDD を 1 回経口投与させた母親から生まれたオスのラットに影響があることが示されている。0.16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ という低い投与量で、循環テストステロンレベルの低下や、出生時の肛門性器間距離の低下など性分化に障害があることがオスの胎児で認められている (Mably et al. 1992a)。オスの仔が成体になってからの性行動に及ぼす影響には、マウンティング、挿入、射精回数、射精潜時の変化、メスが性的に受容する姿勢を示す (ロードシス) ことなどがある (Mably et al. 1992b)。

加えて、精巣と精巣上体の重量の用量依存的な低下が認められた。1 μ g/kg の 1 回投与を受けた妊娠ラットのオスの仔での 1 日あたりの精子産生量も低下があったが、繁殖能力には影響がなかった (Malby et al. 1992)。

1 μ g/kg の TCDD を母親の妊娠 8 日もしくは 15 日に 1 回経口投与すると、思春期が遅れ、ペニスの部分的裂溝が生じ、ラットのメスの仔では、陰開口部にそって“スレッド”状の組織が認められた (Gray and Ostby 1997)。卵巣の重量も有意に低下していた。妊娠 15 日に同様の投与を受けたオスの仔では、思春期が遅れ、射精した精子数や精巣上体にある精子数が低下し、性副腺のサイズも低下した (Gray et al. 1995)

TCDD の慢性経口暴露を受けると、アカゲザルで子宮内膜症が生じ、その発生率と重篤度が用量と関係していた (Rier et al. 1993)。特に、成体メスザルに 4 年間にわたって、 2.5×10^{-7} ならびに 1.25×10^{-6} mg/kg/日 を餌にまぜて投与した。10 年後に、5 ppt の TCDD に暴露された 7 頭のサルのうち 3 例、25 ppt の TCDD に暴露された 7 頭のサルのうち 5 例で腹腔鏡検査で中等度ないし重度の子宮内膜症が見つかった。対照サルでは、重篤な疾患を示したサルはいなかった。

TCDD が、生殖障害をもたらし、生殖行動に影響を及ぼしている機序については、ほとんど解明されていない。ラットでの出生前 TCDD 暴露のアウトカムは、DES 投与後に見られた影響を同様のものであるように思われるので (Peterson et al. 1993; Eskenazi and Kimmel 1995; Gray et al. 1995)、TCDD がエストロゲンアンタゴニストとして作用するという一般的な考えは、TCDD の全ての影響に当てはめることはできないものと思われる。対照的に、齧歯類の子宮 (Gallo et al. 1986; Romkes et al. 1987; Umbreit et al. 1988, 1989; Astroff and Safe 1990; DeVito et al. 1992) ならびに乳癌細胞 (Biegel and Safe 1990; Harris et al. 1990; Safe et al. 1991; Gierthy et al. 1993; Merchant et al. 1993) で抗エストロゲン応答を TCDD が生じさせ、齧歯類で乳癌の増殖を阻害する (Kochiba et al. 1978; Gierthy et al. 1993; Hilvomb and Safe 1994; Tritscher et al. 1995)。TCDD は、アрилヒドロカーボン (Ah) 受容体シグナル伝達経路を介して抗エストロゲン作用を発揮する。この経路については、分子レベルで解明が進んでいる (Krishnan et al. 1995; Gillesby et al. 1997)。

ビスフェノール A

ビスフェノール A (4,4'-(1-メチルエチルジエン)ビスフェノール) は、ポリカーボネートプラスチック、樹脂、ならびに一部の歯科シーラントの製造に使われているモノマーである。他の無数の添加物でもある。妊娠ラットならびにマウスでの発生毒性に関する研究で (Morrissey et al. 1987)、1,250 mg/kg/日のビスフェノール A を妊娠 6-15 日に胃管投与すると、マウスでは母親の体重が有意に低下し、母親の死亡率と胎児吸収率が増加し、生児出生の体重が現象したが、ラットでは生じなかった。暴露

された胎児に外見的な形成異常は認められなかった。

はるかに低い暴露量のビスフェノール A を用いたその後の研究では (Nagel et al. 1997)、妊娠 11-17 日に $2\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ のビスフェノール A を投与した妊娠マウスのオスの仔では、前立腺重量が有意に増加した。加えて、 $2\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ のビスフェノール A を投与することでオスの仔では、包皮腺が有意に拡大したが、精巣上体は有意に減少した。 $20\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ のビスフェノール A を投与した場合、精巣 1g あたりの毎日の精子産生量が 20%減少したが、精巣の重量で補正しなかった毎日の精子産生量は有意に異なっていなかった (vom Saal et al. 1998)。研究者らは、これらの暴露量は、患者 18 例での唾液での検出レベル (90 ないし $931\mu\text{g}$) (Olea et al. 1996) およびに、ラッカーコートした一部の野菜缶詰での検出レベル (0 ないし $23\mu\text{g}/\text{缶}$) (Brotons et al. 1995) から判断すると、ヒトが遭遇する暴露範囲であると示唆している。ビスフェノール A は、エストラジオールの場合のように、血漿結合蛋白やその他の血液成分とは結合せず、従ってより迅速に血液から細胞に移動する (Nagel et al. 1998)。ステロイドの細胞への取り込みが血液成分によって阻害されることは、性腺ステロイドや副腎ステロイドの濃度は高いが、細胞内に入ることでできる生理活性のあるステロイドが低い濃度に抑えられているラットの胎児の時期にはとりわけ重大なことである (vom Saal et al. 1992)。

ビスフェノール A の影響は、ヒト乳癌 MCF7 細胞では、 10^{-8}M (10 nM) あるいは 2.3 ppb (分子量、228) で認められ (Krishnan et al. 1993; Olea et al. 1997)、F344 ラットプロラクチン産生 CH3 下垂体細胞では、 1 nM の濃度で認められる (Steinmetz et al. 1997)。 $2\mu\text{g}/\text{kg}$ のビスフェノール A を妊娠メスマウスに投与して生じたオスの仔の前立腺のサイズが増加しているという知見 (Nagel et al. 1997) は、 $0.02\mu\text{g}/\text{kg}$ の DES で認められたものと同様のものであり (vom Saal et al. 1997)、妊娠マウスに与えると、ビスフェノール A は DES よりも約 100 倍強力であることを示すものである。妊娠メスマウスに同じ $2\mu\text{g}/\text{kg}$ のビスフェノール A を与えると、メスの仔の思春期が早くなった。これは、他のエストロゲン様物質では高い暴露量で認められる効果である (Howdeshell et al. 1999)。

別の研究で (Steinmetz et al. 1997)、エストラジオールとビスフェノール A を F344 ラットならびに Sprague-Dawley ラットに、皮下 Silastic カプセルを通じて投与し、エストロゲン投与で上昇していた血清プロラクチンレベルを測定した (他の応答も同様に調べた)。ビスフェノール A は F344 ラットでは高プロラクチン血状態を招いたが、Sprague-Dawley ラットでは誘発しなかった。F344 ラットでは、対照動物と比較して、エストラジオールを投与することで血清プロラクチンレベルが 10 倍増加したが、ビスフェノール A の場合には 7、8 倍の増加であった。これらの知見は、胎児マウスでビスフェノール A と DES の比較を行った vom Saal et al. (1997) の知見と合致するものであった。これらの知見は、ヒトの暴露レベルの範囲で、ビスフェノール A に生理

活性があることを示唆するものである (Walent and Gorski 1990; Krishnan et al. 1993; Brotons et al. 1995; Olea et al. 1996; Takao et al. 1999)。

最近、Cagen et al. (1999)は、オスのマウスの性的発達に対する低暴露量のビスフェノール A の影響について評価する研究を実施した。可能な限り、試験プロトコルは、Nagel et al. (1997)ならびに vom Saal et al. (1998)が重要であると指摘した点に関しては、同じになるように努力した。2つの研究の間の違いとしては、CF₁のソース、マウス、ビスフェノール A の投与量、精子数を数えるのに用いた方法、剖検時のマウスの週齢、動物の飼育法である。さらに別の陽性対照群のマウスに 0.2 μ g/kg/日の DES を投与した。ビスフェノール A 投与群では、精巣の組織病理学、1日あたりの精子産生量、あるいは精子産生効率 (すなわち、精巣 1g あたりの 1 日の精子産生量) に対しては影響がなく、前立腺、包皮、精嚢、あるいは精巣上体の重量にも影響が認められなかった。加えて、DES を投与したグループではこれらのいずれのパラメータについても有害な影響は認められなかった。このように、この研究では、vom Saal et al. (1997, 1998)ならびに Nagel et al. (1997)の研究結果を再現できなかった。得られた知見が一致していない理由については、論争が続いており、現時点では解決されていない。

オクチルフェノール

オクチルフェノール (*p*-(1, 1, 3, 3-テトラメチルブチル)フェノール) は、洗剤やプラスチックなどの様々な製品にエトキシ化されたもの (オクチルフェノールエトキシレート) で使われるアルキルフェノールである。メスのラットの妊娠前、妊娠中、ならびに授乳期を通じて、100 もしくは 1,000 μ g/L のオクチルフェノールを含む飲料水を与え、オスの仔の成体での精巣のサイズと精子産生能について調べた。水摂取量に基づいたオクチルフェノールの摂取量は、1,000 μ g/L 暴露群でのみ計算されており、出生から 2 日間の 129 μ g/kg/日から離乳直前の 367 μ g/kg/日の範囲であると報告されている。1,000 μ g/L の暴露を受けた母親のオスの仔では、精巣の絶対重量、精巣-腎臓重量比、腹側前立腺の相対重量、ならびに 1 日の精子産生数が有意に低下しており、前立腺の相対重量が両方の濃度で有意に低下していた。オスの仔に生後 1,000 μ g/L のオクチルフェノールを生後 1-22 日に投与すると、精巣の平均重量と相対重量が有意に低下した (Sharpe et al. 1995)。最近、これらの著者らは、知見が再現できなかったと報告している (Sharpe et al. 1998)。もとの論文の信頼性が高いことを表明しているが、実験を再現できなかったのは、彼らが理解していないか、あるいはコントロールできない生物学的因子が変化したことによるものであろうとしている (Sharpe et al. 1998)。別の研究では、2 ならびに 20 μ g/kg/日のオクチルフェノールを妊娠 11-17 日に妊娠マウスに投与して生まれたオスの仔の前立腺重要には影響がなかった (Nagel et al. 1997)。しかし 1 日の精子産生数は有意に低下していた (vom Saal et al. 1998)。

ブチルベンジルフタレート (BBP)

BBP は、セルロール樹脂、ポリ塩化アセテート、ポリウレタン、ならびにポリスルフィドの可塑剤として用いられており、梱包用再生セルロースフィルムにも使われている。1,000 $\mu\text{g/L}$ の BBP をメスのラットに、交尾前と授乳期間を通じて飲料水で投与すると（水分摂取量に基づいた正規摂取量は、出生から2日間の126 $\mu\text{g/kg/日}$ から離乳直前の366 $\mu\text{g/kg/日}$ の範囲）、オスの仔に生後90-95日に平均精巣サイズがわずかではあるが有意に減少し、1日の精子産生数も低下した (Sharpe et al. 1995)。同様の知見が、同じ研究で評価したDESを投与したラットでも認められている (100 $\mu\text{g/L}$ 、摂取量は決定せず)。これらのエストロゲン様化合物は精巣サイズと1日の精子産生量に同様の影響を及ぼしているが、化合物のエストロゲン様の特性から生じたものであることを示すエビデンスはないことを、この研究者らは指摘している。

その後の研究で、Ashby et al. (1997) は、ほぼ類似したあるいは同一のプロトコルで実験したにも関わらず、BBPの影響を何ら見つけることができなかった。妊娠中ならびに授乳中のメスのラットに飲料水でBBPを投与し (平均摂取量182.6 $\mu\text{g/kg/日}$)、それらの動物の仔を90日間モニターした。DES (8.6 $\mu\text{g/kg/日}$) は、オスとメスの仔の性的発生に影響を及ぼし、肛門性器間距離が変化し、子宮開口および包皮分離の平均日数が変化し、子宮、精巣、副性腺の重量が変化し、尾側精巣上体の精子数が変化し、ホモゲネーション耐性精巣精子数が変化した。BBPは、子宮開口までの平均日数は少し速まることや、オスの肛門性器間距離がわずかに増加したことを除いては、影響がなかった。しかし、これらの影響は、BBPを投与した親から生まれた仔の体重が増加していることが原因であった。

Sharpe et al. (1995) の知見と Ashby et al. (1997) の知見とが矛盾している理由については不明である。

ジ-n-ブチルフタレート

ジ-n-ブチルフタレート (DBP) は、いくつかの研究 (例、Cater et al. 1977; Ema et al. 1994, 1995) で、生殖発生の毒性物質であることが示されており、ラットでの胎児死亡および骨格の形成異常 (主に口蓋裂) を引き起こす。加えて、DBPは精巣萎縮、生殖細胞の早期の脱落ならびにセルトーリ細胞の細胞質の空胞形成を生じることが示されている (Cater et al. 1977; Fukuoka et al. 1989)。未成熟ラットのほうが成体ラットよりもこれらの影響を受けやすいようである (Gray and Gangolli 1986; Creasy et al. 1987) 最近の研究で、それらの影響がより詳しく調べられている。

Sprague-Dawley ラットを用いて、継続繁殖プロトコルで National Toxicology Program の Reproductive Assessment において DBP を試験した (Wine et al. 1997)。オスとメスのラットの餌の中に継続的に DBP を投与し、オス

での1日あたりの平均摂取量は52、256、509 mg/kgであり、メスでは、80、385、794 mg/kgであった。繁殖ペア (F_0 世代) を長期間交尾させ、5回の出産の仔を生じさせるようにした (F_1 世代)。最後の出産の仔を成体まで育て、交尾させて子孫を作った (F_2 世代)。 F_0 世代では、観察された唯一の生殖に関する有害作用は、1回の妊娠あたりの生きて生まれた仔数が5-17%減少し、生きて生まれた仔の体重が低下したことである (<13%)。影響を受けたほうの性を明らかにするため、交叉交尾を行うと、子孫の数は変化しなかったが、投与メスから生まれた仔の体重が有意に低かったのに対して、投与オスから生まれた仔の体重は変化しなかった。剖検では、高暴露量のメスでは、体重が14%減少しており、オスとメスでは、腎臓および肝臓の体重に対する比が対照群と比較して、10-15%増加していた。

F_1 世代では、高レベル暴露群での交尾、妊娠、ならびに繁殖可能性の指標が全て有意な影響を受けた。特に、20の交尾ペアから1回の生きて仔の生まれた出産しか生じなかった。全ての暴露レベルのグループで、 F_2 世代の仔の体重は、対照群よりも6-8%低いものであった。剖検では、高暴露レベルの F_1 オスで、精巣上体の精子数と、精巣の精子細胞頭部の数が有意に減少していた。10頭のオスのうち8頭で、輸精小管の変性が認められ、5頭では精巣上体の発育不良その他の障害が認められた。 F_1 メスには、卵巣や子宮の発生には有害な影響がなかった。研究者らは、DBPは、成体ラットと発生中のラットの両方に生殖発生毒性を有し、DBPは第1世代よりも第2世代に大きな影響があると結論づけた。

Mylchreest et al. (1998)は、オスの生殖路に対する同様の影響を、はるかに短期間の妊娠期間および授乳期間で生じさせることができることを示した。妊娠CDラットに妊娠中と出生20日までの授乳期間にDBPを250、500、750 mg/kg/日の量で与えた。中等量投与群と高量投与群のオスの仔で肛門性器間の距離が低下した。成体になると、低、中等量、高量投与群のそれぞれ9%、50%、71%で、精巣上体が未発達であるか消失していた。精巣萎縮と、広範な生殖細胞の消失も認められた。尿道下裂がオスの低、中等量、高量投与群のそれぞれ3%、21%、43%に認められ、精巣が異常な位置にあたり消失していたのが、それぞれ3%、6%、29%に認められた。加えて、小さな精巣や精囊も認められ、一部では、前立腺と精囊が消失していた。DBPはアンドロゲン依存性のオスの生殖器の発生に特に障害をもたらしていると研究者らは結論づけ、DBPがエストロゲン様ではなく抗アンドロゲン様であることを示唆するものである。動物種によって代謝が非常に異なっているので、DBPの生殖毒性が、代謝産物によりメディエートしているものであるかを明らかにすることが重要であると研究者らは注意を喚起している。

器官形成の時期に暴露させたDBPの初期の研究(Ema et al. 1993)からは、生殖系の発生に対して選択的な作用があるというエビデンスは得られなかった。Foster (1997)は、発生のアウトカムに違いがあるのは、発生毒性研究(Ema et al. 1993)に、妊娠