

きた (Kavlock et al. 1996; Ankley et al. 1997)。HAA をスクリーニングする方法として生物学的な方法と化学機器分析を用いた方法がある。生物学的な方法では個々の化合物や薬品、環境サンプルの潜在的なホルモン活性をスクリーニングすることが可能である。エストロゲン活性の標準的な *in vivo*、*in vitro* のスクリーニング試験法については、多数の論評が発行されてきた (Reel et al. 1996; Zacharewski 1997)。この節では *in vivo*、*in vitro* の試験法について要約し、エストロゲン様物質の調査・査定における、試験法の利点と限界に焦点をあてる。

### In Vitro 試験法

HAA のレセプターを介したホルモン活性を測定するのに適した *in vitro* 試験法には、レセプター結合試験、細胞増殖試験、遺伝子発現試験、遺伝子産物試験などがある。これらの大半はエストロゲン活性を調べるために開発されてきたため、他のホルモン・レセプターの系についての試験法も開発する必要がある。*In vitro* の試験系は作業に要する時間が短く、低コストで行うことができ、大量のサンプルや化合物の相対的な活性の強さを迅速に見積もることが可能である。また *In vitro* 試験法は HAA がホルモン活性を有するメカニズムや、内分泌系の反応機構での相互作用を調べるのに優れたモデルである。

一方 *In Vitro* 試験法は生体内での状況を一部しか再現できないという点で限界を有する。つまり、薬物動態、生体内変換、化合物のキャリア蛋白への結合などは *In Vitro* 試験法では精確に表されないかもしれない。ただこのような欠点が部分的に改善され、生体内の状況をより精確に表す試験法も開発されている。また培養細胞の生物学的な特徴を用いた *in vitro* 試験法では細胞本来の表現型を維持することに細心の注意を払わなければならない (Laursen et al. 1990; Ruedl et al. 1990; Zugmaier et al. 1991; Wiese et al. 1992; Villalobos et al. 1995)。HAA をスクリーニングするために最もよく使われる *in vitro* の試験系の長所・短所を Table 11-1 に示す。試験法は HAA との反応形態によって区別した。1 種類の *in vitro* 試験法だけを用いて様々な HAA を同時にスクリーニングすることは不可能であろう。

#### レセプター結合試験

HAA がレセプターを介して直接作用を発揮するためには、HAA が対象であるレセプターのアゴニストもしくはアンタゴニストとして、そのレセプターに結合する必要がある (Clark and Mani 1994; Kramer and Giesy 1995)。レセプター結合試験は、化合物のレセプター結合性より、その化合物の内因性のリガンドとの相対的なリガンド活性を予測することができるであろう。このような理由により、レセプター結合試験は HAA と推定される物質のスクリーニングに用いられてきた (R. White et al. 1994; Kelce et al. 1995)。

様々なリガンドの相対的なレセプター結合性は、リガンド競合試験法によってこれまで決定されてきた。リガンド競合試験法とは、レセプターと、放射性物質でラベルされたレセプター結合能力の高い基準物質を、濃度を段階的に変化させた対象物質とともに混合し、レセプターと結合した基準物質を測定することにより、対象物質のレセプター結合性 ( $IC_{50}$ ) を求める方法である。 $IC_{50}$  とは対象物質が、最初全レセプターと結合していた基準物質のうち 50% と入れ換わるのに必要な濃度である。リガンド

競合試験法に用いられるレセプターは、様々な種のエストロゲン反応性を有する組織から取り出されてきた。エストロゲンレセプター結合試験のような *in vitro* 試験法はスクリーニング法として非常に有用であるが、レセプター結合性は必ずしもリガンド活性とは比例しない点、レセプター結合性が薬物動態や代謝効果を考慮せずに決定される点、アゴニストとアンタゴニストを見分けられるように設計されてこなかった点などの欠点も有している (Bitman et al. 1978; Bulger and Kupfer 1985; Kramer et al. 1997)。試験法の感度は、エストラジールの場合、 $EC_{50}$  が 300pM~1nM と高い (Wooge et al. 1992; Sato et al. 1995)。近年の研究では、異なった発現パターンを示すエストロゲンレセプター $\alpha$ ( $ER_{\alpha}$ )、エストロゲンレセプター $\beta$ ( $ER_{\beta}$ )の2種のレセプターが同定された (Kuiper et al. 1996; Mosselman et al. 1996)。 $ER_{\alpha}$  と  $ER_{\beta}$  の間には明らかな構造的違いが見られるが、Kuiper らはそれぞれのレセプターに対する、60種類のエストロゲン様物質の相対的なレセプター結合性を調べ、わずか2, 3物質のみ  $ER_{\alpha}$  と  $ER_{\beta}$  に対する結合性が大きく異なることを発見した。これら2種のレセプターが組織によって特有の発現をすることからも、2種のERが存在するということが、ERのアゴニストやアンタゴニストが組織に固有の作用を及ぼすにあたって重要な決定因子になっているのかもしれない。これは他のHAAsと結合するレセプターに関して、その異性体の存在は重要であることを示している。

#### 細胞増殖試験

標的器官の細胞増殖を促進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顕著な特徴であると考えられている (Hertz 1985)。従って、評価指標として細胞増殖能を測定する試験法はエストロゲン性を評価するのに信頼のおける試験法である。この試験法はMCF7やT47-Dなどのいくつかの人乳癌細胞由来株やラットの下垂体細胞などのエストロゲン反応性を有する器官由来の培養細胞株を用いて行われる。MCF7はエストロゲンのアゴニスト、アンタゴニストをスクリーニングするために広く使用されてきた (Welshons et al. 1990; Sato et al. 1991, 1992a, 1994; Sonnenschein et al. 1994, 1995)。MCF7は、エストロゲン依存性細胞増殖のような生存上不可欠な役割を担っているいくつかの遺伝子を制御しているERを発現している (Katzenellenbogen et al. 1984; Sato and Sonnenschein 1984)。MCF7は、エストラジオールの存在しない活性炭処理された血清を用いた培養液中では増殖能を失う。そこにエストロゲンを添加すると再び増殖能を有する。エストラジオールの $EC_{50}$ は10~15pM程度である (Sato et al. 1997)。これらの細胞を利用して得られる結果は、精確にエストロゲン性を予測できると考えられる (Andersen et al. 1999)。

#### 遺伝子発現試験

HAAsが、遺伝子レベルまたは蛋白レベルでレセプターを介した反応を起こすかどうか評価する試験法が、いくつかの細胞系においてHAAsのエストロゲン性、もしくは抗エストロゲン性を評価するために日々使われている。この試験系では遺伝子もしくは遺伝子産物として、プロゲステロンレセプター、pS2、アルカリフォスファターゼ、カプサイシンD、プロラクチン、ピテロゲニンなどが使用されてきた (Jordan et al. 1985; Littlefield et al. 1990; Adlercreutz et al. 1992; Jobling and Sampter 1993; Pelissero et al. 1993; Heppell et al. 1995; Sato et al. 1995)。これらの遺伝子もしくは遺伝子産物は、エストロゲン様物

質によって誘導されるが、標的器官や細胞によって誘導反応はまちまちであることが多く、複数の HAAs によって誘導される。

様々な哺乳動物の細胞に一時的に、または恒久的にホルモン反応性のプロモーターとレポーター遺伝子の複合物を組み込んだ試験系のアレイを開発するために、分子生物学の技術が広く使われてきた。また野生型や、異なったホルモンのレセプター、キメラのレセプターなども細胞に組み込むことが可能である (Pons et al. 1990; Gagne et al. 1994; Jausons-Loffreda et al. 1994; Makera et al. 1994; Jobling et al. 1995; Miksicek 1995; Ruh et al. 1995; Zacharewski et al. 1995; Ramamoorthy et al. 1997)。様々なプロモーター配列とレポーター遺伝子がこの試験法に用いられてきたが、2つ以上の ERE (Estrogen responsive element) がプロモーターとレポーター遺伝子の複合物に含まれる場合が、最も感受性が高くなる。野生型 ER を発現している細胞におけるエストロゲンに対する感受性は、AF-2 (Activation function 2)、AF-1 との相互作用や、他の核内蛋白と結合する ER のドメインに依存的である。ホルモンレセプターと核内のコアクチベーター、リプレッサー、他の蛋白との複合的な相互作用は、様々なレポーター遺伝子やそれに関わる遺伝子の発現に重要である (Katzenellenbogen et al. 1996)。また野生型 ER と異型 ER の機能が、ER のアゴニストやアンタゴニストに対して異なることが報告されており (McDonnell et al. 1995)、この試験法の技術を応用すれば、エストロゲン性の HAAs による影響の差違を説明することができそうである (Gould et al. 1998)。

多くの核内因子の影響を避けるために、キメラレセプターを用いた遺伝子発現試験も開発されてきた。例えば、Zacharewski らは酵母の遺伝子アクチベーター蛋白である Gal4 の DNA 結合ドメインに、ER リガンド結合ドメインを代わりに結び付け、Gal4 の DNA 結合ドメインのコピーや Gal4 に制御されるルシフェラーゼというレポーター遺伝子を含む、Gal4-HEGO キメラレセプターを用いた。これらのレセプターは、エストロゲンまたは抗エストロゲン性 HAAs を検出するために細胞に組み込まれて使用されてきた。組換え酵母を使用した試験系も、ホルモンレセプターのアゴニストを迅速に検出するために使用されてきた (Klein et al. 1994; Routledge and Sumpter 1996; Ramamoorthy et al. 1997)。HAAs の代謝活性化、不活性化に関わる様々な P450 酵素群をコードした遺伝子を同時に細胞に組込むと、これらの試験系がさらに有用になるであろう。

#### In vitro 試験法からの生体内影響の予測

In vitro 試験法は単純であるがために、有用性が縮められている。というのは生体内では各器官の様々な細胞間においてホルモンや成長因子、サイトカインなどの細胞外シグナル伝達物質によって情報伝達が行われているが、in vitro 試験法は単一の細胞系を用いているため、異なった細胞間の相互作用がなされず (Kao et al. 1996)、結果的には細胞がホルモンに反応する潜在性に影響を及ぼす。加えて、In vitro 試験法に用いられる細胞が化合物を代謝する能力を持っていなかったり、失ってしまっているかもしれない。生体内では、ホルモン作用を引き起こすために活性化される必要のある化合物や、代謝や会合、排出によって不活性化される化合物も存在する。大半の in vitro 試験法は、細胞増殖や遺伝子の発現などの細胞の反応を基本としている。歴史的にステロイドや甲状腺ホルモンの機能は、核内ステロイド結合蛋白が核内転写因子群を制御することで発揮され、ステロイドの影響は連鎖的なものだと

う遺伝子レベルでの理論を基にしていたが、最近の研究ではそのような理論では説明できない事象が示されている (Wehling 199)。例えば、*o,p'*-DDT は *in vitro* 試験法ではすぐにレセプターから離れる程度の弱い ER アゴニストとされたが (Soto et al. 1994)、野生生物に見られる *o,p'*-DDT のエストロゲン様作用は、*in vitro* 試験法の結果と一致するものではなかった (Fry et al. 1987; Fry 1995)。またリガンドに依存しない、チロシンキナーゼ経路を介した ER の活性化 (Kato et al. 1995) やステロイドホルモンの mRNA が転写される前段階での制御に関わっているとの報告もされている (Haddock and Malbon 1991; Martin et al. 1994)。HAAs が *in vitro* と *in vivo* で異なった活性を示す原因として、エストロゲンが細胞質中の蛋白と結合する程度の違いがあげられる。例えば、*o,p'*-DDT は、エストロゲン結合性蛋白とほとんど結合しない (Skalsky and Guthrie 1978) ので、エストラジオールと比べて、生体内ではフリーな状態で存在する (Nagel et al. 1998)。

よって、*in vitro* 試験法は生体内の状況を模倣するには限界があり、またホルモン作用の詳細なメカニズムはまだ解明されていないことより、個々の *in vitro* 試験の結果から生体内での影響を予測することは必ずしも可能であるとは限らない。従って、*in vitro* 試験法は、異なった作用メカニズムを用いた試験法を組み合わせるべきだ。

#### In vivo 試験法

げっ歯類を用いたエストロゲン反応性試験は、化合物や抽出物の大規模なスクリーニングを行うには限界があるにもかかわらず、重要な試験法である。In vivo 試験法は臓器重量、細胞分化、蛋白および遺伝子の発現、酵素活性などを評価指標とする (Lan and Katzenellenbogen 1976; Lyttle and DeSombre 1977; Dix and Jordan 1980; Cooper et al. 1992; Branham et al. 1993; Medlock et al. 1994; Sheehan et al. 1994; Heppell et al. 1995; Sampter and Jobling 1995; Teng 1995)。様々な *in vivo* 試験法の長所と短所を、以下で論議する。

生殖や発育に影響を及ぼす HAAs を検出するために、*in vivo* 試験法では、吸収、代謝、排泄などの薬物動態機能を持ち合わせた、完全な生物システムが使用される。さらに生理学的に適切な種類の内因性ホルモンや、ホルモン結合性蛋白、その他の因子が、適切な濃度で存在するという条件下で試験は行われる。また、*in vitro* 試験では存在しない修復、免疫機構が *in vivo* 試験法では存在する。よって *in vivo* 試験法の結果は、野生生物や人間に対する影響評価の基礎データとして適切である。

多くの試験法が、標準化され認められているが、いくつかの方法が公式なガイドラインとして出版されている (EPA 1996; OECD 1997)。とくに HAAs に関する標準化された方法は 2 世代繁殖、発育毒性、準慢性毒性、慢性毒性をみるものである (Stevens et al. 1997)。これらの試験法は毒性メカニズムの解明よりも、生殖機能、発育機能への有害な影響を感知することを主眼において開発されている。

In vivo 試験法では評価指標として、生殖能力、胎児のサイズ、重量、生存能力、子の発育を含む、複数世代間の生殖に関するデータが用いられる。これらの指標のすべてが HAAs の曝露によって影響を受けうる。また、月経周期や生殖器官重量、生殖腺の形態、付属生殖器官重量、精子数、肛門と性器の距離などの、他の評価指標も HAAs の影響を受けうるが、影響による変化はある特定のホルモンや内分泌系の影響であると特定できるほどではない。

## ホルモン特性試験

ホルモン特性試験は、化学物質による影響が有害であるかどうかはともかく、エストロゲン性のようなある特定のホルモンメカニズムを介して作用するかどうかを決めるものである。試験は化学物質がホルモンレセプターのアゴニストであるか、アンタゴニストであるかを定めるために用いられる。生殖系の反応を測定する、哺乳動物のエストロゲン生物試験は Table 11-2 に要約されている。これらの試験はげっ歯類の膣や子宮の組織を使用するが、感度が良く、再現性があり、様々な HAAs のエストロゲン性を比較するのに適切である。また一般的に未成熟であったり、卵巣を切除された動物を使用することで、内因性のエストロゲンを除去または減少させ、外因性の物質によって引き起こされた反応と、内因性のエストロゲンによる反応とを混同しないようにしている。エストロゲン作用を測定する項目は、膣の上皮角化、膣の上皮細胞の増殖、テトラゾリウムの減少、膣の開腔、膣の肥大性反応、子宮の吸水膨潤、子宮の肥大性反応、子宮のグリコーゲンの沈着、子宮のエストロゲン投与による出血などである。

膣の上皮角化試験 (Allen and Doisy 1923) ではエストロゲンのアゴニストによって曝露後 48 から 72 時間後以内に膣上皮細胞の形態が、立方体から層に重なった柱状や、角質化したうろこ状へと変化する。膣の角質化や上皮角化は化合物のエストロゲン性を決定するために用いられる最も特徴的な評価指標である (Edgren 1994)。加えて上皮角化試験は膣の標本を顕微鏡で観察するだけで行うことができる。膣の開腔はエストロゲン性の反応であり、発育期の評価指標である。誕生時には、ラットの膣の外部は堅く閉ざされているが、最初の発情期前や、排卵のおよそ 5 日前には膣の内腔が開く。この現象は、エストラジオールや他のエストロゲンによって平均 30 日から 40 日早められうる (Edgren et al. 1966)。この評価指標が多世代繁殖試験に加えられるように提案されてきた (EPA 1996)。子宮の吸水膨潤 (Astwood 1938) は 6 時間程度とすばやい反応であるが、ランク付けできる反応ではなかった。従って、この試験法ではエストロゲンが短時間作用するのか、長時間作用するのか見分けがつかない。

子宮肥大性試験は、一般的に動物に 3~4 日化合物を摂取させて、子宮の成長を測定する (Bulbring and Burn 1935; Dorfman and Dorfman 1954; Edgren et al. 1966)。エストリオールのような作用時間の短いエストロゲンはジエチルスチルベステロール (DES) やエストラジオール、エストロンのような作用時間の長いエストロゲンとは異なった用量-作用曲線を描く。重量増加は測定によって、細胞増殖、肥大は組織変化によって確認される。膣と子宮の臓器重量は比較の対象となるが、子宮肥大性は定量的な評価指標としてはあまり使用されない (Folman and Pope 1966)。というのは膣を摘出し重量を測定するのは、子宮に比べてより難しいからである。エストロゲンはまた生殖系の反応を刺激する。例えば、エストロゲンは投与から 6 時間以内に子宮のグリコーゲン濃度を高め、単独投与した場合、24~48 時間後には最高濃度に達する (Galand et al. 1987)。

## 化学物質の曝露、影響を感知するバイオマーカー

野生生物や人間に対する HAAs の曝露を監視するために、広く用いられてきた、もしくは用いられるバイオマーカーが、いくつか存在する。それらには、生存数の変化、第二次性徴の変化、細胞質内ステロイドホルモンの濃度変化、生体外反応、酵素活性の変化、内分泌系の組織構造の変化、ピテ

ロゲニン反応、放射帯タンパク (Zona-radiata-protein) 反応などがある。

### 生存数の変化と第二性徴の変化

HAAの曝露による影響を感知するために広く使われている、特定の評価指標は存在しない。というのは、生物は絶え間なく多くの化学物質に曝露されるので、多くの場合原因物質または物質群を特定することは難しいからである (Ludwig et al.)。曝露を感知するバイオマーカーは、組織構造や生存数への影響が観察される前に変化するので、初期段階で曝露の警告を発することが可能である。しかし、不幸にも多くのバイオマーカーは、ある特定の化合物もしくは化合物群に対してのみ有効である。

野生生物の調査では段階的なアプローチがとられる。一般的には、生存数変化が調査され、もし生存数が順調に推移していれば、生物は健全であると推論される。もし有害な影響が見られれば、原因物質特定のため、生物学的な技術と化学機器分析が駆使される (Giesy et al. 1994a)。

哺乳類以外の脊椎動物については、多くの種について内分泌機能の仕組みが一部しか解明されていないので、HAAによる潜在的な影響を感知するのは難しい。そこで、研究室での実験や野外でのHAAの曝露調査には、代替種を用いる。一方、第二性徴は性ステロイドホルモンに影響を与える化学物質の曝露を感知できるバイオマーカーとして提案されてきた。このマーカーは、魚類、爬虫類などの変温動物に最適である。マーカーは、具体的には生殖器官のサイズ、形態であり、オスの魚の研究 (Howell et al. 1980) やワニの研究 (Guillette et al. 1995b) に用いられている。

第二性徴は北米産のコイ科の fathead minnow のようにある種の動物に顕著に顕れる。fathead minnow のオスは、黒色で体型がメスと大きく異なる。加えてオスの頭頂部には脂肪のふくらみがあり、前頭部には隆起がある。これらの特徴はエストロゲン (エストラジオール) の曝露によって失われる。オスに 2 nM のエストラジオールを 5 週間曝露したところ、隆起と脂肪のふくらみは消滅した (Miles-Richardson et al. in press)。第二性徴の変化を引き起こす曝露濃度は組織構造に影響を与える濃度と同等であり、生殖能力の明らかな減衰に要する濃度よりも低いので、第二性徴はいくつかのHAAの曝露を示すマーカーとして使用できる。

HAAの曝露による第二性徴への有害な影響は、哺乳類 (Facemire et al. 1995) や、魚類 (Bortone and Davis 1994; Purdom et al. 1994; Harris et al. 1996)、鳥類 (Fry and Toone 1981; Fry et al. 1987)、両生類 (Hayes 1997)、爬虫類 (Guillette et al. 1994) でも見られる。それらはメスのオス化、オスのメス化、奇形、行動異常 (Colborn and Clement 1992; Giesy et al. 1994b) などが含まれる。5章にこれらの研究の詳細が掲載されている。

主として環境中のエストロゲンの曝露によって魚類の生殖腺が間性化している (5章参照)。英国では下水処理場付近に生息しているローチ (コイの1種) が、比較的高い割合で、オスとメスの特徴を併せ持つ間性状態になっているのが観察されてきた。ヴィテロゲニンがオスのローチでも誘導されていることから、生殖腺の組織構造の変化が環境中のエストロゲンの作用であると考えられた。続いて虹鱗をかごに入れて、下水処理場付近に設置した実験では、影響を引き起こした原因物質が環境中のエストロゲンであることを示した (Jobling et al. 1996)。さらに原因物質となったエストロゲンについて具体的には、家庭排水由来のステロイドエストロゲンや工業排水由来のアルキルフェノールエト

キシレートが考えられている (R. White et al. 1994; Jobling et al. 1995; Nimrod and Benson 1996)。

### 組織構造と生化学的反応

動物への HAA の曝露は組織構造の異常な変化を引き起こしうる。例えば、fathead minnow に 2 nM のエストラジオールを曝露させると、輸精管に見られる弱い生殖行動、セルトリ細胞の肥大、過形成、精子の減少、など生殖障害現象に関わる組織及び、原形質の変化が見られる (Miles-Richardson et al. in press)。同研究の中でメスでは、卵母細胞の相対的な割合が、多くは細胞に、わずかに graffian 細胞に変化した。これらの組織構造への影響は、ヴィテロゲニンの誘導や、排卵数の減少を引き起こす濃度より低い濃度の曝露によって観察された。

血液中のステロイドホルモン濃度もまた HAA の曝露を警告しうる。ステロイド生成に関わる酵素の誘導や阻害によっても曝露の事実がわかるし、ある時期に卵が HAA に曝露されれば、子のステロイド生成に異常がおこる (Guillette et al. 1994)。

ヴィテロゲニンはエストロゲンの産生刺激によって肝臓で合成される卵黄の前駆物質である。魚、鳥、ワニなど卵生動物に見られる (Korsgaard and Petersen 1979)。ヴィテロゲニンの例は、種間によって蛋白構造が違っても、他の類似した蛋白にマーカーとしての機能を適用できることを示す。

ヴィテロゲニンは ER に制御され、血漿サンプルからたやすく検知し定量できるのでエストロゲン物質の曝露に対するバイオマーカーとして優れている。メスの魚では、外因性エストロゲン (アゴニスト) の血漿中ヴィテロゲニンへの影響は非常に小さいが、オスの魚ではヴィテロゲニンの濃度は検出下限値以下と非常に低く、環境中のエストロゲンの曝露により、オスの魚の血漿中にヴィテロゲニンが産生されることが示されてきた (Jobling et al. 1995)。ヴィテロゲニンの産生が有害な影響を与えるかどうかは分からないが、血漿中のヴィテロゲニン濃度は曝露に対するバイオマーカーとして使用できる。

すくなくとも 1 つの研究において、生殖能力と血清中のヴィテロゲニン濃度との関係が示された (Kramar et al. 1997)。その関係とは、オスの魚でヴィテロゲニンの誘導は魚をつがいにして飼育したとき生産される生きた卵の数に反比例するということである。

ノニルフェノールや石油精製工場からの流出水を用いた実験から、Zona-radiata-protein 反応はエストロゲン性 HAA の曝露を感知するのに、ヴィテロゲニン反応と同程度に感度が良いことを示すいくつかの証拠が得られ (Arukwe et al. 1997)、また子孫の生存・選別などの生存数に関わる指標はより直接に影響を受けるので、Zona-radiata-protein 反応のほうがより優れたバイオマーカーであるかもしれない。しかし外因性エストロゲンの低濃度での長期間の曝露実験を通して、Zona-radiata-protein 反応のバイオマーカーとしての利点を評価していく必要がある。

### 化学機器分析技術

ホルモン活性化合物は環境中のいたるところに存在するが、野生生物や人への曝露の媒介を主にするのが、水と食糧である。既知の HAA の存在は、特定可能な化合物の濃度を直接測定して同定される場合や、潜在的な HAA をスクリーニングすることによって同定する場合がある。化合物の Reference

Dose (RfD) が設定されている場合には、有害な影響が予測されるかどうかを決定するために、危険度 (Hazard quotient; HQ) が計算される。HQ は測定濃度に対する RfD の割合である。RfD は組織に固有であり、適切な変換係数を用いることによって、非生物状態のマトリックス中濃度と関係付けられる。

その他の場合では、スクリーニング法と機器分析を併用することを、バイオアッセイを用いた分画・同定や、毒性物質の同定・評価 (Toxicant Identification and Evaluation; TIE) に適用することができる。このプロセスは、分画をとり、各分画を試験することの繰り返しである。具体的には、対象の生物または非生物マトリックスを極性や分子サイズによって分画し、各分画にホルモン活性がないか試験する。陽性の分画はさらに蛍光・UV 検出器を備えた HPLC や、電子捕獲分析器 (ECD)、炎光イオン化分析、あるいは質量分析計を備えたガスクロマトグラフィーのような機器を用いて分画する。活性のある分画中のエストロゲン様物質の構造が決定されるまでこれらの方法を、繰り返し行う。サンプル中の物質の質量を測定するために Reference Standard が用いられ、比較活性率 (Relative potency factors; RPFs) が導出される。さらにサンプル中の化合物のモル濃度を RPFs に掛けて、総活性当量が決められる。そこで推定された活性当量と実測の活性当量の収支を比較し、もし値が等しくないならば、異性体の活性当量を加えたり、ある化合物の活性当量を差し引いたりして、相互作用の存在や欠如、未確認物質の存在を確かめる。この操作をすべての活性を有する化合物が同定されるまで繰り返す。通常化合物の同定は複数の機器分析によってなされる。血漿中の内因性及び外因性ホルモンの相対的な活性を個々に調べるために、類似した方法が提案されている (Sonnenschein et al. 1995; Sato et al. 1997)。

#### 要約と結論

HAAs の曝露を検知、監視する一般的かつ有効な方法は存在していない。これは主に、内分泌系が複雑であるためである。一つの検知もしくは監視法だけに頼ると、リスク評価過程において不確実性が増し、不適切もしくは恣意的な安全係数の使用を助長する結果となり、間違った陽性や陰性の結果を導く (Patlak 1996)。そこで、異なった作用メカニズムを基にした、活性化・不活性化・その他の因子の影響も考慮して設計された試験法を組み合わせることに努力しなければいけない (Shedlby et al. 1996)。そのような組み合わせを考える際に、どのような作用メカニズムが含まれているのか、また試験法の感度、正確性も考慮されるべきである。どのような場合でも、ホルモン活性のない化合物でも生殖機能やその他の生物の機能を攪乱しうることを覚えておくべきである。

#### 勧告

HAAs を検知・監視することに関する利用可能なデータを評価する基準として、当委員会は以下の事項を勧告する。

- 短期間で行える試験の組み合わせを、HAAs と推定されている物質の迅速かつ安価なスクリーニング法として開発すべきである。試験法はホルモンレセプター依存的な様々な反応や、間接的な反応も検出でき、多くの研究室で使用できるように、簡単に適応できるものでなければならない。



- 短期間の試験は有効かつ反応性に富み、合理的な様式で設計されるべきである。また短期間の試験から生体内の毒性を予測できるかどうか調査されるべきである。
- 野生生物や人間が HAA s に曝露されていることを感知するいくつかのバイオマーカーは利用可能であり、適用されるべきである。さらなるバイオマーカーが開発され適用前にその価値を見定められなければならないべきである。とくに胚や胎児の段階でスクリーニング可能で、長期間続いたり、時間が経過して現れる影響などを予測できる試験法が開発されるべきである。
- 環境中の HAA s の曝露によって現れる種や組織固有の影響はさらに研究されるべきである。
- 遺伝子が刷り込まれる発育の決定的な時期に曝露されることによる影響を念頭において、成人と発育段階の胎児の HAA s に対する感受性の違いが調査されるべきである。
- 野生生物は環境の番人である。HAA s に曝露されたと知られている個体群について曝露による明らかな影響もわずかな影響も監視すべきである。おりに入れられ束縛されたり、遠隔計測器をとりつけられた動物は曝露された場所・時間・規模についての情報を与える。その情報を、野外調査の結果を解析するために使用できる。
- 様々な HAA s のすでに認識されている作用についての用量作用関係は、環境中濃度を用いた *in vitro*、*in vivo* の研究によってさらに調査されるべきである。

付録 3-B 翻訳

本訳は抄訳であり体裁は必ずしも統一していない

## Reproductive and Developmental Toxicology

Edited by K.S.Korach.  
Marcel Dekker, New York, 1998.

生殖発生毒性

訳/要約  
江馬 眞  
関澤 純  
堤 治

# Reproductive and Developmental Toxicology

## 生殖発生毒性

目次	頁
1. ミュラー管抑制物質の活動と正常な雄性決定	1
2. 早期発生に対する環境化学物質の影響	13
1 3. 植物エストロゲンと生殖医学	29
1 4. 人の健康とフィトエストロゲン	50
1 8. TCDD とその関連物質の抗エストロゲン活性	121

## 1章 ミュラー管抑制物質の活動と正常な雄性決定

David T. MacLaughlin and Patricia K. Donahoe

### はじめに

哺乳動物の生殖道が正常に発生するには、多数の特定の分子イベントが、特定の胎生期に順序よく生じなければならないことはよく分かっている。まだ性分化していない胚の生殖隆線には、雄性と雌性の生殖路原基のウォルフ管とミュラー管の両方があるので、染色体もしくは遺伝的性決定には、適切な性の生殖路の発達が刺激され、もう一方が退化することが含まれていなければならない。この性決定のプログラムから大きく逸脱してしまうと、雄性や雌性での生殖路の構成が異常なものとなり、新生仔（児）に様々な程度の性器形成不全が生じることになる。

1940年代終わりの先駆的研究の結果、Alfred Jost 教授は、胎児の精巣が、雌性生殖路の原基であるミュラー管の退化に関与する非ステロイド因子を産生するという仮説を検証した (Jost, 1947)。ウサギの胎児での生殖路の発生に対する性腺のコントロールに関する彼の研究によって、テストステロンが正常な雄の表現型発生の早期に二重の役割をしている、というその当時の考え（すなわち、テストステロンは、ウォルフ管の発生は促進するが、同時にミュラー管の成長もブロックする）が根本的に変わることとなった。Jost 教授は、前者の考えは妥当であることを明確に証明したが、後者の考えを否定した。このことによって、同時に、精巣性女性化の臨床症候群の部分的な説明ともなった。

現在では、われわれは、雄の表現型を生じる正常なプロセスには、2つの能動的な機序が必要であり、両方とも精巣の分化に依存していると理解している。性腺を摘出したウサギ胎仔実験モデルを用いて、Jost は、新たに形成された精巣で合成され、放出されるテストステロンが、ウォルフ管の発生を刺激して、成熟して精巣上体、精管、ならびに精細管になることを示した。同時に、彼が“ミュラー管抑制物質”と名付けた精巣の非ステロイ

ド成分が、子宮、ファローピウス管、子宮頸、ならびに膣の上部 1/3 の前駆体であるミュラー管を退化させる。アンドロゲンの作用だけでは、この発生上のホールマークを達成するには不十分である。性腺を摘出した胎仔にテストステロン結晶を投与した試験では、ミュラー管の構造が保持された新生仔が生じるからである。この最初の観察結果が発表されてから 30 年以上経過して、数名の研究者が、この化合物は胎児、新生仔、ならびに成体の精巢 (Donaho et al., 1977b) のセルトリ細胞から産生される (Blanchard and Josso, 1974) 分子量 140 kDa の糖タンパクホモダイマーであると同定した (Picard et al., 1978; Swann et al., 1979; Budzik et al., 1983; Donahoe et al., 1984; Picard and Josso, 1984)。現在では、ミュラー管抑制物質 (MIS) あるいは抗ミュラー管ホルモン (AMH) と呼ばれているこのタンパクの遺伝子が様々な哺乳動物種でクローニングされており (Cate et al., 1986a; Picard et al., 1986; Münsterberg and Lovell-Badge, 1991; Haqq et al., 1992)、この物質の分子的作用機序を明らかにするための研究が多く行われてきた。最近 MIS の受容体の候補となるタイプ I、ならびにタイプ II 受容体が、ウサギ (di Clemente et al., 1994)、ヒト (Imbeaud et al., 1995) ならびにラット (He et al., 1993; Baarends et al., 1994; Teixeira et al., 1996) からクローニングされ、従って、この天然の増殖抑制物質の作用を調べる、という非常に興味深い時代が始まることとなった。特異的 MIS 受容体プローブを用いて、MIS に組織特異性があり、毒性のない、ミュラー前駆体から生じる腫瘍の治療薬である (Cate et al., 1986b) という、多数の *in vitro* および *in vivo* のデータ (Donahoe et al., 1979, 1981, 1984; Fuller et al., 1982, 1985; Chin et al., 1991; Parry et al., 1992; Boveri et al., 1993) から諸自他仮説を検証することも今後可能となろう。

初期の研究者は、MIS は雄に特異的なタンパクであると考えていたが、後の研究で、卵巣の顆粒膜細胞がタンパクを産生することが示された (Vigier et al., 1984; Takahashi et al., 1986a, b; Ueno et al., 1988, 1989a, b; Seifer et al., 1993; Hirobe et al., 1994)。

さらに、雌の MIS は、卵母細胞の成熟の調節因子の一つであり (Takahashi et al., 1986b; Ueno et al., 1988)、少なくとも *in vitro* では MIS が顆粒膜細胞の分裂とプロゲステロン合成を抑制する (Hirobe et al., 1992; Kum et al., 1992) ことを示す証拠がある。胎児でミューラー管以外の MIS 作用のもう一つの標的があることが Catlin らの研究によって示唆されている。彼らは、発生期の肺での界面活性物質産生を MIS が阻害することを示し (Catlin et al., 1988, 1991)、未熟児での呼吸窮迫が雄性に多いことの説明となる可能性がある (Catlin et al., 1992)。

MIS の活性に関して現在解明されていることのまとめを以下に行い、可能な限り、臨床との関連性を強調することにする。

#### ミューラー管抑制物質のタンパク構造

Massachusetts General Hospital のわれわれの研究室とパリの *Enfant Malade* での実験で、ウシの精巣から、われわれのグループはミューラー管抑制物質 (Müllerian inhibiting substance: MIS) と呼んでおり (Donahoe et al., 1977a,b; Swann et al., 1979; Budzik et al., 1983)、パリの研究者は抗ミューラー管ホルモン (anti-Müllerian hormone: AMH) と呼んでいる (Blanchard and Josso, 1974; Picard et al., 1978; Picard and Josso, 1984)、140 kDa の糖タンパク s-s 結合ホモダイマーを同定することに成功した。このタンパクは胎児の新しく形成された精巣のセルトリ細胞から分泌されており (Hayashi et al., 1984)、Picon (1969) の最初のアッセイ法に基づいてそれぞれのグループが開発したエレガントなラット胎児尿生殖隆線 *in vitro* バイオアッセイ法 (Donahoe et al., 1977a) で測定して、正常雄の胚で、ミューラー管を退化させる。

その後、ウシ (Cate et al., 1986a)、マウス (Münsterberg and Lovell-Badge, 1991) ならびにラットの cDNA (Haqq et al., 1992) および、ヒトのゲノム配列が同定されクローニングされた (Cate et al., 1986a)。得られたアミノ酸配列から、このタンパクが2つの構

造的領域、すなわち、動物種でのホモロジーの程度がおよそ 70%であるアミノ末端領域と、プラスミンを用いて蛋白分解処理で生じさせることのできる、ほぼ変化のない 108 個のアミノ酸残基からなるカルボキシル末端領域に分けられることがわかった (Repinsky et al., 1988)。最近の研究では、ヒト組み替え MIS の生理活性は、カルボキシル末端のダイマーにあることが示されている (MacLaughlin et al., 1992a)。アミノ末端領域には、2 つの N-リンクグリコシル化 (糖鎖形成) のコンセンサス領域が見つかっており、MIS の糖質側鎖の構造については、まだ解明されていないが、タンパクの全分子量の 15%近くを占めていることが知られている。単離した MIS のカルボキシル末端が、*in vitro* でミューラー管を完全に退化させるので (MacLaughlin et al., 1992a)、アミノ末端は、生理活性に絶対的に必要ではない。しかし、アミノ末端がカルボキシル末端の活性を増強させることができ、生理活性を有する領域のコンフォメーション (整合) あるいは生理活性を維持するのに一定の役割を果たしていることが示唆される (Wilson et al., 1993)。生理活性を示すには MIS が開裂することが重要であることは、MIS 分子が突然変異を作成することで確認された。位置指定突然変異誘発法を用いて、塩基性開裂部位のアルギニンをスレオニン残基と置換することで、開裂しない組み替えヒトタンパクの分子を作成した (Cate et al., 1990)。得られたタンパクは、標準の MIS バイオアッセイ法で活性を示さず (Cate et al., 1990)、*in vitro* 抗増殖試験でも活性を示さなかった (Boveri et al., 1993)。逆に、既存の ARG-SER 配列の代わりに、二塩基 ARG-ARG サイトを作ることで蛋白分解開裂の効率を高めてやると、MIS 活性が増加した (Kurian et al., 1995)。*in vivo* での MIS の生理活性を生じさせるプロテアーゼについてはまだ同定されていないし、開裂部位も明らかになっていない。十分考えられることは、最初に酵母から精製された Kex ファミリーの酵素の生合成プロテアーゼ (Leibowitz and Wickner, 1976) であり、精巣内に存在していることが示されており (Seidah et al., 1992; Torii et al., 1993)、MIS 開裂に必要な基質特異性を有している生合成プロテアーゼにより、精巣内あるいは卵巣内で生じているということである。これ

らのタンパクは、pro-hormone convertase (プロホルモン (ホルモンの腺内前駆体) 転換酵素) と呼ばれており、多くの *in vitro* 条件下で、トランスホーミング増殖因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ファミリー (Dubois et al., 1995) や、同様の 1 塩基もしくは 2 塩基開裂部位を有する同様のタンパク (Oda et al., 1992; Yanagita et al., 1992; Alacron et al., 1994; Bravo et al., 1994; Liu et al., 1995) を開裂させ、従って活性化させることが示されている。

MIS は、25 アミノ酸残基によるリーダー配列と一緒に合成され、そのうちの最初の 2/3 がシグナルペプチドを構成しており、開裂されると、MIS の前駆配列が生じる。今回のデータは、MIS がセルトリ細胞や顆粒膜細胞の貯蔵されているのではなく、構成的機序によって分泌されるものであることを示唆している。

MIS の一次構造を明らかにすることで、他のタンパクとの比較を行うことが可能となり、TGF- $\beta$  ファミリーのメンバー (Cate et al., 1986a)、とりわけ、成熟 TGF- $\beta$  のカルボキシル末端領域 (Massague, 1990) と有意な配列のホモロジーがあることが明らかになった。TGF- $\beta$  ファミリーの全てのタンパクの目立った特徴は、7 個ないし 9 個のシステインからなる順序だった配列があること、ならびに、塩基性蛋白分解開裂を行うコンセンサス部位が存在し、アミノ末端とカルボキシル末端とを隔てていることである (Sha et al., 1989)。2 つのグループ (Daopin et al., 1992; Schlunegger and Grutter, 1993) による TGF- $\beta$  のカルボキシル末端の X 線結晶解析や、最近では OP-1 (Griddith et al., 1994) による X 線結晶解析で、システイン残基が、腫瘍壊死因子 (TNF) (Banner et al., 1993) ならびに hCG (Lapthorn et al., 1994) と同様に鎖内 s-s 結合の“結び目 (ノット)”を形成していることが明確に示された。1 本の鎖内 s-s 結合は、二量体の生理活性のあるカルボキシル末端と一緒に保っている。MIS の結晶構造については、まだ解明されていないが、TGF- $\beta$  とのホモロジーに基づくコンフォメーションの予測からは、同様の三次元構造であることが示唆される。



## MIS の遺伝子構造

新生仔の精巣からのウシ MIS 分子の精製は、従来の生化学的方法 (Budzik et al., 1983; Picard and Josso, 1984) と免疫親和性法 (Shima et al., 1984; Cate et al., 1986a; Ragin et al., 1992) を組み合わせて達成された。精製したタンパクをトリプシンで分解して生じた断片の配列解析を行って、MIS mRNA の cDNA ライブラリーをスクリーニングをするのに必要なオリゴヌクレオチドプローブを作るのに必要な情報が得られた (Cate et al., 1986a)。10 年以上前に行われたこのような実験によって、ウシならびにヒトの cDNA のクローニングが行われ、MIS のヒトゲノム解析が進み、現在の研究で使われている組み替えタンパクを産生するための CHO 細胞へのトランスフェクションが実現した。ラットマウスならびにヒトの遺伝子は、前者は第 10 染色体に存在していることが判明し (King et al., 1991)、後者は第 19 染色体に位置しており (Cohen-Haguenaer et al., 1987)、それぞれ、5 個のエキソンと 4 つのイントロンを含み、イントロンとエキソンの両方で GC を多く含んでいる (65-75%)。ヒトならびにウシの遺伝子の 5' の翻訳されない pro-region は、長さ 10 塩基であり、poly A 領域よりも遠位の 3' UTR は長さ 30 塩基である。このようにして配列決定された遺伝子の中で、ヒトの遺伝子だけが、転写開始部位の 5' に TATA ボックスを欠いていた。

## 性的二相性の MIS 遺伝子の活性化と発現

MIS が精巣分化の時期に雄の胚で産生され、それによって、後にミューラー管の退化が生じることは理解されていたが、ミューラー管の退化後にも MIS が産生され続けるとは、誰も予想していなかったであろう。生物学的アッセイ、免疫組織化学的アッセイ、定量的免疫アッセイやノーザンブロット解析、in situ ハイブリダイゼーションアッセイで、生後十分時間が経過したり、成体のラット、およびヒトで MIS が合成され、分泌され、血液中で測定可能であることが確認されている (Necklaws et al., 1987; Hudson et al., 1990; Baker

et al., 1990; Josso et al., 1990; Lee et al., 1996)。雄性での出生後の MIS 活性の役割については、まだ分かっていない。特に、最近の MIS ノックアウトマウスを用いた研究で、ノックアウトマウスではミュラー管が残存しているが(Behringer et al., 1994)、他の異常は、あまりはっきりしないことが示されている。ライディヒ細胞過形成や希な腫瘍が生じることも見つかっており、この表現型は、MIS とインヒビンのダブルノックアウトで増強され、これらのタンパク因子が両方ともライディヒ細胞の抑制機能を有することを示唆している。思春期前後の時期まで血清中の MIS レベルが有意に下降せず、この時期は、精子発生の再開時期と一致していることは、MIS が精子発生の抑制物質であることを示唆している。

間接的エビデンスからは、胚の中で MIS は、精巣の発生に関与しており、単なるミュラー管の縮退因子ではないことが示される。Taketo et al. (1991, 1993)は、性腺性転換の遺伝マウスモデルを解析して、これらの動物での卵巣精巣では、中心精巣組織で発現される MIS が、原生殖細胞の減数分裂の停止と一致しており、より極性の高い卵巣構造では、MIS 発現の消失が、原生殖細胞発生の進展と、最後に生殖細胞プールの消失と一致することを示した。従って、精巣では、未成熟の卵巣ですでに認められたように(Takahashi et al., 1986a, b; Ueno et al., 1988, 1989a, b)保護的な生殖細胞の停止を生じるものと思われる。

雌性で生後に MIS が産生されることは、現在では疑いがない(Vigier et al., 1984; Takahashi et al., 1986a, b; Ueno et al., 1988, 1989a, b; Seifer et al., 1993; Hirobe et al., 1994; Lee et al., 1996)。ヒトでは、3、4歳までは、正常な女性の血清中に非常に低レベルで検出できるが、その後は思春期を過ぎるまでルーチン的には検出されない(Lee et al., 1996)。MIS が胎児発生中に雌性で一定の役割を果たし得るとするのは目的論的である。ミュラー管の退化は、種の生殖を支持するものではなく、成体雌で MIS が機能している可能性について、未成熟のラットから収穫した卵母細胞で明らかにされた。卵丘を外した、あるいは卵丘で包んだ卵母細胞の培養標本に MIS を添加すると、

卵母細胞を減数分裂停止状態を保持することで、未成熟な卵核胞の破裂を可逆的に抑制した(Takahashi et al., 1986a,b; Ueno et al., 1988, 1989a,b)。

ヒト特異性 MIS 血清アッセイ法が開発されたことによって(Hudson et al., 1990; Baker et al., 1990; Josso et al., 1990; Lee et al., 1996)、MIS 遺伝子の性的二相性の発現を記録することが可能となった。雄性での MIS のレベルは、実際に、生後 18 カ月までの間に有意に上昇する。このことは、母体の内分泌の影響により放出されることを示唆している。その後 MIS レベルは、一貫して高くなっており、雄性が思春期に到達してテストステロン産生が増加すると MIS レベルは基底レベルまで低下する。MIS 産生をダウンレギュレートしている因子については今後明らかにする必要がある。雌では、生後十分経過しないと顆粒膜細胞が MIS を産生せず、その後思春期までに血清レベルが雄と同様のレベルに達する。新生児期に雄性と雌性では MIS 産生に違いがあるので、新生児の半陰陽異常の管理に血清 MIS レベルの測定は有用である(Gustafson et al., 1993)。成体では、血清 MIS レベルが顆粒膜細胞ならびに性索腫瘍の重要な細胞型特異的なマーカーであることが明らかになる。

MIS が雌性だけでなく雄性でも産生されていること、ならびに MIS 遺伝子が X、Y 染色体ではなく常染色体の上に位置しているという知見は、雌での MIS の役割や、遺伝子がどのように制御されているのかについて興味深い疑問を生じるものである。われわれの研究では、MIS 遺伝子に特異的な転写因子や、cis-採用エレメントを同定することに焦点を絞ってきた。

MIS 遺伝子のプロモーター領域には、最初の 300 塩基対の中に、遺伝的に保存されてきた領域がいくつかある。snRNA 遺伝子のポリアデニル化領域 SPA 62 が、MIS 開始部位の-300 ないし-400 に見つかっているので(Hacker et al., 1995)、ほとんどのプロモーター制御が、スタート部位のすぐ常習であるこの 300 塩基対の領域に存在している可能性が高い。われわれが最初に M1 と呼んだ、進化的に保存性の高い領域に GATA を含むモチーフがあ

った。同様に保存されている M2 領域には、ステロイドホルモン応答エレメントの関係のある多数のハーフサイトがあり、短縮された SF1 と結合する (Shen et al., 1994)。SRY の HMG ボックスが足跡をこの領域に残しているため SRYe と呼ばれている領域が MIS の発現の制御に直接関与しているものと思われる (Haqq et al., 1993)。発生的には、これは意味のあることである、尿生殖隆線の発生の初期には、SRY と MIS の発現が重なっており、MIS は、分化した精巣で産生される初期のタンパクであるからである。ヒト SRY と MIS 遺伝子のプロモーター領域と一緒にトランスフェクトさせると遺伝子制御経路が活性化され、MIS の発現を招くことが示されている (Haqq et al., 1994)。加えて、ヒトの性転換に関連した突然変異を含む SRY コンストラクトは、SRY に対する親和性の高い結合部位である ATTGTT とのバンドシフトアッセイ法で異常な相互作用を示した。SRY が直接あるいは間接に MIS プロモーターに作用して MIS の制御を行っているのかどうかについて明らかにする実験が進行中である。卵巣の発現には周期性があり、思春期の精巣では発現レベルが急激に低下するので、MIS の発現を抑制する特異タンパクの検索も行われている。

#### MIS 受容体および、MIS 作用のモデル機序

ミューラー管ならびにミューラー管以外の組織における MIS の作用が、ほぼすべて、表皮増殖因子 (EGF) で抑制できるという事実から、MIS の分子的作用機序を規定する枠組みが得られる。実験データでは、MIS 反応細胞タイプの組織、細胞あるいは原形質膜分画と MIS を一緒にインキュベートした場合のネットの効果は、EGF 受容体の自己リン酸化の低下であることが示されている (Coughlin et al., 1987; Cigarroa et al., 1989; Maggard et al., 1996)。EGF の作用は、この触媒イベントで始まるので、MIS の作用は、EGF 活性を阻害することで発現されると主張することが可能である。どのような分子機序で、この抑制が達成されているかを今後明らかにする必要がある。われわれの研究室から得られた、MIS 応答細胞の原形質膜と MIS の作用によって特異的なチロシンホスファターゼが賦活化される