

3月25日 11:30-14:15

Symposium Session:

From Conception to Cane: Unique Life-Stage Considerations for Reproductive Toxicity (受精から杖をつく年齢まで：生殖毒性におけるライフステージ特有のリスクについての考察)

Abstract No.1302

Case Study of Atrazine as an Endocrine-Disrupting Chemical: Timing Is Everything (環境ホルモンのケーススタディ「アトラジン」：タイミングがすべて)

Dr. Tammy E. Stoker, PhD, Neurological and Endocrine Toxicology Branch, Public Health and Integrated Toxicology Division, CPHEA/ORD/US EPA, RTP, NC

Slide1, 2

受精から杖まで：一生を通じたアプローチ

人の一生を通じて、環境汚染物質から健康への悪影響を受ける感受性の高いサブグループがいる

- 出生前：体外の物質に暴露することで、健全な生殖発達が阻害される。生殖器官や脳の性分化も含まれ、これらは成人後の妊娠に影響する可能性がある
- 新生児期：体外の物質の中には、中枢神経系の脳や生殖機能を調節する下垂体の調節機能を不可逆的に変えてしまう可能性がある
- 思春期：環境汚染物質の中には、思春期の発達においてカギとなる現象を早めたり遅くしたりして正常な思春期の進行を変えてしまうものがあり、この変化は成人後の生殖機能に悪影響を与える可能性がある
- 成人：成人女性の生殖可能時期の過程には、いくつもの感受性の高い時期がある。そのような感受性の高い時期に環境汚染物質に暴露すると、生殖機能や妊孕能に悪影響が生じる可能性がある
- 高齢期：生殖の老化（正常な卵巣周期と生殖機能が失われる）も、環境汚染物質への暴露に影響される可能性がある

### Slide 3

Atrazine (日本での商品名「ゲザプリム」)

- クロロトリアジン系除草剤。1958年に農薬登録
- アメリカおよび世界で最も使用されている除草剤のひとつ
- 水中、土壌中で長期残留するため地中、地表水から検出される。
- 光合成を阻害することで発芽前、または発芽後の広葉およびイネ科の雑草の成長を抑える
  - 主にコーン、ソルガム、サトウキビ、果物に使用される

### Slide 4

出生前のアトラジン暴露 (SD ラットを使い、受精後 14-21 日に経口投与)

アトラジンを 0, 1, 5, 20, 100 mg/kg/日、一日 1 回 (s.i.d.) または一日に 2 回に分けて (b.i.d.) 投与

出産後、出生仔の実験 (精巣のインキュベーション) 出生後 7 日で肛門生殖器間距離を測定、21 日目で離乳、30 日目でオスの行動観察、45 日目でメスの乳腺発達観察など、思春期の行動の評価を行った。メスについては女性ホルモンの周期性を観察し、オスは 59 日目に安楽死させて精巣を調べ、肛門生殖器間距離を調べた。

### Slide 5

出生後の生存率、成長、オスの仔への影響

- 出生前に死んだ個体はなかった
- 100mg/kg の高濃度アトラジン投与グループで、出生から 4 日までの死亡率が 9%増加した
- 生き残ったグループで、同時期体重が減った。しかし、1-20mg/kg の濃度での投与グループでは体重にも成長にも変化は見られなかった
- 出生後 7 日目と 59 日目で、肛門生殖器間距離 (立方根体重との比) に変化は見られなかった
- 100mg/kg の高濃度アトラジン投与グループで、出生時に摘出した精巣によるテストステロン生産は低下した
- 出生後 30 日での激しく転がるような遊び (正常な男性ホルモンによる行動) には違いは見られなかった

- オスでは思春期の遅発は見られなかった

#### Slide 6

メスの仔で膣開口と乳腺発達を観察した

- いずれの濃度でも、体重に変化はなかった
- 出生後 45 日目で、s.i.d.グループにも b.i.d.グループにも、乳腺の発達に遅発は見られなかった
- 出生後 272 日目で、発情周期に変化は見られなかった

#### Slide 7

環境汚染物質が影響する感受性の高い時期（ウィンドウ）：新生児期、初期授乳期（出生後 1-4 日、b.i.d.）

- この時期にアトラジンに暴露すると、母親のホルモン、ミルクの成分にも影響する。アトラジンは、搾乳刺激によって放出されるプロラクチン濃度を低下させた（視床下部から放出されるドーパミンが増加し、プロラクチンが減少するからである）
- 30 分間の授乳後ミルクの出る量やミルクに含まれるホルモンに変化が見られた
- オスの仔の場合、TIDA（Tuberoinfundibular Dopamine＝視床下部からのドーパミン分泌）系の発達に影響し、出生後 120 日前後で前立腺炎を発症する。この影響は、出産後 6-9 日、11-14 日に母親に投与しても有意に増えなかったもので、1-4 日が感受性の高い時期であることがわかる

#### Slide 8

環境汚染物質に対して感受性の高い時期：思春期の暴露

- 性成熟は複雑な一連の生理的事象の到達点であり、生殖が可能になる
- オスでもメスでも、この過程には生殖機能を調節する視床下部から分泌される下垂体ホルモンのパルス発生を刺激・抑制を統合することが含まれる
- GnRH(Gonadotropin Releasing Hormone = 性腺刺激ホルモン放出ホルモン)の拍動的な分泌が下垂体からの LH (Luteinizing Hormone = 性腺刺激ホルモンの一つ、黄体形成ホルモン) 分泌を調節し、機能性生殖軸の発達に必要である

- この過程が阻害されると、LH 分泌が減少し思春期の遅発が起こり、男性ホルモンに依存した生殖器の成長が遅れるという結果が生じる

#### Slide 9

アトラジンはメスで思春期の発達を遅らせる

- メスのラットに出生後 22 日目から 42 日目までアトラジンを投与すると、50mg/kg/日以上濃度で、濃度依存的に 2~7 日、膣開口が遅くなる。
- 膣開口後の発情周期は、100-200mg/kg/日の濃度で、約 3 週間発生が遅れた。しかし、出生後 57-149 日では変化はなかった。

#### Slide 10

アトラジンは思春期の暴露でオスに思春期の発生を遅らせる

- 出生後 23 日目から経口投与すると、50mg/kg/日以上濃度で思春期の発生 (PPS = Preputial separation = 陰茎包皮分離) が遅れる
- 男性ホルモン依存性の組織である腹側前立腺 (50mg/kg/日以上) や精嚢 (高濃度で) の発達が遅れる
- 出生後 45 日で、精巣内のテストステロン濃度が減少し、20mg/kg/日~200mg/kg/日で濃度依存的に LH の分泌が減少する

#### Slide 11

感受性の高い時期：思春期についてのサマリー

- メス、オスに見られた LH とテストステロンの減少を伴った思春期発生の遅れは、LH と HPG (Hypothalamus-Pituitary-Gonad = 視床下部-下垂体-性腺軸)の中心的な働きを抑制することにつながる
- 他のグループによる研究でも、メスの思春期の遅れ、PPS、アンドロゲンに依存する組織やテストステロン濃度への影響などの、オスの思春期の遅れが報告されている
- これらの思春期についての研究では、思春期の早期化やエストロゲンに関連した変化、さらには中枢神経系への影響については報告されていない

#### Slide 12

思春期は、GnRH 神経の神経分泌活性が徐々に増加することによって調節されている

- 思春期の初期は、GnRH の拍動発生器の刺激によって調節されている。これはラットや霊長類だけではなく人でもそうである
- GnRH の拍動頻度の増加、GnRH の拍動の振幅の増加によって調節される
- 左の図は、メスラットの出生後 30 日～47 日目までの GnRH の拍動を示している。30-33 日目まではほとんど拍動がなく、34-37 日で膣開口が起こった後は拍動が続き発情周期が起こる
- 中央の図は、メスラットの膣開口前後での GnRH 拍動数/時間を示す。
- 右の図は、GnRH の拍動的な分泌を示す。アトラジン投与により、拍動のパターンが乱れ、血中 LH が減少する。

これが、思春期への影響のメカニズムと考えられる。

### Slide 13

- 成人後も感受性の高い時期がある。卵巢周期についての感受性の高い時期は良く知られている
- LH の排卵のための引き金という高感受期がここでは特に重要である
- 成人女性の生殖機能は、発情期を調節する HPG 軸の調和によりコントロールされている
- LH の急増は、内分泌の機能的な事象である。
  - 発情期の前の決まった時期に起こる。
  - Circadian rhythm (概日リズム) とホルモンサイクルに結び付いている
  - 卵母細胞の成熟に導く
  - 卵胞壁の崩壊を開始させる
  - ラットと人では排卵の 12-24 時間前に起こる
- LH 分泌がなければ、排卵も、卵も、受精もなく、当然次世代も生まれない。

右上の図は、膣細胞が性周期によってどう変わるかを示す。発情前期と発情期では全く異なる。右下の図は、血中のエストラジオール濃度と LH 濃度が発情前に急激に増加し、発情が終わると急激に低下することを示す

### Slide 14

アトラジンが発情期前の LH 分泌に与える影響 (4 日間の経口投与の後)

図は、血中の LH 濃度を示す。アトラジンの濃度は 1.56mg/kg から 75mg/kg/日であった。NOEL (No observed effect level = 無作用濃度)値は 1.56/kg、LOEL (Lowest observed effect level = 最小作用濃度)は 3.12mg/kg であった。LH 分泌の減衰は、低濃度でも影響を受けやすい影響の一つである。

#### Slide 15

LH 分泌の変化がもたらす結果

- LH 分泌が遅れると、卵母細胞が放出された後の生存率を低下させる可能性がある
- LH 分泌を遅らせる化学物質は、発情周期をもカエル可能性があり、長期間暴露されると生殖機能の老化につながる

#### Slide 16

アトラジン以外にも、LH 分泌を抑制する化学物質はたくさんある  
カテコールアミン作動性神経伝達を阻害することにより LH 分泌を抑制する物質は以下のとおり

- ・ホルマミジン系殺虫剤

クロルジメフォルム (NE (ノルアドレナリン) 受容体拮抗作用)

アミトラズ (モノアミン作動性)

- ・ジチオカルバミン酸塩 (NE 合成抑制の抑制作用)

チラム (チラウム)

メタムナトリウム

DMDC (Dimethyl dicarbonate) 二炭酸ジメチル

フェルバム (ファーバム)

ジスルフィラム (ノックビン)

- ・クロロトリアジン

アトラジン、シマジン、

シアナジン

プロパジン

DACT (ダクチノマイシン) (アクチノマイシン D)

- ・カーバメイト (カルバミン酸塩)

モリネート

- ・ピレスロイド
  - デルタメトリン
- ・ハロ酢酸
  - ジブロモ酢酸
- ・環状シロキサン
  - D4 (オクタメチルシクロテトラシロキサン)
- ・トリハロメタン
  - ブロモジクロロメタン

右の図は、LH分泌を調節する神経の感受性の高い時期にこれらの化学物質を投与すると排卵が遅れ、卵母細胞の生存率が下がることを示す。

**Slide 17** (動物実験に詳しくないので、十分訳せていません)

チラムにより排卵が遅れた後に起こる **polyspermia** (精液過多) の例  
一回だけチラムを投与し、卵母細胞を老化させた。

移植しても効果はなく、**polyspermia** は対照群と比較して **21%**増加し、それは仔の体重減少と関連した。

**Slide 18**

老化も感受性の高い時期と関係する

- ラットでは、中枢神経系による排卵の調節が老化によって失われる。
- 発情周期が無くなる (生殖の老化)
- エストロゲン分泌が続き、下垂体からのプロラクチン分泌が変化するため、卵胞発生が持続する
- 様々な要素によって影響される

**Slide 19**

ラットの卵巢周期の喪失における中枢神経系-下垂体系の役割

ラットのメスは、老化と共に LH 分泌の振幅が減っていく。生後 3 か月のラットと比べると、**11.5** か月のラットでは、排卵開始が遅くなる

年を取ったメスのラットでは、卵巢周期が止まる前に **LII** ホルモン分泌パターンの変化が顕著になる

病因と考えられることは：

エストラジオールに暴露され続けることにより、ノルアドレナリンやキスペプチンなどの刺激による GnRH の活性が減少するのではないか。

#### Slide 20

図は、ラットにおける正常な老化を示す。LH 分泌の振幅が減り、排卵開始が遅くなる。老化に伴い、LH の分泌量が排卵には十分ではなくなるため、排卵は止まり、血中エストラジオールの濃度は一定になる。

#### Slide 21

メスラットで、化学物質によって発情周期が早まったり遅くなったりする可能性（これを見るためには、長期間動物を飼育する必要がある）

生殖可能年齢の早期終了：エストロゲン、ノルアドレナリンブロッカー、アトラジンなどにより起こる

生殖可能年齢終了の遅延：チロシンなどで起こる

#### Slide 22

アトラジン投与前後の卵巢周期

- アトラジンを2週間投与前後で膣細胞と発情周期を観察した
- 投与前は規則正しい卵巢周期であったが、投与により周期が変化したラットが見られ、その変化は投与が終了してからも持続し、発情期が継続したラットも見られた
- 多嚢胞卵胞が継続したラットも見られた

#### Slide 23

アトラジン投与後の生殖年齢の早期老化

高濃度投与群で発情期が長く続いた

#### Slide 24

アトラジンと乳腺癌の早期発症

- 大人のラットに長期投与すると乳腺癌が早期に発症する



- アトラジンが発がん性物質なのか、それともこの癌がホルモンによるものなのか
- 人にもこの相関は当てはまるのかが課題であった

#### Slide 25

アトラジンによる乳腺癌発生に至るカギとなる現象のタイムライン

- 1) 視床下部の受けた影響によりカテコールアミンや GnRH からの拍動的な分泌に変化が起こる
- 2) LH 分泌の低下
- 3) エストロゲン分泌が継続して起こることにより排卵が止まる
- 4) エストロゲン濃度が上がることで下垂体からのプロラクチン分泌が増加する
- 5) プロラクチンとエストロゲンにより乳腺の過形成を引き起こし癌化する

#### Slide 26

乳腺癌との関連

- 生殖年齢の老化は、げっ歯類の場合脳内で起こる。その結果、エストロゲンに対する視床下部の過敏性と無排卵という結果に至る
- 人の場合、生殖年齢の老化は卵巣により引き起こされる。人の女性は、たくさんの原始卵胞を持って生まれるが、年齢と共に減少し、閉経により無くなる
- というわけで、アトラジン暴露による乳腺癌発達の MoA (Mechanism of Action=行動のメカニズム)は、げっ歯類と人とでは異なる
- ただし、ラットで確認された、他の LH 由来の健康への悪影響は、人においても似たような神経内分泌調節に関連しているだろう (思春期、排卵など)

#### Slide 27

- 生殖可能な時期を通して、女性にはいくつもの高感受期があり、HPG 軸により正確にホルモン分泌のタイミングが調整されている
- 卵巣機能の内分泌調節について理解することで、このホルモン分泌の過程が乱された時のメカニズムに光を当てることができる
- アトラジン

- 卵巣の LH 分泌の正常なタイミングを阻害する
- 女性の卵巣サイクル（発情周期）を乱す
- アトラジンによる LH への影響は持続するため、思春期の開始を遅らせ、生殖可能な時間を短くしたりすることがげっ歯類の実験では明らかになっている