

「内分泌かく乱物質」
平成10年度採択研究代表者

堤 治

(東京大学医学部産科婦人科学教室 教授)

「ヒトを含む哺乳類の生殖機能への内分泌かく乱物質の影響」

1. 研究実施の概要

ビスフェノールA(BPA)は、プラスチックの原料として我が国では年間約25万トン消費され、全河川の57%から検出される内分泌かく乱物質である。近年、母獣への低用量投与による雄新生仔の前立腺肥大、雌新生仔の性成熟促進などが報告され、ヒトの汚染や生殖機能への影響についても懸念されているが、その詳細は不明である。

新たに開発された簡便なBPA測定法であるELISA法によりヒト羊水中のBPA濃度を測定したところ、我々は、ヒト血清中や卵胞液中から1 - 10nMのBPAを検出した。更に、妊娠中期の羊水より他の体液の数倍に達する濃度のBPAが検出された。胎児の代謝能力の低い妊娠中期において、物質によっては成人よりも高いレベルの内分泌攪乱物質に曝露される可能性があることを示唆するものであり、その次世代への影響や他の物質の汚染状況についても検討を続けている。

また、マウス2細胞期胚をBPA存在下に培養したところ、ヒト体液中濃度とほぼ等しい1 nMで有意な発育促進効果が認められ、100 μ Mでは有意な抑制効果が認められた。得られた胚盤胞を胚移植し、得られた新生仔の発育および生殖能を検討したところ、生後3週における体重で30%以上の有意な発育の促進が認められた。初期胚のBPAに対する感受性は高く、着床前の曝露もまた次世代の発育に影響を及ぼすことが示唆された。

我々は既に1 - 5pMという非常に低濃度のダイオキシンが初期胚の発育を抑制あるいは促進することを明らかにしており、初期胚は内分泌かく乱物質への感受性が高いと考えられる。初期胚を用いた我々の実験系は内分泌かく乱物質の低用量作用を検討する上で有用であるため、ミレニアムプロジェクトで指摘された物質を中心に、その他の内分泌かく乱物質やそれらの相互作用なども含めて目下解析を続けている。

2. 研究実施内容

1) ヒト妊娠中期羊水からの高濃度ビスフェノールAの検出

インフォームドコンセント下に、健常非妊女性、妊娠中期女性、妊娠末期女性

より採血し、妊娠末期の臍帯血及び羊水を帝王切開時に採取して検体とした。体外受精時に得られる卵胞液も同じく検体とした。妊娠中期(妊娠15 - 18週)に行った羊水穿刺時に得られた羊水の一部を検体に供した。得られた検体中のBPA濃度を競合ELISA法により測定した。血清中および卵胞液中のBPA濃度はそれぞれ 2.0 ± 0.8 (非妊女性)、 1.5 ± 1.2 (妊娠中期)、 1.4 ± 0.9 (妊娠末期)、 2.4 ± 0.8 ng/ml (卵胞液) だった。臍帯血中からも 2.2 ± 1.8 ng/ml が検出され、母体からのBPAの移行が示された。妊娠末期の羊水中BPA濃度も 1.1 ± 1.0 ng/ml だったが、妊娠中期の羊水において 8.3 ± 8.9 ng/ml と他の体液に比べて有意に高い濃度が得られた。一般に内分泌攪乱物質に対して感受性が高いと考えられる妊娠中期において胎児が成人よりも高濃度の内分泌攪乱物質に曝露されている可能性を示唆する所見であり、今後も症例数を増やし、他の内分泌攪乱物質のスクリーニングを進めていくことが急務であると考えられた。(Ikezuki et al., submitted)

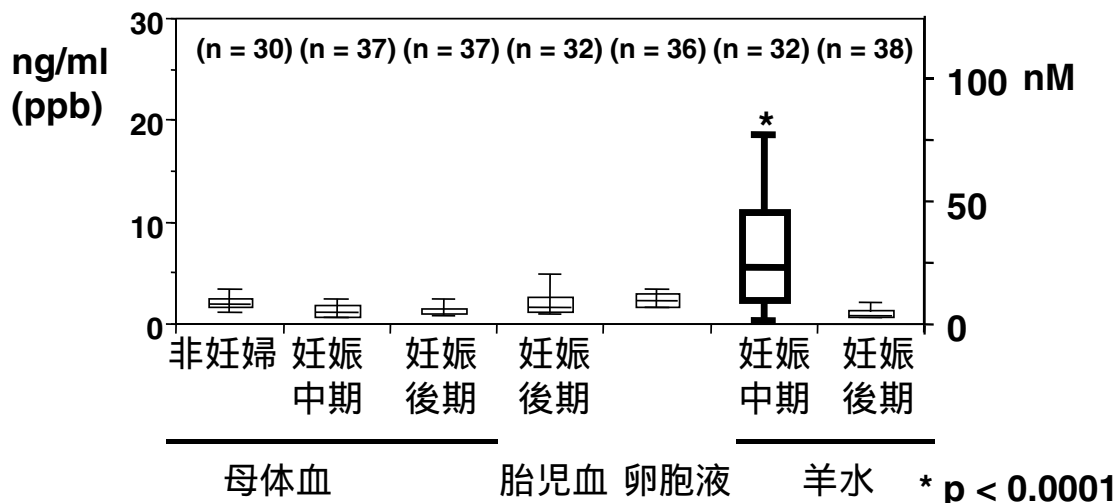


図 ヒト体液中のビスフェノールA濃度

2) 不妊女性血液および卵胞液中のビスフェノールA濃度と生殖機能との相関に関する検討

インフォームドコンセント下に、不妊患者の体外受精の採卵時に採取した卵胞液および血清36例と健常女性ボランティア (28 ± 3.81 歳) より採取した血清26例を対象とした。BPA濃度の測定は、試料にアセトニトリルを加え除蛋白し、固相抽出後に濃縮、抗BPA抗体を用いた競合ELISA法により分析した。BPAはすべての検体から検出され、血中BPA濃度は、ボランティア女性では 2.04 ± 0.71 ($0.65 \sim 3.71$) ng/ml、不妊患者では 1.76 ± 1.12 ($0.76 \sim 6.01$) ng/ml で、両者に有意差はなかった。一方、卵胞液中BPA濃度は 2.38 ± 0.78 ($0.84 \sim 4.45$) ng/ml で、生殖器官の汚染も確認されたが、体外受精での採卵数、受精率、卵のgradelについてBPA

濃度との間に相関はなかった。

3) ビスフェノールA着床前被曝の胚発生及び出生後発育への影響：

ビスフェノールA (BPA) はポリカーボネイト樹脂の原料等に大量使用され、ヒト体液中にも数nM検出される。マウス2細胞期胚をBPA存在下に培養したところ、1nMでは有意な発育促進効果が認められ、100 μ Mでは有意な抑制効果が認められた。得られた胚盤胞を胚移植し、得られた新生仔の発育および生殖能を検討したところ、生後3週における体重で30%以上の有意な発育の促進が認められた。これより初期胚のBPAに対する感受性は高く、胚移植により得られた新生仔の発育がBPA曝露群で促進されることより、妊娠後期の曝露のみならず着床前の曝露もまた次世代の発育に影響を及ぼすことが示唆された。(Takai Y *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270 : 918-921, 2000 ; Takai Y *et al. Reprod. Toxicol.* 15 : 71-74, 2001)

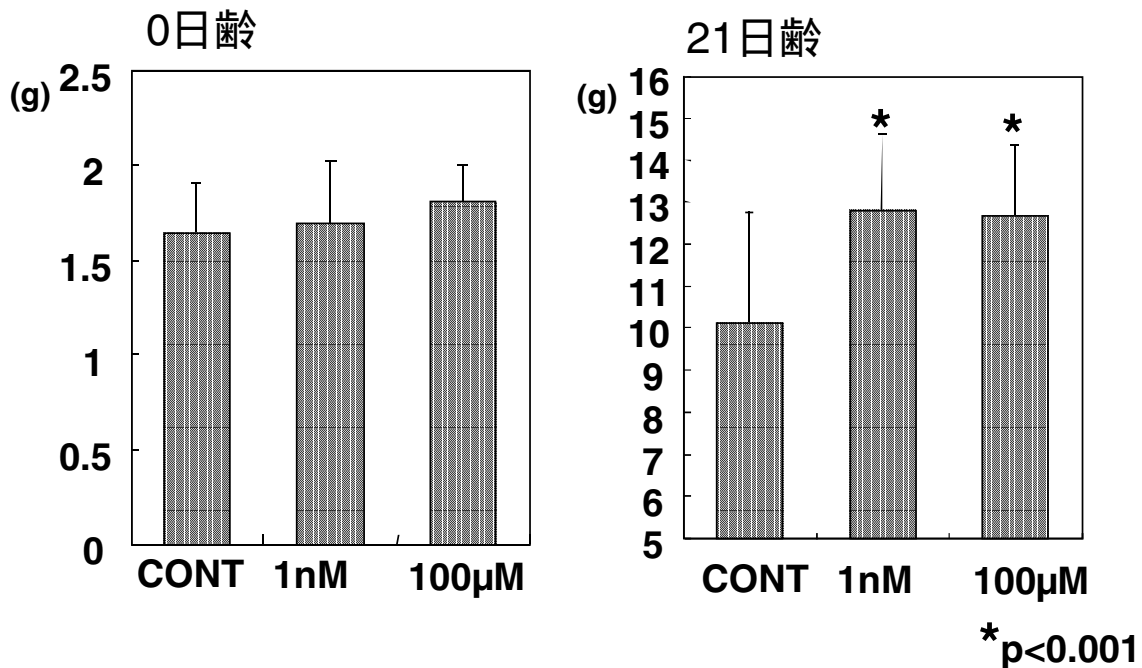


図 BPA着床前被曝を受けた初期胚から生まれた産仔の発育

4) その他の内分泌攪乱物質の初期胚発育に及ぼす影響

フタル酸エステル類、スチレンポリマーについても初期胚を用いた同様の解析を行ったところ、内分泌攪乱物質作用が疑われる前者と内分泌攪乱物質としての作用が否定的とされることの多い後方で、初期胚発育に及ぼす影響に相違点が観察された。このことは初期胚を用いた本実験系が内分泌攪乱物質作用と毒性を区別する上で有用なツールであることを示唆すると考えられるため、今後はミレニアムプロジェクトで指摘された物質を中心に、対象物質を増やして検討していき

たいと考えている。

5) Tumor Necrosis Factor (TNF) α の子宮内膜症発症における関与の検討

TNF α はアポトーシス誘導因子の代表的なものとして知られている。今回の研究では、TNF α の腹腔内貯留液中濃度には差は認められず、TNF α の作用と拮抗するsTNFRが臨床進行期を問わず子宮内膜症患者の腹腔内で上昇していた。これより、子宮内膜症患者では、腹腔内貯留液中で増加したsTNFRがTNF α の子宮内膜組織・子宮内膜症組織に対するアポトーシス誘導作用に拮抗することで、子宮内膜組織の腹膜への生着を促し、内膜症組織増殖させ、内膜症発症・進展の原因になると推察された。(Koga K *et al. Mol. Hum. Reprod.* 2000 ; 6 : 929-33)

6) Stem Cell Factor (SCF)の子宮内膜症発症における関与の検討

腹腔鏡下に肉眼所見上、白色病変として認識されることの多い繊維化などの二次的变化にも、腹腔内環境は大きく関与している。一般に、結合組織の代謝や線維化には肥満細胞が関与することが知られている。SCFは肥満細胞を刺激し、その成熟ならびに活性化に寄与する。腹膜の子宮内膜症病変において肥満細胞の数が増加しているという報告と考え合わせると、腹腔内貯留液中のSCFが、子宮内膜症病変の繊維化と関与していることが推測される。研究の結果、子宮内膜症患者の特に初期病変を有する症例の腹腔内貯留液中でSCFは有意に増加していた。このことは初期の子宮内膜症病変を有する患者では子宮内膜症病変を繊維化の方向に導くことにより、重症化を阻止するように腹腔内環境が作用しているとも解釈された。(Osuga Y *et al. Am. J. Reprod. Immunol.* 2000 ; 44 : 231-5)

3. 研究成果の発表 (論文発表)

Ikeda K, Sato M, Tsutsumi O, Tsuchiya F, Tsuneizumi M, Emi M, Imoto I, Inazawa J, Muramatsu M, Inoue S : Promoter analysis and chromosomal mapping of human EBAG 9 gene [In Process Citation] *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273 : 654-60, 2000

Koga K, Osuga Y, Tsutsumi O, Momoeda M, Suenaga A, Kugu K, Fujiwara T, Takai Y, Yano T, Taketani Y : Evidence for the presence of angiogenin in human follicular fluid and the upregulation of its production by human chorionic gonadotropin and hypoxia. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 85 : 3352-5, 2000

Takai Y, Tsutsumi O, Ikezuki Y, Hiroi H, Osuga Y, Momoeda M, Yano T, Taketani Y : Estrogen receptor-mediated effects of a xenoestrogen, bisphenol A, on preimplantation mouse embryos [In Process Citation] *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270 : 918-21, 2000

Takai Y, Tsutsumi O, Ikezuki Y, Kamei Y, Osuga Y, Yano T, Taketani Y : Preimplantation exposure to bisphenol A advances postnatal development.

Reprod. Toxicol. 15 : 71-74, 2001