

「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 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

内分泌かく乱物質の汚染実態を明らかにするため、ヒト試料(血液、卵胞液、精液、胎児血、羊水、胆汁等)においてビスフェノールAやダイオキシン等を検出し、その濃度を定量的に評価した。ビスフェノールAやダイオキシンは生殖器官を汚染し、母体から胎児への移行も証明し、汚染動態を明らかにした。ダイオキシンが胆汁中に高濃度であること、腸肝循環を含めた体内動態の解明もおこなった。内分泌かく乱物質の作用検出系としてマウス胚培養系を考案し低用量作用や次世代影響の存在を示した。内分泌攪乱物質と各種生殖パラメーター、子宮内膜症を含む疾患との量-反応関係や遺伝子、分子レベルの解析をおこなった。

### 2. 研究実施内容

#### 1) ヒト生体試料からのビスフェノールA検出

ビスフェノールA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った。そこで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。得られた検体中のビスフェノールA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ビスフェノールA濃度はそれぞれ  $2.0 \pm 0.8$  (非妊女性)、 $1.5 \pm 1.2$  (妊娠中期)、 $1.4 \pm 0.9$  (妊娠末期)、 $2.4 \pm 0.8$  ng/ml (卵胞液)だった。臍帯血中からも  $2.2 \pm 1.8$  ng/ml が検出され、母体からのビスフェノールAの移行が示された。妊娠末期の羊水中ビスフェノールA濃度も  $1.1 \pm 1.0$  ng/ml だったが、妊娠中期の羊水において  $8.3 \pm 8.9$  ng/ml と他の体液に比べて有意に高い濃度が得られた。一般に内分泌かく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かく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、他の内分泌かく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)。

ボランティアの健常男性 11 名、健常女性 14 名、高プロラクチン血症 7 名、視床下部性無月経

21 名および多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)16 名より早朝空腹時に採血し、インフォームドコンセントを得てビスフェノールAを測定した。また、LH, FSH, estradiol, total および free testosterone(T), androstenedione, DHEAS, prolactin を測定した。その結果血清ビスフェノールA濃度は、正常男性が  $1.49 \pm 0.11$  ng/ml、正常女性が  $0.64 \pm 0.10$  ng/ml であり、男性の方が有意に( $P < 0.01$ )高値であった。血清ビスフェノールA濃度は、正常女性群( $0.64 \pm 0.10$  ng/ml)に比較し高プロラクチン血症群と視床下部性無月経群では有意な差は認められなかったが、PCOS 群 ( $1.04 \pm 0.10$  ng/ml:  $P < 0.01$ )では有意に高値であった。全女性群においてビスフェノールAはtotal T ( $r=0.370$ ,  $P < 0.05$ )および free T ( $r=0.324$ ,  $P < 0.05$ )とそれぞれ有意な正の相関を認めたが、その他のホルモンとは相関関係を認めなかった。これより、ヒト血中ビスフェノールA濃度には性差が存在し、男性の方が女性よりも高値である。ビスフェノールAの体内動態とアンドロゲンとの関連性が示唆された(Takeuchi, Tsutsumi: *Biochem Biophys Res Commun.* 291:76-78, 2002)。

## 2) 不妊女性血液および卵胞液中のビスフェノール A 濃度と生殖機能相関の検討

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 ( $28 \pm 3.81$  歳)より採取した血清 26 例を対象とした。ビスフェノールA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、抗ビスフェノールA抗体を用いた競合 ELISA 法により分析した。ビスフェノールAはすべての検体から検出され、血中ビスフェノールA濃度は、ボランティア女性では  $2.04 \pm 0.71$  ( $0.65 \sim 3.71$ ) ng/ml、不妊患者では  $1.76 \pm 1.12$  ( $0.76 \sim 6.01$ ) ng/ml で、両者に有意差はなかった。一方、卵胞液中ビスフェノールA濃度は  $2.38 \pm 0.78$  ( $0.84 \sim 4.45$ )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 grade についてビスフェノールA濃度との間に相関はなかった。

卵胞液中のビスフェノールAの卵巣機能に与える影響を検討するモデルとしてマウス卵胞より採取した顆粒膜細胞を培養しビスフェノールAの添加実験をおこなった。ビスフェノールAは、100 pM の低濃度で顆粒膜細胞の増殖を抑制し、TUNEL 法による解析では顆粒膜細胞にアポトーシスが起ることが明らかになった。さらに G2 期から M 期への抑制、Bax や Bcl2 の蛋白および mRNA レベルの変化も観察された。従ってビスフェノールAは環境レベルの濃度で卵胞顆粒膜細胞にアポトーシスを惹起し卵巣機能に影響を与えうることが示された(Xu J, et al: *Biochem Biophys Res Commun.* 292:456-462, 2002)。

## 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 細胞期胚をビスフェノールA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 $\mu$ 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。これより初期胚のビスフェノールA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ビスフェノールA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. *Reprod Toxicol* 15:71-74, 2001) 。

#### 4) ダイオキシン類の体内動態解明

体内に蓄積されたダイオキシン類は胎盤、母乳を通じて母親側から胎児・新生児・小児へ移行する。その動態を定量的に解明するために、妊娠初期に同意をえた妊婦に、妊娠前期、分娩時の母体血液、胎児の血液(臍帯血)、羊水を採取した。妊娠経過、新生児のデータ(体重その他)等の集積もおこなった。その結果、母体血液中のダイオキシン濃度は妊娠中に低下し胎児血液、羊水中に母体と同等ないしやや低濃度のダイオキシンが検出された。経産婦においては初産婦に比べてダイオキシン濃度は低く、胎児移行および母乳によるダイオキシン汚染軽減が定量的に明らかになった。

ダイオキシン類の特徴として体内で安定で、脂質成分中に特に高濃度に含まれ、肝臓より胆汁中に脂質成分とともに分泌され、小腸において再吸収された後再び肝臓内に蓄積される(腸肝循環)と推定されるが、胆汁(肝内、胆嚢内、胆管内)中のダイオキシン測定に成功し、腸肝循環の動態を明らかにすることができた。一日約1ng程度腸肝循環するダイオキシンを体外排出除去する試みとしてボランティアによる薬用炭製剤の服用実験をおこないダイオキシン汚染軽減の可能性を示した。

#### 5) ダイオキシンおよびその他の内分泌かく乱物質の初期胚発育に及ぼす影響

ダイオキシン、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、内分泌かく乱物質作用が疑われる前者と内分泌かく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かく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。

#### 6) 子宮内膜症発症における関連因子の検討

子宮内膜症は近年増加し発生要因が不明とされる。内分泌かく乱物質の関連ではダイオキシンが発症に関係ないし症状の進行を促進する可能性が示唆されている。血液中のダイオキシン濃度は組織中濃度に比べて低く測定法の限界もあるため、ダイオキシンが蓄積する脂肪中の濃度の測定をおこない、進行期と汚染の関係を認めたが、ライフスタイルの面からの比較等をおこなっている。ダイオキシンレセプター(AhR)が子宮内膜組織に発現することは免疫組織化学および In situ hybridization 法により確認され、子宮内膜の上皮細胞に局在も示された。我々も AhR や Arnt の発現と発現量を子宮内膜症患者と対照において RT-PCR 法で比較した。子宮内膜において両者ともに発現を認めた。しかしながら内分泌攪乱物質と子宮内膜症の関連の解明には子宮内膜の増殖や分化のメカニズムを含めて不明な点が多い。今年度の成果としては、血管造成に関与するアンギオゲニンの子宮内膜における存在やホルモン環境による変化(Koga K et al. J Clin Endocrinol Metab 86:5609-5614, 2001)、比較的最近発見されたサイトカイン interleukin-18、interleukin-18 受容体、およびその結合蛋白をヒト子宮内膜において解析した(Yoshino et al. Mol Hum Reprod 7:649-54, 2001)。

## 7) エストロゲンレセプター下流遺伝子 EBAG9 解析

ヒトの EBAG9<sup>5</sup> 上流領域の解析から、この遺伝子のエストロゲン誘導性と、調節のメカニズムが示された。ヒト EBAG9 は8番染色体に位置し、癌との関連を示唆した。今年度はさらに、マウスの cDNA、ゲノムの構造を決定し、子宮における in vivo でのエストロゲン誘導性を示した。この蛋白は、正常細胞の増殖抑制に働き、生殖、発生における役割を明らかにした(Tsuchiya et al. Biochem Biophys Res Commun 284:2-10, 2001)。

## 3. 研究実施体制

### (1) 堤グループ

① 堤 治(東京大学医学部産科婦人科学教室、教授)

② 研究項目

内分泌かく乱物質の卵胞発育・卵成熟への影響

内分泌かく乱物質の初期胚発育への影響

内分泌かく乱物質の胚着床への影響

内分泌かく乱物質の胎児発育・新生仔発育への影響

内分泌かく乱物質の作用機構の解析

ヒト生殖器及び初期胚におけるダイオキシンレセプターの発現

子宮内膜症の発症機構とこれにおよぼす内分泌かく乱物質の影響

### (2) 百枝グループ

① 百枝幹雄(東京大学医学部産科婦人科学教室、助手)

② 研究項目

エストロゲン作用分子機構の解析とこれにおよぼす内分泌かく乱物質の影響

エストロゲン応答遺伝子の機能解析とこれにおよぼす内分泌かく乱物質の影響

### (3) 吉村グループ

① 吉村泰典(慶應義塾大学医学部産科婦人科学教室、教授)

② 研究項目

内分泌かく乱物質の排卵卵子の受精能と精子機能への影響

## 4. 研究成果の発表

### (1) 論文発表

- Yutaka Osuka, Kaori Koga, Osamu Tsutsumi, Teteu Yano, Koji Kugu, Mikio Momoeda, Ryugo Okgagaki, Akihiko Suenaga, Toshihiro Fujiwara, Akihisa Fujimoto, Hirotaaka Matsumi, Hisahiko Hiroi and Yuji Taketani: Evidence for the Presence of Keratinocyte Growth Factor(KGF) in Human Ovarian Follicles. Endocrine Journal 48(2):161-166,2001
- Yutaka Osuga, Osamu Tsutsumi, Toshihiro Fujiwara, Koji Kugu, Akihisa Fujimoto and Yuji Taketani: Usefulness of Long-Jaw Forceps in Laparoscopic Cornual Resection of Interstitial Pregnancies. The Journal of the American Association of Gynecologic Laparoscopists August

8(3) :429-432,2001

- Fujiko Tsuchiya, Kazuhiro Ikeda, Osamu Tsutsumi, Hisahiko Hiroi, Mikio Momoeda, Yuji Taketani, Masami Muramatsu and Satoshi Inoue: Molecular Cloning and Characterization of Mouse EBAG9, Homolog of a Human Cancer Associated Surface Antigen. Expression and Regulation by Estrogen . Biochemical and Biophysical Research Communications 284:2-10,2001
  - Osamu Yoshino, Yutaka Osuga, Kaori Koga, Osamu Tsutsumi, Tetsu Yano, Tomoyuki Fujii, Koji Kugu, Mikio Momoeda, Toshihiro Fujiwara, Keiko Tomita and Yuji Taketani: Evidence for the Expression of Interleukin(IL)-18, IL-18 Receptor and IL-18 Binding Protein in the Human Endometrium. Molecular Human Reproduction 7(7):649-654,2001
  - Akihisa Fujimoto , Yutaka Osuga , Osamu Tsutsumi , Tomoyuki Fujii , Ryugo Okagaki , and Yuji Taketani Y: Successful laparoscopic treatment of ileo-cecal endometriosis producing bowel obstruction . The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research 27(4) :221-223,2001
  - Koga K, Osuga Y, Tsutsumi O, Yano T, Yoshino O, Takai Y, Matsumi H, Hiroi H, Kugu K, Momoeda M, Fujiwara T, Taketani Y.: Demonstration of angiogenin in human endometrium and its enhanced expression in endometrial tissues in the secretory phase and the decidua.. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 86(11):5609-5614,2001
  - Takai Y, Tsutsumi O, Ikezaki Y, Kamei Y, Osuga Y, Yano T, Taketani Y : Preimplantation exposure to bisphenol A advances postnatal development. . Reproductive Toxicology 15:71-74,2001
  - Osuga Y, Yano T, Kugu K, Koga K, Fukuoka K, Matsumi H, Wada O, Kikuchi A, Tsutsumi O, Taketani Y: Effects of gonadotropin-releasing hormone analog treatment on skin condition. Gynecological Endocrinology 16:57-61,2002
  - Takeuchi T, Tsutsumi O : Serum bisphenol A concentrations showed gender differences, possibly linked to androgen levels. Biochemical and Biophysical Research Communications 291:76-78, 2002
  - Xu J, Osuga Y, Yano T, Morita Y, Tan X, Fujiwara T, Takai Y, Matsumi H, Koga K, Taketani Y, Tsutsumi O: Bisphenol A induces apoptosis and G2-to-M arrest of ovarian granulosa cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 292:456-462,2002
  - Tsutsumi O: Endocrine disruptors and reproductive medicine. Environmental Sciences 9(1):1-11,2002
- (2) 特許出願  
なし