

「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

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（BPA）やダイオキシンに加えてノニルフェノール等を検出し、その濃度を定量的に評価した。BPAやダイオキシンに限らずノニルフェノール等様々な内分泌かく乱物質が複合的に生殖器官を汚染し、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。ダイオキシンの胆汁中濃度や腸肝循環の解明も進めた。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様々な内分泌かく乱物質の作用濃度を明らかにし、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

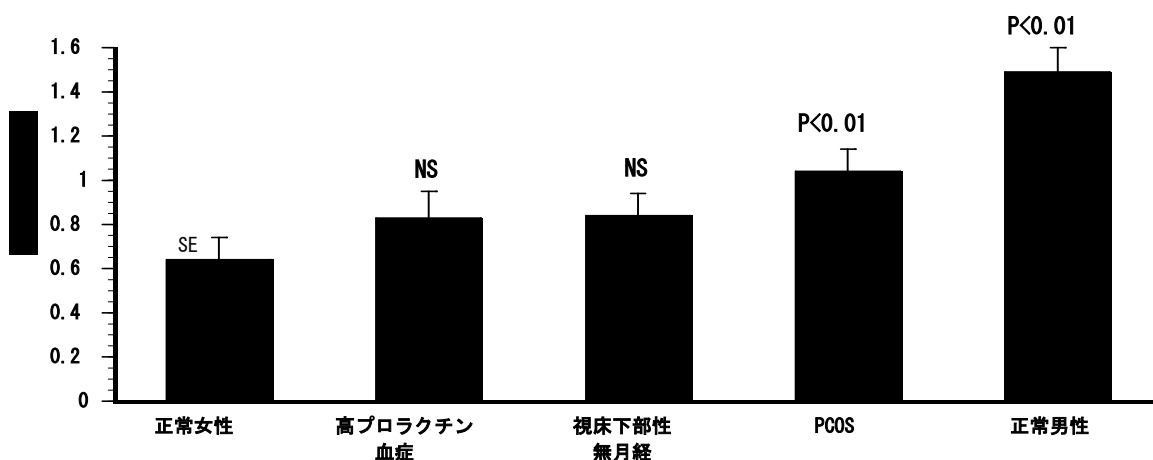
1) ヒト生体試料からの各種内分泌かく乱物質の検出

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、ビスフェノールA（BPA）、ノニルフェノール、フタル酸の検出を行った。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。BPA濃度は新規に開発された競合ELISA法により測定した。妊娠中期羊水中で高値を示すBPA濃度測定成績は既に報告した（Ikezuki Y *et al.* ∴ Hum Reprod 17: 2839-41, 2002）。一方、BPAのヒト血中濃度は男性の方が女性よりも有意に高値であり、その濃度には性差が存在することを以前明らかにした（図1）。また、血中BPA濃度とアンドロゲンとの間に有意な相関があることを報告した（Takeuchi T, Tsutsumi O. Biochem Biophys Res Commun 291: 76-8, 2002）。これらの機序を解明するためにラットを用いた動物実験を施行した。BPA 50 mg/kg体重をオスおよびメスラットに投与し、血中BPA濃度を経時的に測定した。ラットにおいても血中BPA濃度は、メスよりもオスの方が高値であった。さらに、それらの肝臓を摘出しミクロソーム分画における抱合化酵素UDP-glucuronosyl transferase (UGT)活性を測定した。さらにUGTのsubunitであるUGT2B1のプラ

イマーを用いてRT-PCRによりmRNAの発現量を測定した。UGT酵素の発現量には性差が認められた。活性値については現在解析中である。また、BPAの血中存在様式の検討するためにHPLCを用いてヒト血清中のBPAの抱合型と非抱合型を測定した。また、限外濾過法とGC/MSを用いて遊離型BPAの測定を試みた。

図 1

血清ビスフェノールA濃度の比較



2) BPAの生殖機能への影響および次世代影響および分子作用の検討

卵胞液中のBPA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BPAの添加実験をおこなった。BPA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これ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BPA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を示された(Xu J, *et al*: Biochem Biophys Res Commun. 292:456-462, 2002)。

BPAの経胎盤、経母乳による胎児への影響を検討するために、妊娠11日目のSD系ラットにBPAを飲水投与し、分娩直前に帝王切開により胎児を取り出し、胎児重量、胎児脳重量、胎児肝重量、胎児生殖腺重量、生殖器—肛門間距離を測定した。胎児重量にほとんど変化が見られなかったが、BPA投与によって胎盤重量が減少した。胎盤でのVEGFやPlGF mRNAの発現量の変化について検討している。また妊娠11日目から出生後3週間目まで経胎盤、経乳汁によりBPAを投与したSD系ラットを、生後6週において、オープンフィールドテストを行った。BPAを投与された雄のlocomotion activityが雌の様に増加していた。次世代影響として考えられる。またヒトの小児に見られる多動症も男児に多く、動物モデルとしての観点から研究を展開している。経胎盤、経乳汁によりBPAを被曝したラットの

脳内でのエストロゲン産生量など電気生理的な解析もおこなっている（東京大学医学部精神科、東大教養学部脳生物物理と共同研究）。

BPAの作用はエストロゲンレセプターを介することが知られ、我々もエストロゲンレセプター α およびエストロゲンレセプター β に結合してエストロゲン作用および条件により抗エストロゲン作用を示すことを明らかにしたが、本年はエストロゲンレセプター α およびエストロゲンレセプター β を発現させる細胞の種類による検討をおこない成果を得た（Kurosawa T *et al.* ∴ Endocr J 49: 465-71, 2002）。

3) 各種内分泌かく乱物質の着床前被曝胚を用いた検討

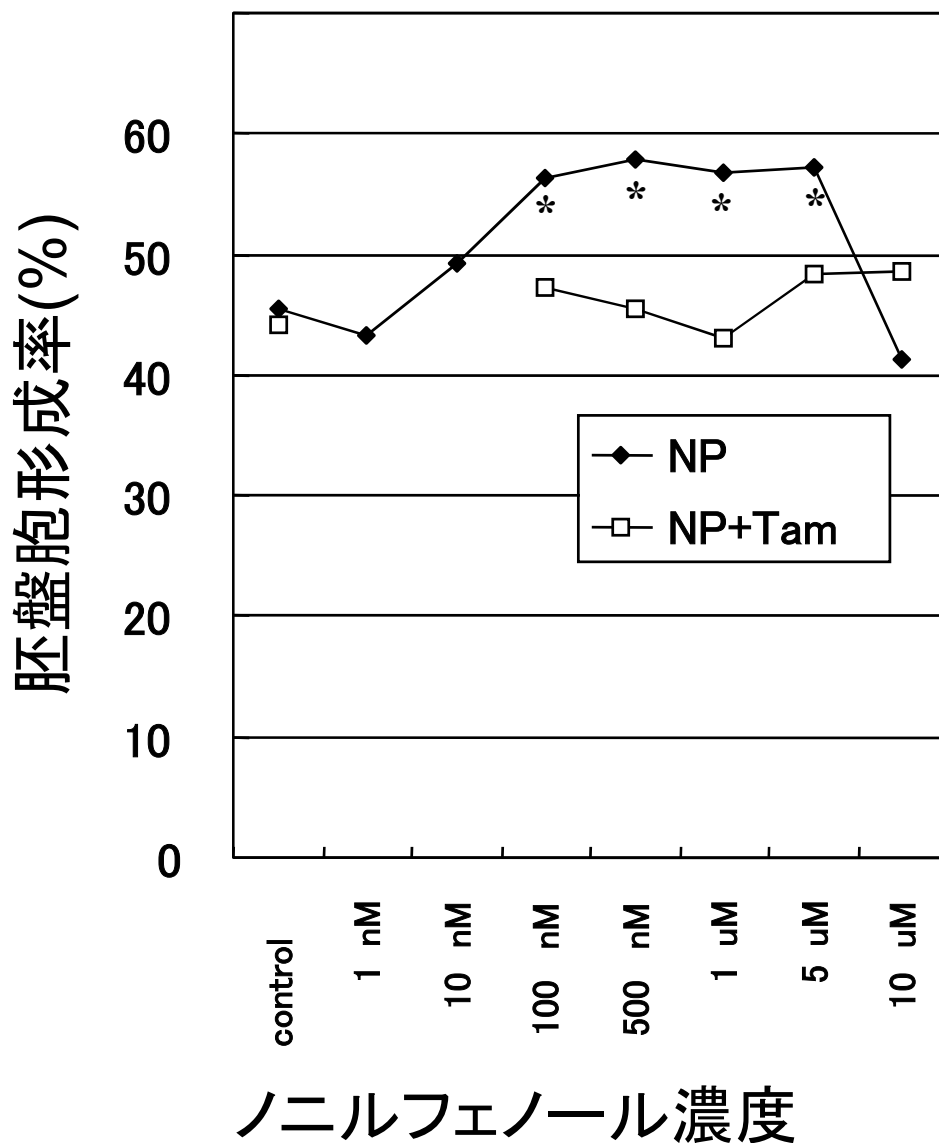
マウス2細胞期胚をBPA存在下に培養したところ、1nMでは有意な発育促進効果が認められ、100 μ Mでは有意な抑制効果が認められた。得られた胚盤胞を胚移植し、得られた新生仔の発育および生殖能を検討したところ、生後3週における体重で30%以上の有意な発育の促進が認められた。これより初期胚のBPAに対する感受性は高く、胚移植により得られた新生仔の発育がBPA曝露群で促進されることより、妊娠後期の曝露のみならず着床前の曝露もまた次世代の発育に影響を及ぼすことが示唆された（Takai Y *et al.* ∴ Reprod Toxicol 15:71-74, 2001）。この系をもちいて内分泌かく乱物質のスクリーニングを計画し実行しつつある。優先してリスク評価に取り組む物質としてはトリブチルすず、4-オクタチルフェノール、ノニルフェノール、フタル酸ジブチル、オクタクロロスチレン、ベンゾフェノン、フタル酸ジシクロロヘキシル、フタル酸ジエチルヘキシルを取り上げた。

マウス2細胞期胚への影響

マウス卵管より採取した2細胞期胚を内分泌攪乱化学物質とともに培養し観察した。培養開始2-4時間後の8細胞期胚形成率、培養開始4-8時間後の胚盤胞形成率を調べ、内分泌攪乱化学物質の2細胞期胚への影響を検討した。オクタチルフェノール（100 nM-1 μ M）、ノニルフェノール（100 nM- 5 μ M）、オクタクロロスチレン（1-5 nM）、ベンゾフェノン（1-10 nM）、フタル酸ジシクロロヘキシル（1-10 nM）は、8細胞期胚形成率には影響を与えなかったが、胚盤胞形成率を対照群に比べ有意に上昇させた（図2）。オクタチルフェノール、ノニルフェノールによる胚盤胞形成率の上昇はタモキシフェンを添加することにより抑えられたことから、オクタチルフェノール、ノニルフェノールによる胚盤胞形成率の上昇にはエストロゲンレセプター（ER）が関与していると考えられた。トリブチルすず、フタル酸ジブチル、フタル酸ジエチルヘキシルは胚盤胞形成率の上昇を認めなかった。

図2 ノニルフェノールの初期胚発育に及ぼす影響

*は対照に比べて $P < 0.05$ 。



着床への影響 (マウス胚盤胞 in vitro 着床モデルを用いて)

交尾後4日目のマウス子宮から採取した胚盤胞を内分泌攪乱化学物質とともに培養し、シャーレ上を伸展したトロフォブラストの面積を測定した。オクチルフェノール(100 nM-5 μM)、ノニルフェノール(5 μM)、ベンゾフェノン(5-10 nM)、フタル酸ジシクロロヘキシル(1-50 nM)は対照群に比べ有意に伸展した面積を拡大した。トリブチルチル、フタル酸ジブチル、オクタクロロスチレン、フタル酸ジエチルヘキシルは面積の拡大はみられなかった。オクタクロロスチレンは2細胞期胚の胚盤胞形成率を上昇させるが、胚盤胞の着床、伸展には影響を与えなかった。2細胞期胚と胚盤胞のオクタクロロスチレンに対する影響の違いを検討している。

4) ダイオキシン類の体内動態解明

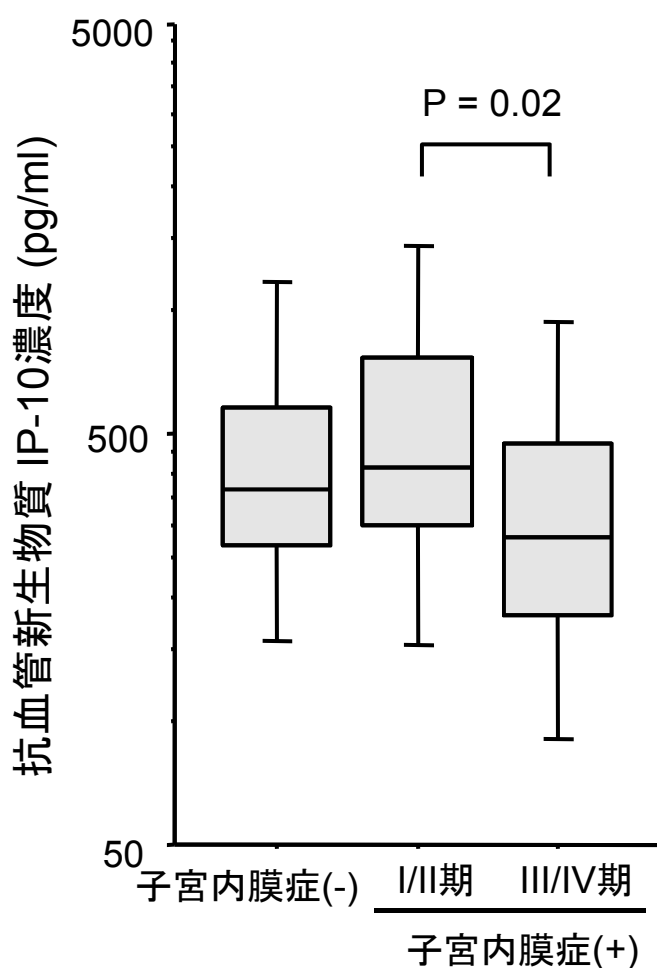
体内に蓄積されたダイオキシン類は胎盤、母乳を通じて母親側から胎児・新生児・小児へ移行する。その動態を定量的に解明するために、妊娠初期に同意をえた妊婦に、妊娠前期、分娩時の母体血液、胎児の血液（臍帯血）、羊水を採取した。妊娠経過、新生児のデータ（体重その他）等の集積もおこなった。その結果、母体血液中のダイオキシン濃度は妊娠中に低下し胎児血液、羊水中に母体と同等ないしやや低濃度のダイオキシンが検出された。経産婦においては初産婦に比べてダイオキシン濃度は低く、胎児移行および母乳によるダイオキシン汚染軽減が定量的に明らかになった。

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) ヒト臨床検体および動物モデルによる子宮内膜症における内分泌かく乱物質作用の検討

子宮内膜症は近年増加し発生要因が不明とされる。内分泌攪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。今年度は動物モデルの作成に成功した。ドナーマウスの子宮内膜を細切し、レシピエントはあらかじめ雌マウスを卵巣摘出した上で一定のホルモン環境をつくり使用した。子宮内膜組織は卵巣摘出しホルモンを補充しない動物には着床しないが、エストロゲン補充動物には着床し、子宮内膜症様の病巣をつくることができた。この系に内分泌かく乱物質を加え、子宮内膜症の発生率や進行度を評価し、あわせてヒト子宮内膜における血管造成に関与するアングリオゲニン（Koga K *et al.* : J Clin Endocrinol Metab 86:5609-5614, 2001）や、種々のサイトカインやその受容体、およびその結合蛋白との関係を検討する。今年度、我々は不妊症などのために腹腔鏡を施行される患者より腹腔内貯留液（PF）を採取し、PFの抗血管新生物質interferon-induced protein（IP-10）をELISA法により測定した。また、PFより分離したマクロファージ、採取した正常腹膜組織、子宮内膜症組織よりRNAを抽出し、IP-10とそのレセプターのmRNA発現をRT-PCRにより検討した。さらに、マウス子宮内膜症モデルに血管新生抑制薬を投与し病巣に与える効果を検討した。PF中のIP-10はIII, IV期の進行した子宮内膜症においてI, II期より有意に低下しており、子宮内膜症のない群と比較しても低下している傾向にあった。IP-10とそのレセプターのmRNAは、調べた組織すべてにおいて広く発現していた。血管新生抑制薬はマウスモデルにおける子宮内膜症病巣を縮小させる傾向を有した。

図3 子宮内膜症患者の腹腔内貯留液における抗血管新生物質濃度



6) エストロゲン作用機構の解析

内分泌かく乱物質のエストロゲン作用の発現様式を解析するために、1) 雌ラットの妊娠子宮で起きている遺伝子発現変化、2) 雌ラットの骨芽細胞におけるエストロゲン作用メカニズムを検討した。まず妊娠している雌ラットの子宮と非妊娠時のラットの子宮からmRNAを調整し、妊娠子宮にて強く発現しているsFRP4を新たに同定した。この遺伝子産物は子宮形成に深く関わるWntシグナルの負の調節因子であり、その生体作用に大変興味もたれる (Fujita, Inoue, Tsutsumi *et al.*: J Mol Endocrinol 28:213-223, 2002)。今後これら遺伝子の内分泌かく乱物質の作用標的としての役割を検討していく。次に、エストロゲンレセプター α および β の両方の機能を抑制するドミナントネガティブ変異体を導入したエストロゲン低応答性ラットを用いて、骨の細胞におけるエストロゲン応答に関わる因子をDNAチップを用いて検索した。その結果、D型サイクリンが骨芽細胞におけるエストロゲン受容体の新たな標的として判明した。これらの解析をもとに、内分泌かく乱物質の作用において、骨芽細胞においては、サイクリン、cdkが分子標的である可能性が示され、今後の検討を進める。

3. 研究実施体制

(1) 堤グループ

①研究分担グループ長：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研究分担グループ長：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研究分担グループ長：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. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

- Tsutsumi O: Endocrine disrupters and human reproduction. Clin Pediatr Endocrinol. 11(suppl 18), 67-76, 2002
- Kurosawa T, Hiroi H, Tsutsumi O, Ishikawa T, Osuga Y, Fujiwara T, Inoue S, Muramatsu M, Momoeda M, Tatekatani Y. The activity of bisphenol a depends on both the estrogen receptor subtype and the cell type. Endocrine Journal. 49(4):465-471, 2002
- Fujimoto A, Osuga Y, Fujiwara T, Yano T, Tsutsumi O, Momoeda M, Kugu K, Morita Y, Wada O, Taketani Y. Human chorionic gonadotropin combined with progesterone for luteal support Improves pregnancy rate in patients with low late-midluteal estradiol levels in ivf cycles. Journal of assisted reproduction and genetics. 19(12):550-554, 2002
- Hiroi H, Osuga Y, Tarumoto Y, Shimokama T, Yano T, Yokota H, Taketani Y. A case of estrogen-producing brenner tumor with a stromal component as a potential source for estrogen. Oncology. 63:201-204, 2002

- Fujita M, Ogawa S, Fukuoka H, Tsukui T, Nemoto N, Tsutsumi O, Ouchi Y, Inoue S. Differential expression of secreted frizzled-related protein 4 in decidual cells during pregnancy. *Journal of molecular endocrinology*. 28:213-223, 2002
- Ikeduki Y, Tsutsumi O, Takai Y, Kamei Y, Taketani Y. Determination of Bisphenol A Concentrations in Human Biological Fluids Reveals Significant Early Prenatal Exposure. *Human Reproduction Journals*. 17(11):2839-2841, 2002
- Canning J, Takai Y, Tilly JL. Evidence for genetic modifiers of ovarian follicular endowment and development from studies of five inbred mouse strains. *Endocrinology* 144:9-12, 2003
- Takai Y, Canning J, Perez GI, Pru JK, Schlezinger JJ, Sherr DH, Kolesnick RN, Yuan J, Flavell RA, Korsmeyer SJ, Tilly JL: Bax, caspase-2, and caspase-3 are required for ovarian follicle loss caused by 4-vinylcyclohexene diepoxide exposure of female mice in vivo. *Endocrinology*. 144: 69-74, 2003

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数：0件（研究期間累積件数：0件）