

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名

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

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名（研究機関名・職名は研究参加期間終了時点）

研究代表者 堤 治 東京大学 大学院医学系研究科 教授（～平成15年6月）
（平成15年6月以降は研究総括が代表者を代行。研究取り纏め実務を百枝助手に委嘱）

主たる研究参加者 百枝 幹雄 東京大学 医学部産科婦人科学教室 助手

3. 研究内容及び成果：

内分泌かく乱物質（ED）は、微量でも体内の正常なホルモン環境に影響を及ぼし、野生生物に生殖異変を引起している事が知られている。一方、胎児期に母親を通して流産防止用薬 Diethylstilbestrol (DES) に曝露した女兒に生殖器癌が発生している事や、近年の不妊症、子宮内膜症等の増加傾向から、環境中の化学物質がヒトの生殖機能に悪影響を及ぼしている可能性が懸念されている。しかし、野生生物や実験動物で明らかにされた生殖機能への影響がヒトでも起こり得るのか否か、また、何らかの影響が起こり得るものとしても、その影響と体内負荷量との関係は未解明のままであるといっても過言では無い。

これらの背景から、本研究では①ED のヒト生殖器官への汚染状況・体内動態を疾患との関係で評価し、②ヒト培養細胞等を用いて作用機構を解明して、③生殖機能への無毒性量（NOAEL）、最小毒性量（LOAEL）を設定すると共に、④ED の体外排出除去法を開発する、事を目標とした。

本研究の成果概要は以下の通りである。

（1）ED の人体汚染状況及び哺乳類の生殖機能に及ぼす影響（堤グループ）

1）ビスフェノール A（BPA）のヒトへの汚染状況と体内動態

正常男性、正常女性、排卵障害を有する女性の空腹時血中 BPA 濃度を測定し、男性で有意に高く、ヒト血中 BPA 濃度には性差が存在し、血中アンドロゲン濃度と正の相関を示す事を明らかにした。ラットでも同様に雌雄差が認められ、雌の方のグルクロン酸抱合率が高い事が明らかになった。グルクロン酸抱合化酵素（uridine diphosphate-glucuronosyl transferase；UGT）の isoform である UGT2B1 の発現量が雌で有意に高く、代謝活性の性差に基づくものである事が示唆された。

2）BPA 及びダイオキシン類のヒト胎児への汚染状況と、その母児相関

BPA は胎児臍帯血、羊水からも検出され、経胎盤的な胎児への移行が確認された。母体血と臍帯血中の BPA 濃度には有意な正の相関が認められた。妊娠中期の羊水では他の体液の数倍の高濃度に濃縮されている事を明らかにした。

ダイオキシン類（PCDDs、PCDFs、Co-PCBs）の母体血と臍帯血中濃度に有意な正の相関が見られ、経胎盤的な胎児への移行が確認された。また、経産婦では初産婦よりダイオキシン濃度が低く、胎児移行及び母乳による汚染軽減が明らかになった。妊娠末期

の羊水脂肪成分中には、総ダイオキシン類、PCDDs、PCDFsが母体血よりも高レベルで蓄積されている事を明らかにした。Co-PCBsには有意な差は認められなかった。

ダイオキシン類は脂質成分中に高濃度に含まれ、肝臓より胆汁中に分泌されて、小腸で再吸収された後再び肝臓に蓄積される（腸肝循環）と推定されている。胆汁（肝内、胆嚢内、胆管内）中のダイオキシンを測定し、腸肝循環の動態を明らかにした。一日約1ng程度腸肝循環するダイオキシンの対外排出除去の試みとして、ボランティアによる薬用炭製剤及び高コレステロール治療薬の服用実験を行い、ダイオキシン汚染軽減の可能性を示した。

3) EDが初期胚発育など次世代に及ぼす影響

マウス2細胞期胚、着床期胚発育への影響を検討し、BPAは1-3nM（2細胞期胚）、5nM～10μM（着床期胚）の低濃度で発育促進を示すが、100μMの高濃度では発育抑制を示し、エストロゲン受容体（ER）を介する反応である事を明らかにした。ノニルフェノール（100nM～5μM）、オクチルフェノール（100nM～1μM）、フタル酸ジシクロヘキシル（1～10nM）、オクタクロロスチレン（1～5nM）、ベンゾフェノン（1～10nM）でも同様な効果が認められた。この結果は、所謂「逆U字現象」を示すものであり、「低用量問題」も含めたEDの評価法として、高い感度と再現性を示す有用な方法である事を示唆するものである。2細胞期胚にBPA（1nM～100μM）を曝露し、得られた胚盤胞を胚移植して新生仔の発育、生殖能を検討した結果、初期胚のBPAに対する感受性は高く、着床前曝露も次世代の発育に影響を及ぼす可能性が示唆された。

4) BPAが卵巣機能に及ぼす影響

卵胞の内側に位置する卵巣顆粒膜細胞は、排卵期以後に黄体化し、プロゲステロン産生能が高まり、受精卵の子宮着床に重要な役割を果たしているが、ヒト卵胞液中には平均10nM程度のBPAが存在するため、その影響が懸念される。ヒト卵巣顆粒膜細胞株を用いて検討し、BPAはそのアポトーシス作用により細胞増殖を抑制するが、一細胞当たりのプロゲステロン産生を亢進させる事を明らかにした。低濃度BPAでは見かけ上黄体機能に影響を及ぼさない様に見えるが、これは代償的な作用であり、高濃度ではアポトーシスが優位となって黄体機能低下に繋がる可能性が示唆された。現時点での卵胞液中濃度は黄体機能に影響を与える濃度ではないと思われるが、曝露量が増える事でいかなる変化が生じるかは今後の課題である。

5) 子宮内膜症発症メカニズムとEDの影響

子宮内膜症の頻度は増加の一途を辿り、国内の患者数は100～200万人と推定されている。初経の低年齢化や少子化、出産の高齢化等、女性のライフスタイルの変化と関連していると言われているが、ダイオキシン汚染との因果関係が注目されている。体重当たり0.1ng強という極微量である点でも注目され、ダイオキシンでヒトに何らかの影響が出るとすれば、子宮内膜症が第一候補になるとも考えられている。子宮内膜症患者の皮下脂肪中ダイオキシン濃度は重症患者で高い傾向を示したが、母乳保育との関連性は否定された。患者腹腔内貯留液中の抗血管新生物質（interferon-induced protein；IP-10）が進行内膜症で有意に低下している事、血管新生抑制薬はマウス子宮内膜症モデルの病巣を縮小させる傾向にある事を明らかにした。マウスモデルにおいて、BPAのエストロゲン様作用は10mg/kg/dayで最も強く、用量依存的に「逆U字型」を示す事、子宮

内膜病変を誘導する事を明らかにした。

(2) エストロゲン作用分子機構の解明 (百枝グループ)

正常ヒト精巣由来mRNA から ER β エクソン 5 を欠失した変異体(ER β Δ 5)を見出し、核で ER α 、 β の両者を抑えるドミナントネガティブ体として機能しており、遺伝子導入ラットは骨量を指標としたエストロゲン治療に抵抗性を示す事を明らかにした。骨芽細胞における ER の新たな分子標的として、D 型サイクリン遺伝子を同定した。ラット妊娠子宮で発現が上昇する遺伝子として、新たに sFRP4 を見出した。sFRP4 は、子宮形成・機能に重要であると考えられている、Wnt シグナルの負の調節因子と想定されており、リン酸代謝や骨細胞分化過程にも関与することから、内分泌かく乱物質の新たな標的として興味を持たれる。

4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

産婦人科医としての立場から、母体血、母乳、羊水、臍帯血等の試料を用いて、胎児汚染の実態を明らかにした。本研究により、母体・胎児汚染、汚染経路、胎児肝機能の重要性等々が明らかになった。臨床試料を用いて母体や胎児の汚染状況を明らかにした社会的インパクトは極めて大きい。類似研究は世界的にも少なく、「内分泌かく乱物質問題」を考える上で貴重な情報源となろう。

マウス初期胚を用いた化学物質影響評価法を確立し、複合曝露での相加的效果を明らかにすると共に、発生初期に従来知られていない程の低濃度で内分泌かく乱作用を示す、所謂「低用量効果」についてその意味と実態をある程度明らかにする事が出来た。特にBPA等の低用量効果については、当初予期したものではなく、大きなインパクトを与える成果と言えよう。また、子宮内膜症モデルを用いてBPAが子宮内膜症病変を誘導する事等も明らかにしている。臨床的研究を直ちに動物を用いて検証している研究レベルは高く、この研究手法は全てのEDに適用可能であり、今後の発展・展開を期待したい。

研究成果は論文(国内51報、海外45報)、学会(国内74件、国際学会28件)発表されている。

学術的成果は主として内分泌学関連の質の高い国際誌で発表されているが、邦文の論文、総説、解説等も数多く、多数の講演と共に「内分泌かく乱物質問題」の啓蒙的役割を果たした功績は大きい。実質4年間の成果としては充分と言えるが、研究費の使用方法をめぐって研究に専念出来ない事態を招いた事は残念である。

4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

社会的に極めて関心の高い分野であり、ヒトでの汚染状況を明らかにし、その作用機構を解明する手段を提供した功績は大きい。世界的な論争の的となっている「低用量問題」に関連する研究成果は、「内分泌かく乱物質問題」の本質の理解とその解決に大きく貢献するであろう。また、ダイオキシンの体外排出除去の試みや、子宮内膜症に関連する研究成果は、臨床医学の観点からも重要であり、今後の発展・展開が期待される。諸般の事情で、

「生殖機能への無毒性量、最小毒性量を設定する」という初期の構想を実現する段階まで研究を深めることが出来なかった事は残念である。

開発されているモデル系（初期胚を用いた化学物質評価系や子宮内膜症モデル等）は、内分泌かく乱物質関連研究ばかりでなく、生物学、薬学、医学等々、様々な研究分野にも応用展開が可能であり、今後のさらなる発展を期待したい。

4-3. その他の特記事項（受賞歴など）

堤研究代表者は、不適切な経理処理の問題から、本務である東京大学において停職の処分を受けた。

その為、平成16年6月以降は、研究総括が研究代表者を代行して研究を完遂させた。誠に遺憾な事態であると同時に、研究を深化させるべき時期に研究チームが十全の体制で臨めず、研究進捗に重大な影響を及ぼし、後一息に迫っていた研究目標達成にまで至らなかった事は誠に残念である。