

平成 13 年度 厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

内分泌かく乱化学物質に関する生体試料（さい帯血等）分析法の開発と
その実試料分析結果に基づくヒト健康影響についての研究

環境中のホルモン様物質の胎児・胎盤特異的遺伝子発現への影響

主任研究者：	牧野 恒久	東海大学教授
分担研究者：	塩田 邦郎	東京大学教授
研究協力者：	横田 博	酪農学園大学助教授

研究要旨

胎児期の内分泌かく乱化学物質の作用を解析するためには、母体・胎盤・胎児における化学物質の代謝解毒反応を詳細に明らかにすることが求められる。そこで我々は、化学物質の妊娠期での代謝、および、内分泌かく乱物質による器官形成への影響を明らかにする事を目的とした研究をおこなった。その結果、子宮組織が薬物のバリエーションとして機能していることが示唆されるとともに、子宮脱落膜への内分泌かく乱物質の作用が二次的に胎盤形成に影響を及ぼす可能性が示された。

A. 研究目的

薬物は、体内に取り込まれた後、主に肝臓で様々な代謝を経て排泄される。胎児期における内分泌かく乱物質の作用機序の解明や毒性を評価するためには、母体から胎盤を通して胎児に到達するまでの各臓器での代謝反応および内分泌かく乱物質による細胞分化への影響を明らかにしてゆくことが必要である。そのため、本年度は、胎児への最も重要なバリエーションと考えられる子宮・胎盤組織や、生殖巣での化学物質の代謝と動態の解析に着手した。また、ベンゾ[a]ピレン（以下、BaP）を例に取り、胎盤形成におよぼす影響を *in vivo*、*in vitro* の両面の解析から検討した。

B. 研究方法

B-1 胎盤、精巣、および子宮を用いた臓器灌流による解毒活性測定系の確立

ラット胎盤、精巣、および子宮をビスフェノール A (BPA) 溶液で灌流し、回収した灌流液中の代謝物を調べることで BPA の代謝・動態を解析する化学物質灌流システムの確立を試みた。

B-2 子宮・胎盤組織における化学物質代謝・解毒酵素の局在解析

ラット臓器あるいは組織からミクロゾームを調整し、1-ナフトールを基質とした UDP-グルクロン酸抱合活性の測定、 β グルコニダーゼ活性の測定、および、抗 UDP-グルクロン酸抱合酵素 (UGT) を用いたウェスタンブロッティング法により、化学物質代謝・解毒酵素の局在を解析した。

B-3 BaP の胎盤形成および胎児発生への影響の解析

妊娠雌マウス (ICR 系統) の腹腔に、妊娠 6.5 日目および 7.5 日目の二度、体重 1kg 当たり 1~10 mg の BaP を注射した。その後、一部は妊娠 8.5 日目に胎児を含む子宮脱落膜組織を採取し、*in situ* ハイブリダイゼーション等の解析に供した。また、一部はそのまま妊娠を継続させ、出産時の新生児体重やその後の経時的な体重変化を測定した。

B-4 BaP の胎盤細胞分化への作用の解析

1~10 μ M の濃度の BaP 存在下で栄養膜幹

細胞 (TS 細胞) を培養し、各種分化栄養膜特異遺伝子をプローブとして用いたノーザンハイブリダイゼーションにより、胎盤を構成する栄養膜細胞の分化に対する BaP の影響を検討した。

C. 研究結果

C-1 臓器灌流系による解毒活性の測定

胎盤の灌流システム確立には困難を極め、精巣についても年度内でのシステムの確立には至らなかった。子宮については、灌流システムの確立に成功した。

C-2 子宮・胎盤組織における化学物質代謝・解毒酵素の局在解析

ミクロゾームの活性解析の結果、母体側の子宮組織に UGT 活性が認められたが、胎児側胎盤ではほとんど検出されなかった。また、ウェスタンブロッティングにおいても UGT1A6 が子宮組織で検出された。UGT2B1 についても同様であった。グルクロン酸抱合体を分解してもとの薬物に戻す酵素である β -グルクロニダーゼもまた、母体側子宮組織で活性が認められ、それよりは弱い、胎児側胎盤でも活性が検出された。

C-3 BaP の胎盤形成および胎児発生への影響の解析

BaP 投与群では、用量依存的に新生児の発育に遅延がみられた。妊娠 8.5 日目に採取した子宮・胎盤組織を解析した結果、胎盤の海綿状栄養膜細胞と呼ばれる分化栄養膜細胞の数が、BaP 用量依存的に減少している像がみられた。また、BaP によって誘導されることが知られている CYP1a1 遺伝子の発現が、母体脱落膜組織、および、胎児において認められた。

C-4 BaP の胎盤細胞分化への作用の解析

TS 細胞では、BaP の受容体である AhR が未分化・分化状態に関係なく発現しており、常に BaP に対する感受性はあると考えられた。しかし、BaP による CYP1a1 の発現誘導は、分化 TS 細胞のみで起こることが判明した。また、BaP 存在下においても、TS 細胞の増殖や分化に顕著な差はなく、特に、in vivo への投与実験で観察されたような海綿状栄養膜細胞の現象も起こらなかった。

D. 考察

子宮組織で UGT が発現し、胎児に対する薬物のバリエーションとして機能していることが予測される。しかし、同時に、グルクロン抱合により無毒化された物質を代謝し活性化してしまう β -グルクロニダーゼの活性が子宮および胎盤で検出されたことは、せっかく無毒化された内分泌かく乱物質が、再度活性化された状態で胎児へと移行する可能性を示唆するもので、胎児発生への影響を考える上で非常に重要な知見である。

BaP の妊娠マウスへの投与は、致死的ではないにせよ、胎盤の形成異常を引き起こした。TS 細胞を用いた解析では、この影響は栄養膜細胞に対する直接的な作用の結果ではないことが示唆された。我々は、昨年度までの研究結果で、子宮組織で産生されるレチノイン酸に、海綿状栄養膜細胞の分化を抑制する効果があることを示した。BaP によって誘導される CYP1a1 には、生体内でのレチノイン酸産生活性があることも報告されている。本研究で観察された BaP 投与による海綿状栄養膜細胞の減少は、子宮脱落膜組織での BaP による CYP1a1 の発現誘導を介した、二次的な影響であることが考えられる。

未分化 TS 細胞で、BaP 存在下でも CYP1a1 の発現誘導が起こらなかったことは、未分化 TS 細胞に、AhR を介した内分泌かく乱作用を抑制するような機構が備わっている可能性を示し、内分泌かく乱物質の細胞レベルでの作用機序を解明するうえで興味深い。

E. 結論

BaP 投与実験では、胎児内でも CYP1a1 の発現誘導が認められ、BaP が直接胎児まで届いていることを、強く示唆した。子宮・胎盤での β -グルクロニダーゼ活性の存在をもあわせて考えると、胎盤は内分泌かく乱物質のバリエーションとしては、さほど効率的には機能できないのかもしれない。

BaP の胎盤発生への影響解析では、in vivo, in vitro の両面から研究を行うことの意義が改めて確認できた。すなわち、TS 細胞への顕著な影響が見られなかったことから、BaP の胎盤形成への影響は、胎盤を構成する栄養膜細胞に対する直接的なものではなく、

母体組織への影響を介した二次的でないものであるということを示唆することができた点に意義がある。同様の研究を進めてゆくうえで、TS細胞は有用なシステムである。

将来これらの結果をヒトへと外挿するために、ヒト UGT 分子種の単離・同定および基質特異性や発現解析が必要であり、それらが今後の課題である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) J. Yan, S. Tanaka, M. Oda, T. Makino, J. Ohgane and K. Shiota. Retinoic acid promotes differentiation of trophoblast stem cells to a giant cell fate. *Developmental Biology* 235: 422-432, 2001.
- 2) H. Inoue, H. Yokota, T. Makino, A. Yuasa and S. Kato. Bisphenol A Glucuronide, a Major Metabolite in Rat Bile after Liver Perfusion. *Drug Metab Dispos* 29: 1084-1087, 2001.

2. 学会発表

- 1) J. Yan, S. Tanaka, M. Oda, J. Ohgane and K. Shiota. Retinoic acid promotes differentiation of trophoblast stem cells to a giant cell fate. 14th International Congress of Developmental Biology (平成 13 年 7 月)
- 2) 阪本浩和、横田博、佐山義克、湯浅亮「ラット消化管内における Bisphenol A のグルクロン酸抱合と脱抱合」第 4 回日本内分泌攪乱化学物質学会 (平成 13 年 12 月)
- 3) 大道寺智、横田博、井上博紀、加藤清雄、湯浅亮「ノニルフェノール肝蓄積によるエストラジオールの代謝・排泄の攪乱」第 4 回日本内分泌攪乱化学物質学会 (平成 13 年 12 月)
- 4) H. Inoue, G. Yuuki, H. Yokota, T. Onaga and S. Kato. Bisphenol A Glucuronidation and Absorption in Rat Intestine. 第 4 回日本内分泌攪乱化学物質学会 (平成 13 年 12 月)
- 5) 牛頭圭介、横田博、斉藤昌之、湯浅亮「PCB

水酸化体のラット肝ミクロゾーム及び UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) 分子種によるグルクロン酸抱合」第 4 回日本内分泌攪乱化学物質学会 (平成 13 年 12 月)

6)

H. 知的財産権の出願・登録状況
該 当 な し

平成13年度 厚生科学研究補助金（生活安全総合研究事業）
協力研究報告書

内分泌かく乱化学物質に関する生体試料（さい帯血等）分析法の開発と
その実試料分析結果に基づくヒト健康影響についての研究

生体試料採取に関する報告（周産期関連）

主任研究者	牧野恒久	東海大学
研究協力者	岩崎克彦	東海大学
	和泉俊一郎	東海大学

報告要旨

生体試料採取にあたっては、母子関係を重視し、母体側試料と、その母体より出生した新生児側試料を関連づけて採取した。母体側からは、母体血、母乳を、新生児側からは臍帯血を基準試料としたが、各研究機関の要望により、母体側毛髪、臍帯、胎脂等を追加採取し、発送した。同時に生体試料提供協力者の身体的、社会的、環境的背景を記録し、疫学的分析の資料とした。

A. 生体試料採取目的

内分泌かく乱物質の妊婦および胎児・新生児への影響は、単独試料による分析だけでは不十分であり、母子の一連の試料のもとに、母体側暴露状態と、妊娠中の胎児への移行を分析する必要がある。そこで、本研究に使用する試料の採取にあたっては、母体側試料と、その母体より出生した新生児の試料を採取し、母子両者の分析結果比較が可能になるよう条件を設けた。

次に、母体側環境、例えば妊娠経過、その間の食生活、嗜好、また、住居付近の生活環境等にも配慮し、疫学的分析の資料とした。

B. 方法

東海大学医学部附属病院産科外来において、研究目的の十分なインフォームドコンセントを行い、承諾の得られた患者より、全例同意書を得た。

分娩時、母体血 20ml、臍帯血全量を採取し、すぐに遠沈し、血清をマイナス 4℃で保存した。採取にあたっては、採取器具からのコンタミネーションを防止するために、本研究開始時の基礎実験の結果に基づいて施行した。母乳採取は分娩 4 日目と 5 日目に可能な限りの量を採取し、マイナス 4℃にて保存した。また、分析対象の補充を試みるべく、各研究機関からの依頼

を受けて、必要に応じて母体毛髪、臍帯、胎脂等の採取を行った。

C. 結果

平成 11 年度および 12 年度の採取生体試料の一覧を表示する(表 1, 2)。各試料は要望のあった研究機関に発送し、分析が行われた。報告書にみられる IW ナンバーの試料はこの表が基準となっている。

D. 考察

妊婦が研究に協力的であったことは、テレビ、ラジオ、雑誌等のマスコミの影響と、妊婦自身の関心の高さによるものと考えられた。

生体試料のバラツキの多さが認められたが、このことはある一定数の試料を準備するにあたっては、その 1.5 ～ 2 倍数の症例数が必要であることを意味し、今後の目安としたい。

今後は各研究機関からの分析結果を参考にしながら、疫学的検討をふまえて報告したい。

E. 結論

生体試料採取の実際を試みた。予測に比べ特に母乳採取と胎脂採取に個人差が大きいことが判明し、どれ位の量の生体試料であれば分析が可能であるかを検討して今後の課題としたい。

1999年度 母体血・臍帯血・母乳等 採取一覽

症例	名前	年齢	妊娠 分娩歴	身長	分娩時 体重	分娩 週数	児体重	性別	母体血	臍帯血	母乳	住所
1	TK	24	1—1	158	58.5	38—3	2780	♀	7.0	34.0	50	秦野市
2	HS	34	2—0	161	59.6	39—1	2770	♀	8.0	15.0	50	平塚市
3	KS	33	2—2	156	62.0	38—3	2755	♂	6.0	13.0	50	厚木市
4	KM	27	0—0	160	53.0	37—3	3005	♂	未測定	未測定	未測定	海老名市
5	EN	35	0—0	159	71.0	40—1	3390	♀	未測定	未測定	未測定	秦野市
6	TE	29	1—1	162	63.0	38—3	2915	♂	9.0	15.5	50	小田原市
7	SS	36	5—1	167	66.0	38—2	2635	♀	6.5	10.5	50	伊東市
8	MH	26	0—0	160	60.0	37—2	2770	♀	7.0	29.0	50	仙台市
9	NF	35	2—1	158	59.5	38—2	2905	♀	7.0	16.0	50	厚木市
10	NK	29	0—0	162.8	66.5	40—0	3075	♀	7.6	18.5	50	平塚市
11	NF	29	0—0	158	64.4	39—5	2810	♂	10.0	9.0	50	秦野市
12	JK	30	2—1	160	56.0	38—6	2990	♀	9.0	13.0	45	秦野市
13	MT	30	3—2	154.5	56.2	38—3	2525	♂	9.0	13.5	50	厚木市
14	MI	35	2—2	154	51.6	40—6	2920	♀	8.0	13.5	50	秦野市
15	NY	36	0—0	163	59.8	38—3	2800	♂	8.0	6.0	50	平塚市
16	MK	30	3—0	161	62.0	40—5	2980	♀	5.5	18.4	30	伊勢原市
17	AS	36	0—0	163	58.0	38—1	2855	♀	5.4	5.5	未測定	伊勢原市
18	NM	38	0—0	157	61.5	40—1	3642	♀	8.0	4.0	未測定	厚木市
19	KY	32	1—1	163	60.5	38—6	3170	♀	5.0	5.9	50	川崎市
20	ST	24	1—0	160	56.6	38—6	2955	♀	2.0	8.5	50	伊勢原市
21	YT	39	1—1	150	61.0	38—6	3420	♀	7.5	17.0	50	伊勢原市
22	YO	38	2—2	164	62.0	38—5	2890	♀	5.2	17.0	40	藤沢市
23	HK	39	3—2	156.5	62.4	38—0	2825	♂	5.0	10.0	30	秦野市
24	YF	20	0—0	156	56.0	39—0	2755	♀	7.3	13.5	未測定	伊勢原市
25	MM	31	1—1	162	60.8	37—4	2620	♀	6.3	13.7	50	厚木市
26	MA	29	0—0	149	55.0	41—1	3230	♀	7.2	16.8	未測定	伊勢原市
27	MM	31	1—1	158	48.2	38—6	2440	♀	8.5	10.0	60	厚木市
28	YN	31	3—1	152	59.0	39—1	3380	♂	6.0	6.0	10	厚木市
29	YA	28	0—0	162	60.0	38—5	3405	♂	8.5	14.0	5	平塚市
30	HS	33	2—2	163	62.8	38—1	3095	♀	10.0	20.0	50	厚木市
31	KY	29	0—0	161	61.0	39—1	2945	♀	6.0	7.0	10	伊勢原市

症例	名前	年齢	妊娠 分娩歴	身長	分娩時 体重	分娩 週数	児体重	性別	母体血	臍帯血	母乳	住所
32	SK	32	1—1	160	63.0	38—3	3090	♀	7.0	9.5	未測定	綾瀬市
33	RK	27	1—1	163	58.0	38—3	3070	♀	5.0	8.0	35	厚木市
34	CY	31	0—0	151	54.6	38—1	2930	♂	8.0	17.0	20	海老名市
35	AO	28	0—0	146	48.4	39—5	3235	♀	5.0	10.0	未測定	伊勢原市
36	MN	25	0—0	153	55.0	40—0	2835	♀	4.5	未測定	未測定	伊勢原市
37	YT	32	1—1	168	65.0	38—2	3590	♀	7.2	22.0	50	伊勢原市
38	JK	37	1—1	155	66.0	38—1	3355	♂	8.0	15.0	50	伊勢原市
39	HI	23	0—0	152	59.0	38—4	3030	♂	7.0	23.0	50	茅ヶ崎市
40	HF	26	1—0	160	56.5	38—4	2950	♀	7.0	17.0	未測定	平塚市
41	KN	36	1—0	154	49.0	39—6	2780	♀	6.0	19.0	10	小田原市
42	YS	27	0—0	167	60.6	39—3	2715	♂	8.0	9.0	30	伊勢原市
43	EJ	35	3—3	158	65.0	39—5	3050	♂	6.5	11.5	50	伊勢原市
44	MH	29	1—1	161	72.0	38—5	2920	♂	8.0	18.0	5	綾瀬市
45	YS	32	2—1	158	59.5	38—0	2330	♂	8.0	8.0	50	秦野市

2000年度 母体血・臍帶血・母乳等 採取一覽

症例	名前	年齢	妊娠 分娩歴	身長	分娩時 体重	分娩 週数	児体重	性別	母体血	臍帶血	母乳	臍帶	胎脂	母体 毛髪	住所
1	RI	30	0-0	160	54.1	39-3	2985	♀	○	○	○	○			相模原
2	MH	32	2-1	157	60.0	39-1	2970	♂	○	○		○	○		秦野
3	YS	30	3-0	162	65.9	40-2	3095	♂	○	○		○	○		伊勢原
4	MS	30	0-0	156	57.5	38-6	3065	♂	○	○		○	○		秦野
5	KS	41	6-1	156	52.5	38-1	2820	♀	○	○		○	○		秦野
6	TO	31	2-0	163	69.8	37-2	3085	♂	○	○	○	○	○		茅ヶ崎
7	ST	30	1-1	164	64.5	39-1	2500	♀	○	○	○	○			藤沢
8	TT	33	2-2	157	57.0	37-3	2916	♀	○	○		○	○		厚木
9	CY	27	1-0	156	50.0	38-5	2505	♀	○	○	○	○	○		伊勢原
10	AI	29	0-0	155	54.7	38-1	2695	♀	○	○	○	○			座間
11	JK	36	2-1	158	61.5	39-1	3020	♂	○	○	○	○			相模原
12	YS	28	1-1	161	60.0	39-5	2800	♀	○	○	○	○			横浜
13	MW	25	1-1	164	58.6	39-0	2955	♀	○	○	○	○	○		二宮
14	YY	28	2-1	154	65.0	39-1	2630	♀	○	○	○	○	○		秦野
15	EI	34	1-0	160	72.0	39-3	2880	♀	○	○	○	○	○		厚木
16	AS	36	0-0	153	59.0	41-1	3245	♀	○	○	○	○			伊勢原
17	MH	31	5-1	161	61.5	38-4	3065	♂	○	○		○	○		小田原
18	YY	32	1-0	164	62.0	38-5	2775	♂	○全血	○	○	○		○	伊勢原
19	MA	39	3-1	160	65.9	38-4	3385	♂	○	○	○			○	伊勢原
20	AS	27	0-0	163	62.0	39-2	3035	♂	○	○	○				海老名
21	HS	27	1-0	168	68.2	40-2	3530	♀	○全血	○	○	○		○	伊勢原
22	TS	32	0-0	157	58.0	40-1	2810	♀	○全血	○	○	○		○	秦野
23	MA	25	0-0	152	63.7	39-5	2755	♂	○	○	○	○			厚木

20010949

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
P171-P173「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
木津良一, 鳥羽 陽, 早川和一	多環芳香族炭化水 素 (PAH) の環境残 留とヒトへの曝露	日本化学会	化学総説 No. 50 内分泌かく乱物 質研究の最前線	学会出版 センター	日本	2001	187-192
鳥羽 陽, 木津良一, 早川和一	多環芳香族炭化水 素 (PAH) およびそ の代謝物の分析法	日本化学会	化学総説 No. 50 内分泌かく乱物 質研究の最前線	学会出版 センター	日本	2001	133-139

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Toriba, A., Kizu, R., Makino, T., Nakazawa, H. K. Hayakawa, et al.	Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in human hair by HPLC with fluorescence detection: A biological monitoring method to evaluate the exposure to PAHs.	Atmos. Environ.			submitted
Chetianukornkul, T., Toriba, A., Kizu, R., Makino, T., Nakazawa, H., Hayakawa, K.	Determination of 1-Hydroxypyrene in Human Urine by HPLC with Fluorescence Detection Using a Deuterated Internal Standard.	J. Chromatogr. A			2002 in press
唐 寧, 鳥羽 陽, 木津良一, 早川和一 et al.	ウラジオストク, 富山及び金沢にお ける大気中多環芳香族炭化水素の比 較	日本海域研究	33		2002 in press
Tang, N., Toriba, A., Kizu, R., Hayakawa, K. et al.	Comparison of Atmospheric Nitropolycyclic Aromatic Hydrocarbons in Vladivostok, Kanazawa and Toyama.	J. Health Sci	48(1)	1-7	2002

Hatanaka, N., Yamazaki, H., Kizu, R., Hayakawa, M., Nakajima, M., Yokoi, T., et al.	Induction of Cytochrome P450 1B1 in Lungs, Livers, and Kidneys of Rats Exposed to Diesel Exhaust.	Carcinogenesis	22(12)	2033- 2038	2001
Hirose, T., Morito, K., Kizu, R., Toriba, A., Hayakawa, K., Masamune, Y.	Estrogenic/Antiestrogenic Activities of Benzo[a]pyrene Monohydroxy Derivatives.	J. Health Sci.	47 (6)	552-558	2001
Hayakawa, K., Noji, K., Tang, N., Toriba, A., Kizu, R.	A High-Performance Liquid Chromatographic System Equipped with Reducer and Concentrator Columns for Determination of Trace Levels of Nitropolycyclic Aromatic Hydrocarbons in Extracts from Diesel-Engine Exhaust Particulates.	Anal. Chim. Acta	445	205-212	2001
Murahashi, T., Hayakawa, K.	Determination of Nitroarenes in Precipitation Collected in Kanazawa.	Water Res.	35 (14)	3367-33 72	2001
Kakimoto, H., Toriba, A., Kizu, R., Hayakawa, K. et al.	Considerations of Atmospheric Behaviors of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Nitropolycyclic Aromatic Hydrocarbons and Inorganic Pollutants Based on Their Interrelationships.	J. Health Sci.	47 (4)	385-393	2001
Y. Sun, M. Wada, N. Kuroda, K. Hirayama, H. Nakazawa, K. Nakashima	Simultaneous determination of phenolic xenoestrogens by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection	Anal. Sci..	17	697-702	2001

T. Watanabe, H. Yamamoto, K. Inoue, A. Yamaguchi, Y. Yoshimura, K. Kato, H. Nakazawa, N. Kuroda, K. Nakashima	Development of sensitive high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using 4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl)b enzoyl chloride as a labeling reagent for determination of bisphenol A in plasma sample	J. Chromatogr. B	762	1-7	2001
J. Yan, S. Tanaka, M. Oda, T. Makino, J. Ohgane, K. Shiota	Retinoic acid promotes differentiation of trophoblast stem cells to a giant cell fate	Developmental Biology	235	422-432	2001
H. Inoue, H. Yokota, T. Makino, A. Yuasa, S. Kato	Bisphenol A Glucuronide a Major Metabolite in Rat Bile after Liver Perfusion	Drug Metab Dispos	29	1084- 1087	2001