

論文 要旨

生殖加齢発達医学

41-97417

生月弓子

内分泌攪乱物質のヒト生殖器官、胎児への曝露状況に関する研究

Estrogen Receptor-mediated Effects of a Xenoestrogen,
Bisphenol A, on Preimplantation Mouse Embryos

内分泌攪乱物質ビスフェノールAの Maus 初期胚発育に及ぼすエストロゲンレセプターを介した影響

緒言

内分泌攪乱化学物質いわゆる環境ホルモンは微量でもエストロゲン作用や逆の抗エストロゲン作用などを有し、正常なホルモンの働きを障害する。そこでエストロゲンの働きが大切な排卵、受精、胎児の発育という女性生殖機能への影響や子宮内膜症の発生、精子減少による男性生殖機能低下との関連が危惧される。我々はこれまでに Maus 2細胞期胚を用いて内分泌攪乱物質の1つであるダイオキシンの胚発育への影響を検討し、報告している。即ち、ダイオキシン (2,3,7,8-TCDD) を 1-5 pM 添加した時、2細胞期の8細胞期への発育率は有意に抑制されたが、この作用は 10-100pM では検出されなかった。一方、8細胞期胚の胚盤胞への発育率を観察するとダイオキシン胚盤胞形成に促進的に作用した。これよりダイオキシンの胚発育に対する作用は胚発育時期に特異的にかつ特定の濃度域で抑制的ないし促進的に作用することが示唆された。

ビスフェノールA (BPA) は、ポリカーボネイト樹脂等の原料として広く使用されているが、エストロゲンレセプター (ER) に結合するため、ダイオキシン同様内分泌攪乱物質としての作用が注目ないし危惧されている。これまでも、ラット子宮・腔の細胞増殖促進作用 (300ng/g・day)、母獣投与による仔 Maus の精子産生減少 (20ng/g・day)、ラット下垂体細胞におけるプロラクチン分泌促進作用 (0.1-1.0 μ M)、ER_α あるいは ER_β 発現培養細胞における転写活性促進作用 (100-1000nM) などが報告されている。更に最近、環境中の曝露量とほぼ等しい低用量の BPA の母獣への投与により、雄胎仔における出生後の前立腺の肥大

や、雌胎仔における発育や性成熟の促進を引き起こすことが報告され、低用量のBPAが胎仔に及ぼす影響に関して強く注目されるようになった。我々は既にマウス初期胚にER α およびER β が発現することを認めて報告しているが、今回、BPAが初期胚発育に及ぼす影響を明らかにしようとした。

方法

5-7週齢B6C3F1マウスをPMSGおよびhCGにて過排卵刺激後交配させ、hCG投与の40時間後に2細胞期胚を採取した。更に、得られた胚を1pMから100 μ MまでのBPAあるいはER阻害剤であるtamoxifen (100nM)存在下に培養し、24時間後と48時間後にそれぞれ8細胞期胚形成率と胚盤胞形成率を算定し、 χ^2 乗検定により解析した。培養にはフェノールレッド不含のBrinster's BMOC3培地(Gibco BRL社)を用いた。得られた胚盤胞はHoechst33258で核染色し、細胞数を算定した。

2細胞期胚から72時間培養後の拡張胚盤胞をBPA含まないF0-CMRL培地で培養し、48時間後のtrophoblast spreading(栄養胚盤胞の広がり)をコンピュータによる画像解析により定量した。

結果

2細胞期胚からの8細胞期胚形成率は、対照(BPA:0)の88.0%に対して、3nM BPA存在下では94.0%と有意に増加した。また、2細胞期胚からの胚盤胞形成率は、対照(BPA:0)の58.7%に対して1nM、3nMでそれぞれ69.0%、69.2%と有意な発育促進効果が認められた。一方、100 μ M BPAでは31.2%と有意に発育が抑制されたが、8細胞期胚形成率は対象と差がなかった。10nMから10 μ Mでは促進効果も抑制効果も認められなかった。

1nMおよび3nM BPA存在下における胚盤胞への発育促進効果はER阻害剤である100nM tamoxifenの添加で有意に抑制された(49.1%および52.1%)。一方、100 μ M BPA存在下における発育抑制効果は、tamoxifenにより消失した(72.4%)。tamoxifen単独では促進効果も抑制効果も認められず、8細胞期胚への発育率はtamoxifenより影響を受けなかった。

得られた胚盤胞は形態的に差がなく、細胞数は対照、1nM、3nM、100 μ Mで差がなかった。他方、BPA曝露下に得られた拡張胚盤胞をBPA非存在下に48時間培養してtrophoblast spreadingを観察したところ、対照、1nM、3nMでは差がなかったが、100 μ M BPA存在下に得られた胚盤胞ではtrophoblast spreadingが有意に増大した。

考察

BPAは高濃度(100 μ M)では初期胚発育を抑制するが、従来報告されているよりはるかに低濃度(1-3nM)で初期胚発育を促進した。この発育促進効果はtamoxifenにより抑制され、更にER α およびER β が初期胚に発現していることからERを介することが推測され、胚への内分泌攪乱物質としての作用が無視できないことが示唆された。

BPA に曝露された初期胚は形態的には差がなく、細胞数にも有意差は認められなかった。しかしながら、得られた胚盤胞の trophoblast spreading を観察することによって質的な差異を検討したところ、高濃度 (100_M) の BPA に曝露された初期胚でむしろ発育能が高いという結果が得られた。これにより BPA が胚盤胞の着床後の発育に影響を及ぼす可能性が示唆されたため、現在、胚盤胞の胚移植により得られた新生仔の発育や生殖機能について検討を進めている。

我々ヒトは多量の BPA に曝露されており、我々の最近の検討では血清や卵胞液中からも nM レベルの BPA が検出されている。今回、これとほぼ等しい濃度 (1-3nM) でマウス初期胚の発育に影響を及ぼすことが示されたことは、今後の内分泌攪乱物質の研究において重要な意義を持つものといえる。