

1. 内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）のヒト生殖・妊孕性 ならびに母児に及ぼす影響に関する研究

研究代表者 住吉 好雄（神奈川県労働衛生福祉協会理事，婦人科部長
横浜市立大学客員教授）

研究分担者 平原 史樹（横浜市立大学産婦人科教授）

【研究要旨】

平成 11 年度より、本邦の女性・妊娠女性ならびに新生児における内分泌かく乱化学物質の存在につき検討を試みるため、本研究を行った。

平成 15 年度までの研究により、いずれの臍帯血中のビスフェノール A 濃度も母体ビスフェノール A に比し、高値を示す一方、非妊娠女性のビスフェノール A 値は、妊娠女性に比し高値を示す傾向のあることが示されており、今年度の調査研究でもこの傾向が確認された。

本研究では、大量サンプルの測定に適した ELISA 法を用いた。全標本の測定値を評価対象として標準化するために、平成 16 年度は、HPLC 法との比較を行い、ELISA 法の妥当性とその測定精度を検討した。まず、サンプル測定法としてのバリデーションを行い、その結果、BPA キットの BPA の回収率は良好な回収率を示し、 β -グルクロニダーゼ処理の場合には回収率は上昇した。また、BPA のグルクロン酸抱合体を用いた試験では、BPA キットは未変化体の BPA に加え、抱合体にも反応することが示唆された。これが、HPLC 法により測定される未変化体のみとの解離の原因と推察された。よって、ELISA 法による測定値は、あくまで同一アッセイ間での比較は可能な相対的な値として扱われるべきであると考えられた。ポリフェノール類との交差反応性に関しては、交差反応性はほとんど示していないと判断された。

さらにこれらの検討評価をふまえ、データの再検討を行い、ヒト妊娠におけるビスフェノール A 値は妊娠期に低下すること、臍帯血では高値を呈すること、尿道下裂児を出産した母体の測定値は正常児出産歴のある母体の測定値と比較して有意差はないことが判明した。

【研究協力者】

高橋 恒男	横浜市立大学市民総合医療センター母子医療センター
山中美智子	神奈川県立こども医療センター周産期科長
有菌 幸司	熊本県立大学教授
大久保賢治	東レリサーチセンター
井口 詔雄	東レリサーチセンター
臼杵 靖晃	大塚製薬
黒木 良和	川崎医療福祉大学教授
黒澤 健司	神奈川県立こども医療センター科長

A. 研究目的

内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）が内分泌機能を攪乱することによりヒトの生殖機能、先天異常発生、疾病の誘引などに関与している可能性が動物実験の結果から指摘

されている事から、先天異常発生症および胎児の曝露によるその後の影響を明らかにすることを目的として本研究は始められた。ビスフェノール A (BPA) は、代表的内分泌攪乱化学物質の一つといわれ、1930 年代に Dodds によってエストロゲン様薬物として、ジエチルstilbestrol (DES) と同様に合成されたもので、その後ポリカーボネイト樹脂の原料としてポリカーボネイト製プラスチック、歯科用シーラント（密閉剤）、食品や飲料の缶詰の缶の内面塗装樹脂などとして数多く商業用に利用されている。

ビスフェノール A の生体に及ぼす影響に関しては、Frederic S. vom Saal（フォンサー）教授らのマウスの実験で、低濃度でも胎児の脳や生殖器官に影響を及ぼすという報告がある。従ってそれらの胎児期曝露の影響に関する研究は極めて大切である。本研究では、近年可能となった微量サンプルによるビスフェノール A ELISA 測定法の妥当性、精度を検討し、大量サンプル測定解析に適した分析手法を検討することを目的とした。用いた ELISA システムはエコアッセイ®ビスフェノール A ELISA キット（以下「BPA キット」）であり、以下の測定法の評価試験を実施した。またこれらの結果を踏まえた上で、すでに測定されたヒトサンプルにおけるビスフェノール A 値とその意義の検討をあわせ目的とした。

B. 研究方法

1. BPA キットの抽出方法の妥当性に関する検討

①抽出方法

血中からのビスフェノール A（以下「BPA」）の抽出方法は、Oasis HLB カラムを用いた固相抽出法を用いている。すなわち、メタノールとアセトニトリル混液（3:1）1mL 及び精製水 1mL でコンディショニングし、血清又は血漿 1mL を添加する。10%メタノールで洗浄後、メタノールとアセトニトリル混液（3:1）1mL で溶出する。この溶出液を窒素ガス噴霧下 40°C で蒸発乾固し、リン酸緩衝液 1mL 又は 0.2mL で溶解して BPA キットの測定試料とする。

②試験方法

BPA を緩衝液及び血清に溶解した。この溶解液を上記の抽出方法で抽出して、BPA キットの測定試料を調整した。この測定試料を BPA キットで測定し、BPA の回収率を求めた。

2. BPA のグルクロン酸抱合体を用いた試験

BPA キットと BPA のグルクロン酸抱合体との反応性を検討した。

① 試験方法

BPA のグルクロン酸抱合体（以下「抱合体」、フロンティアサイエンス）を緩衝液、血清及び血漿に溶解した。これらにコントロールとして緩衝液、β-グルクロニダーゼ（和光純薬、リンゴ貝由来の β-グルクロニダーゼ（2000unit））又は β-グルクロニダーゼ（日本バイオテクト、リンゴ貝由来の β-グルクロニダーゼ（グルクロニダーゼ 4000unit、サルファターゼ活性 2000unit））を加えて、37°C で 2 時間反応させ、BPA キットの抽出方法にしたがって BPA を抽出し、BPA キットを用いて測定した。

3. ポリフェノール類との交差反応性試験

① 試験方法

緑茶由来ポリフェノール (POLYPHENOLS, ICN Biomedical, Inc. 製, CAT No. : 193756) の 1.17mg を正確に秤量し、10mL の BPA キットの緩衝液に溶解して、117,000ng/mL の溶液を調整した。この溶液を緩衝液を用いて 2 倍連続希釈し、7.14ng/mL までの溶液を作製した。この希釈溶液を直接 BPA キットで測定して、75%阻害率を求めた。なお、BPA は 100ng/mL から 2 倍連続希釈し、1.56ng/mL までの溶液を作製した。

4. 妊娠時におけるビスフェノール A 測定値、および分娩児臍帯血中ビスフェノール A 値と妊娠女性、新生児の情報を対比概括・検討し、妊娠/分娩/周産期におけるビスフェノール A 値の推移の意義をこれらの測定法の妥当性・適正性の評価をふまえ、検討した。

5. また、内分泌攪乱化学物質(いわゆる環境ホルモン)との関連性が指摘されている先天異常(特に尿道下裂)について、尿道下裂症例における患児・母体でのビスフェノール A 測定値の測定法の妥当性・適正性をふまえて再検討した。

C. 研究結果

1. BPA キットの抽出方法の妥当性に関する試験結果

BPA の回収率を表 1 に示した。スタンダードを緩衝液に溶解した場合の回収率は 91.8～95.6%の範囲であった。また、スタンダードを血清に溶解した場合の回収率は 91.6～117.7%の範囲であり、いずれの場合も良好な回収率を示していると判断できた。したがって、本抽出方法は血中 BPA を抽出するのに十分な性能を有していると判断できた。

表 1 BPA 抽出法の回収率

溶媒	BPA 添加量(ng)	BPA 回収量(ng)	回収率(%)
緩衝液	6.25	6.0	95.6
緩衝液	12.50	11.5	91.8
緩衝液	25.00	23.6	94.4
緩衝液	50.00	47.7	95.4
血清	89.50	84.5	94.4
血清	44.75	41.0	91.6
血清	22.38	22.8	101.8
血清	11.19	12.1	108.4
血清	5.59	5.8	103.1
血清	2.80	2.8	101.2
血清	1.40	1.6	117.7

2. BPA のグルクロン酸抱合体を用いた試験測定結果

抱合体は緩衝液及び血漿又は血清にそれぞれ 33.3ng と 16.5ng を加えた。抱合体の分子量が 404、BPA の分子量が 228 であることから、緩衝液及び血漿又は血清にはそれぞれ加えた BPA はそれぞれ 18.8ng と 9.3ng を加えたことになる。ここでも同様に回収率を求め表 2 に示した。緩衝液、血清及び血漿のいずれの場合もグルクロニダーゼ未処理での回収率は 64%程度であった。このことから BPA キットは抱合体とも強く反応することが考えられた。また、 β -グルクロニダーゼ処理の場合には回収率は上昇し、特に血清及び血漿の場合にはサルファターゼ活性も有する β -グルクロニダーゼを用いた場合にはほぼ理論値通りの反応性が見られた。このことから β -グルクロニダーゼによる酵素処理は十分に反応が進んでいると考えられた。以上の結果から判断して BPA キットは未変化体の BPA に加え、抱合体にも反応すると考えられた。

表 2 酵素処理における BPA の回収率

溶媒	グルクロニダーゼ	BPA 抱合体添加量 (ng)	理論 BPA 添加量 (ng)	BPA 回収量 (ng)	回収率 (%)
緩衝液	コントロール	33.3	18.8	12.1	64.4
緩衝液	β -グルクロニダーゼ	33.3	18.8	15.0	79.8
緩衝液	β -グルクロニダーゼ +スルファターゼ	33.3	18.8	14.3	76.1
血漿	コントロール	16.5	9.3	5.9	63.4
血漿	β -グルクロニダーゼ	16.5	9.3	7.9	84.8
血漿	β -グルクロニダーゼ +スルファターゼ	16.5	9.3	8.9	95.6
血清	コントロール	16.5	9.3	5.9	63.4
血清	β -グルクロニダーゼ	16.5	9.3	8.3	89.1
血清	β -グルクロニダーゼ +スルファターゼ	16.5	9.3	9.3	99.9

3. ポリフェノール類との交差反応性試験

① 測定結果

BPA 及びポリフェノールの各希釈溶液の吸光度を表 3 に示した。また、この吸光度をもとに作成した標準曲線を図 1 に示した。この 75%阻害率を求めた結果、0.00003 であり、交差反応性はほとんど示していないと考えられた。

表 3 各希釈溶液の吸光度

ng/mL	ビスフェノール A			ポリフェノール		
	1)	2)	Mean	1)	2)	Mean
0	1.661	1.660	1.661			
1.56	1.339	1.392	1.366			
3.13	1.192	1.158	1.175			
6.25	0.901	0.889	0.895			
12.5	0.607	0.619	0.613			
25	0.404	0.422	0.413			
50	0.250	0.257	0.254			
100	0.148	0.150	0.149			
7.14				1.642	1.655	1.649
14.3				1.665	1.660	1.663
28.6				1.655	1.652	1.654
57.1				1.636	1.701	1.669
114				1.642	1.667	1.655
228.5				1.691	1.635	1.663
457				1.707	1.688	1.698
914				1.649	1.714	1.682
1830				1.690	1.661	1.676
3660				1.671	1.637	1.654
7310				1.677	1.703	1.690
14600				1.648	1.651	1.650
29300				1.571	1.545	1.558
58500				1.400	1.447	1.424
117000				1.098	1.188	1.143

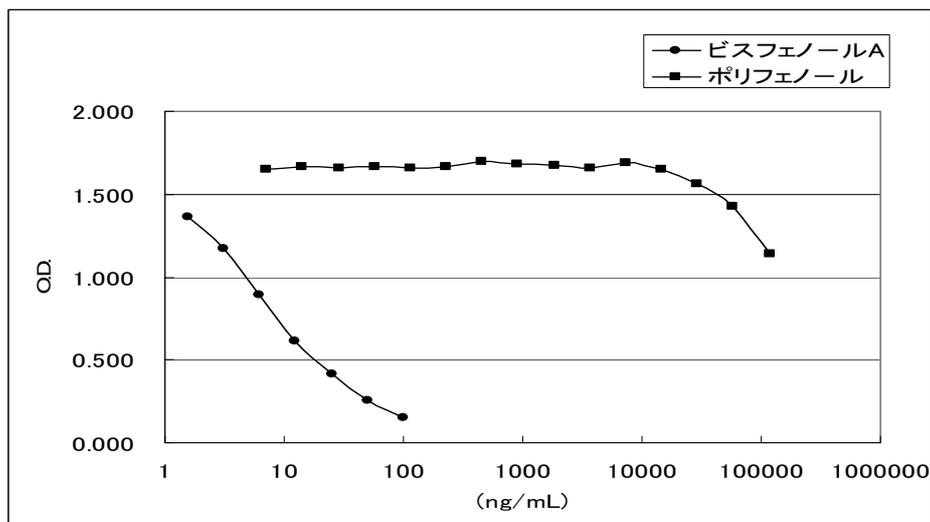


図1 標準曲線の比較

4. 妊娠時ビスフェノールA値、および分娩児臍帯血中ビスフェノールA値（住吉，平原）

上記測定法の再検討をおこなった後、妊娠女性、ならびに臍帯血の血中内分泌攪乱化学物質（ビスフェノールA）の測定値の再検討をおこない。また対照として非妊娠女性の血中内分泌攪乱化学物質（ビスフェノールA）もあわせ検討した結果、いずれの臍帯血中のビスフェノールA濃度も母体ビスフェノールAに比し高値を示す一方、非妊娠女性のビスフェノールA値は、妊娠女性に比し低値を示す傾向のあることが判明した。

(1) 妊娠女性，臍帯血，非妊娠女性の比較

非妊娠女性のビスフェノールA測定値平均値を1.0とした場合の比較値

1. 妊娠女性血中ビスフェノールA値0.40 (n=3135)

2. 分娩児臍帯血中ビスフェノールA値1.50 (n=792)

妊娠女性血中ビスフェノールA値、分娩児臍帯血中ビスフェノールA値の間における有意差を認めた。(p<0.0001)

3. 対照非妊娠女性血中ビスフェノールA値1.00 (n=49)

(2) 出産児別ビスフェノールA値

非妊娠女性のビスフェノールA測定値平均値を1.0とした場合の比較値

男児出産母体血液測定値 0.52 n = 441

女児出産母体血液測定値 0.50 n = 374

男児臍帯血液測定値 2.18 n = 142

女児臍帯血液測定値 1.56 n = 126

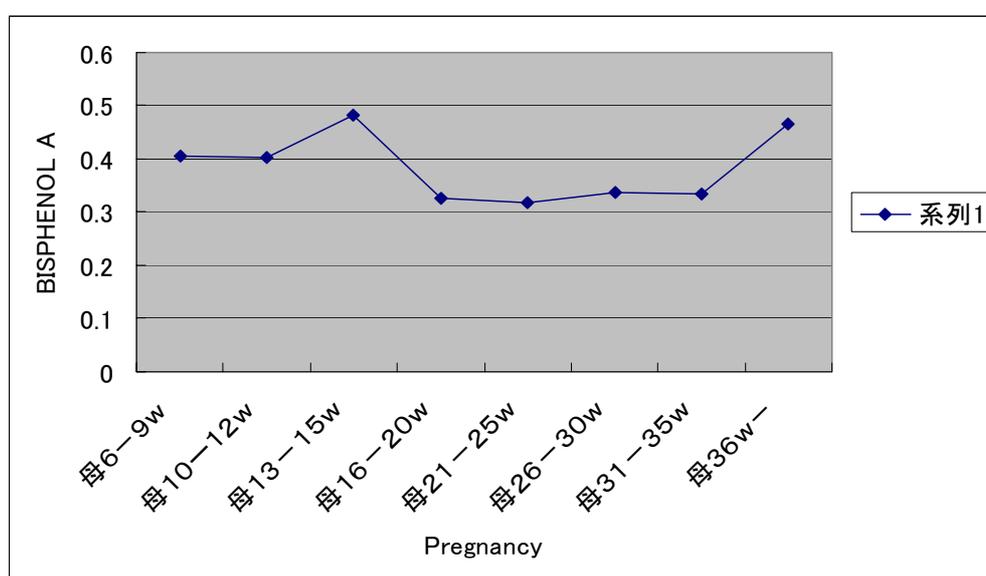
(3) 出産状況別ビスフェノールA

非妊娠女性のビスフェノールA測定値平均値を1.0とした場合の比較値

初産母体血液測定値	0.54	n =	236
経産母体 (2-4回経産)	0.47	n =	101
初産臍帯血液測定値	2.53	n =	75
経産臍帯血液測定値	1.46	n =	35

5. 妊娠経過にともなうビスフェノールA値の推移

妊娠初期にやや高めであったが、有意な変動はみられなかった〔図, 実測値ng/ml〕。



6. 尿道下裂症例における患児・母体でのビスフェノールA測定値 (黒木, 黒澤)

尿道下裂児 42 例の BPA は児平均 1.14 ± 0.85 (0.23-4.12) ng/ml、母平均 0.92 ± 0.83 (0.15-4.45) ng/ml で、両者間で有意差は無く ($p=0.20$)、また相関も認められなかった。

なお、本研究対照群として設定された正常児出産歴のある母親 ($n=20$) の BPA は 0.76 ± 0.88 (0.22-4.02) ng/ml で、尿道下裂児の母親との間に有意差を認めなかった ($p=0.51$)。症例を 40 症例以上に増やしたにもかかわらず、正常母親群と尿道下裂児母親群の間には有意差がなかった。

D. 考察

BPA は現在ポリカーボネイト樹脂やエポキシ樹脂の原料として種々の製品に広く使用されており、内分泌攪乱作用が疑われている化学物質の一つとして数多くの動物実験の成績が発表され注目されている。しかしながらヒトの疾患との関連や神経内分泌への影響についてはほとんど研究されていない。その一つの原因は、従来 BPA の測定には、GC/MS、や HPLC 法が用いられてきたがこれらの方法は検体の酵素処理を必要として、また検体からの抽出法や測

定法が煩雑でかつ検体も多量必要であるため、多数のヒト検体を処理するには大きな障害があった。しかし、本研究に用いられた ELISA 法は大塚 EDC センターならびに矢内原研究所で開発され、煩雑な抽出操作を必要とせず、精度も良く迅速な測定が可能となり本研究を可能にした。本研究ではこの大量の微量検体を処理しうる ELISA システムでのサンプル評価の妥当性を検討した。その結果、BPA キットの抽出方法の妥当性に関する試験結果としては BPA の回収率は良好な回収率を示していると判断され、本抽出方法は血中 BPA を抽出するのに十分な性能を有していると判断できた。また、BPA のグルクロン酸抱合体の混在による影響を調べたが、結果のとおり、BPA キットは抱合体とも強く反応することが考えられた。また、 β -グルクロニダーゼ処理の場合には回収率は上昇し、特に血清及び血漿の場合にはサルファターゼ活性も有する β -グルクロニダーゼを用いた場合にはほぼ理論値通りの反応性が見られ、このことから β -グルクロニダーゼによる酵素処理は十分に反応が進んでいると考えられた。

一方、ポリフェノール類との交差反応性試験に関しては図 1 に示したとおり、交差反応性はほとんど示していないと考えられた。

以上より、きわめて少数の標本数で、ビスフェノール A という限定された測定物質のみの測定法とはいえ、本 ELISA 法による測定は一定の評価をしようるものであり、臨床検体の分析を進めるとともに、内分泌攪乱化学物質の影響を含め、引き続き検討を重ねることが重要と考えられた。

これらの結果をふまえて再度本法によるヒトサンプルの測定値を再検討した結果、測定の完了した検体の分析結果からは、ビスフェノール A 臍帯血においては、母体よりも有意に高値を示していることが判明し、一方、非妊娠女性の測定値と比較すると、妊娠女性のビスフェノール A 値は低値であった。妊娠中のビスフェノール A 値の推移については、大きな変動はみられなかったことから、妊娠初期より低値の傾向を示すことが示唆された。

一方尿道下裂は諸外国の報告から内分泌攪乱化学物質との関連が指摘されている。しかし本研究においては、尿道下裂児出産歴のある母親のビスフェノール A 値は、正常コントロール群の値と比較して有意な差はみられず、現時点でそのリスク因子としての意義付けは明確ではない。

いずれにせよ、現代の環境をとりまく多種多様な因子はいつどのような形で先天異常発生要因因子として影響を与えることになるか常に万全の監視体制を整えることが重要である。先天異常モニタリング、さらにはサーベイランスを行い、常に内分泌攪乱化学物質を含めた環境因子には注視して今後も環境疫学的視点からの厳重な監視を行う必要がある。

2004 年業績一覧

Yamanaka M, Sumiyoshi Y, Asakura H, Sasaki S, Sakamoto S, Hirahara F: Con-genital birth defects from the view of maternal drug exposure. *Congenital Anomalies*, 44(4):A22-A23, 2004.

Okuda M, Takahashi T, Endoh M, Ishikawa H, Osada H, Asukai K, Ishikawa M, Yamanaka M, Sumiyoshi Y, Asakura H, Sasaki S, Sakamoto S, Hirahara F. The Third Report from the Japan Association of Obstetricians and Gynecologists(JAOG)Program of Birth Defects Monitoring: A Study and Analysis of the Efficacy of the Folic Acid Campaign. *Congenital*

Anomalies, 44(4):A35-A36. 2004.

Natsume N, Kawai T, Yoshida W, Tomoda Y, Sakai E, Sumiyoshi Y, Hirahara F, Kohama G, Noguchi M, Endo T, Sugiyama Y, Fukushima A, Echigo S, Saito C, Uchiyama T, Tanabe K, Yoshimasu H, Enomoto S, Omura K, Kubota T, Takato T, Kozuma S, Kurita K, Suzumori K, Matsuya T, Kogo M, Sakuda M, Mori Y, Murata Y, Yoshimura Y, Miyazaki K, Ohishi M, Tsukimori K, Katsuki T, Yanagisawa S, Miyakawa I, Shiba R, Ikenoue T, Sugihara K, Mimura T, Ikuta Y, Sunakawa H, Kanazawa K, Shimozato K. Attempt for Prevention of Cleft Lip and Palate in Japan. *Dentistry in Japan*, 39: 194-198, 2003.

遠藤方哉, 平原史樹, 山中美智子, 石川浩史, 小笠原智香, 安藤紀子, 高橋恒男, 住吉好雄: 本邦における妊娠女性, 胎児のビスフェノール A 曝露状況に関する検討. 第 56 回日本産科婦人科学会学術講演会, 東京, 2004, 4.

岡本真知, 春木篤, 石川浩史, 安藤紀子, 高橋恒男, 平原史樹: 悪性リンパ腫合併妊娠の 1 例. *日産婦神奈川会誌*, 40 : 73-78, 2004.

野村可之, 武井美城, 梅津信子, 岡本真知, 細川真理子, 春木篤, 石川浩史, 安藤紀子, 高橋恒男, 平原史樹: 非定型性肺炎により SIRS を合併し、早産にいたった 1 例. *日産婦神奈川会誌*, 40 : 92-96, 2004.

倉橋清泰, 安部咲帆, 遠藤方哉, 倉澤健太郎, 平原史樹, 山田芳嗣: 先天性左冠動脈口閉鎖症患者の帝王切開術. *分娩と麻酔*, 85 : 23-26, 2004.

鈴木理絵, 宮城悦子, 井畑穰, 助川明子, 小笠原智香, 石川浩史, 遠藤方哉, 仲沢経夫, 小野瀬亮, 高橋恒男, 平原史樹: 妊娠合併子宮頸癌症例の検討. *産婦人科の実際*, 53 (8) : 1229-1233, 2004.

平原史樹: 臨床の場における『出生前診断』—親と胎児、その微妙な関係—. *生命倫理*, 14 (1) 4-11, 2004.

平原史樹: ART と先天異常. *産婦人科の実際*, 53 (12) : 1881-1887, 2004.

平原史樹: 胎児水腫—次回の妊娠対策—. *周産期医学*, 34 : 249-253, 2004.

平原史樹: 生殖補助技術におけるコメディカルの役割—生殖医療カウンセラー—. *産婦人科の世界*, 56 増刊号 : 302-307, 2004.