

マウスの成長期におけるビスフェノール A の 経口摂取が免疫機能の成熟に及ぼす影響

佐 伯 隆 一¹⁾・細 川 友 秀¹⁾

Effects of Oral Administration of Bisphenol A on the Maturation of Immune Function in Growing Mice

Ryuichi SAEKI and Tomohide HOSOKAWA

抄 録：今日の私たちの生活は、急速な経済発展と科学技術の発展の上に成り立ち、その発展の産物であるさまざまな化学物質に囲まれている。それらの化学物質のなかには、私たちをとりまく様々な環境に広がり、私たちの健康を脅かすだけでなく自然の生態系を破壊する危険性を指摘されるものがある。外因性内分泌攪乱化学物質と総称されるいわゆる環境ホルモンである。環境ホルモンは、生体内にとりこまれて内分泌系を中心に広範な影響を及ぼし、ヒトをはじめとする様々な動物とその生態系に深刻な影響を与えると憂慮されている。本研究では、プラスチックの原料であり環境ホルモンの一種とされるビスフェノール A を成長期の子マウスに経口投与することにより、生殖器を中心とした臓器の発育、および、抗体産生機能の成熟への影響を調べた。得られた結果は、日常生活環境から経口的に摂取される程度のビスフェノール A が生殖器などの発育と免疫機能の成熟に影響を及ぼすことを強く示唆する。

キーワード：ビスフェノール A、内分泌攪乱物質、成長期、免疫機能の成熟

I. はじめに

私たちの身の回りにはプラスチックの食器、殺虫剤、合成洗剤など合成化学物質がたくさん存在する。私たちの便利で豊かな生活はこれらの化学物質によって支えられている側面がある。大量生産と大量消費の社会・経済活動に支えられて便利で豊かな生活を享受する私たちは、大量生産・大量消費の活動が地域の自然環境のみでなく地球環境に大きな負荷をかけていることを忘れてはならない。私たちの生活を豊かで便利にするために人工的に合成された化学物質のなかには、様々なレベルの環境を汚染し私たちの健康を脅かすだけでなく自然の生態系を破壊する危険性を指摘されるものがある。外因性内分泌攪乱化学物質と総称されるいわゆる環境ホルモンである。環境ホルモンは、生体内にとりこまれて内分泌系を中心に広範な影響を及ぼし、ヒトをはじめとする様々な動物とその生態系に深刻な影響を与えると憂慮されている。

多くの化学物質が環境ホルモンとしての活性をもつと疑われている。なかでも、身近な生活環境にあって私たちの健康を脅かす可能性が指摘される化学物質のひとつにビスフェノール A

1) 京都教育大学

がある。ビスフェノール A は女性ホルモンであるエストラジオールの類似作用が疑われていて 1) - 4), ポリカーボネート樹脂, エポキシ樹脂, 歯の詰め物に含まれているシーラント等の原料である。ポリカーボネート樹脂は給食の食器やほ乳びんの材料であり, エポキシ樹脂は缶詰などの缶の内面コーティングに使われているため, これらの樹脂からその原料であるビスフェノール A が微量に食品中に溶出し, 実際に経口的に人体に入ってくる危険性が高い。

ここでは, ビスフェノール A が人間の成長段階に及ぼす影響を推定するために, 成長期の子マウスにビスフェノール A を経口投与することにより, 生殖器を中心とした臓器の発育, および, 抗体産生機能の成熟への影響を調べた。

II. 材料と方法

(1) マウス

私たちの研究室で系統維持した C57BL/6 - bm12 マウスの 4 ~ 7ヶ月齢および 3 週齢を使用した。

(2) 腫瘍細胞

5% 牛胎仔血清 (FCS) を含む RPMI1640 完全培地で 2 日ごとに継代した EL-4 細胞 (マウス T リンホーマ細胞) と P388 細胞 (マウス白血病細胞) を使用した。

(3) 培養液と緩衝液

RPMI 1640 完全培地: RPMI 1640 粉末培地 (日水製薬, 東京) 5.1 g を再蒸留水 500 ml に溶かし, 120 °C で 20 分間オートクレーブして常温まで冷却した後, 7% 炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて pH 7.2 に調整し, 牛胎仔血清 (FCS, Intergen Company, New York, USA) を 5%, L- グルタミンを 2 mM, 2-mercaptoethanol を 5×10^{-5} M の濃度になるようにそれぞれ加えて完全培地とした。

イーグル MEM 培養液: イーグル MEM 粉末培地 (日水製薬) 4.7 g を再蒸留水 500 ml に溶かし, 120 °C で 20 分間オートクレーブして常温まで冷却した後, 7% 炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて pH7.2 に調整した。

Coating buffer (pH9.6): Na_2CO_3 1.59 g, NaHCO_3 2.93 g, NaN_3 0.2 g を再蒸留水 1 リットルに溶かしてオートクレーブした。

Diethanolamine buffer: Diethanolamine 97 ml, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, NaN_3 0.2 g を再蒸留水 800 ml に溶かして 4 N HCl で pH9.8 に調整し, 再蒸留水を加えて全量を 1 リットルにした後, オートクレーブした。

MTT 溶液: MTT (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA) 粉末をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 5 mg/ml の濃度に溶かして 4 °C で遮光保存し, 使用する直前に PBS で 1 mg/ml の濃度に調整した。

PBS Tween 液: Polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20) (ナカライテスク) 0.5 ml と NaN_3 0.2 g を PBS 1 リットル に溶解した。

(4) ビスフェノール A の経口投与

Bisphenol A ($\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_2$) (ナカライテスク) を 99 % エタノールに 10 mg/ml の濃度で溶かして

原液とし、この原液を PBS によって希釈し 1 ppm と 10 ppm の濃度の溶液を調整した。3 週齢のマウスを、無投与、PBS 0.2 ml 投与、1 ppm のビスフェノール A 溶液 0.2 ml 投与、10 ppm のビスフェノール A 溶液 0.2 ml 投与、の 4 群に分けて 45 日間ゾンデ針を用いて毎日経口投与した。

(5) 脾臓細胞懸濁液の調整と細胞培養

すべて無菌条件下で細胞懸濁液の調整操作を行った。マウスを脱血死させた後、腹部切開しピンセットで脾臓を摘出した。イーグル MEM 培養液の中で、脾臓に切り込みを数カ所入れ、ピンセットで挟み、ステンレスメッシュにこすりつけて脾臓細胞をほぐしだし、得られた細胞浮遊液を脱脂綿で濾過し組織片などを取り除いた。1000 rpm, 10 min の遠心操作を 3 回繰り返して細胞を洗い、最後の遠心後上澄みを静かに捨てて RPMI 1640 完全培地を加えて脾臓細胞懸濁液をつくった。そして、個々のマウスの脾臓細胞を 24-well 培養プレート (Falcon #353047, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA) に 1.0×10^6 cells/well になるように分注し、LPS (Lipopolysaccharide B (E. coli 026:B6), Difco Lab., Detroit, Michigan, USA) 無添加、 $1 \mu\text{g/ml}$ の濃度で LPS を添加、または、 $5 \mu\text{g/ml}$ の濃度で LPS を添加の 3 種類の培養系列を作り、それぞれ全量が 2 ml/well となるように完全培地を適量加えて調整し、 37°C 、5 % CO_2 のインキュベーター内で 7 日間培養した。

(6) 酵素標識免疫吸着法 (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) による抗体量の測定

脾臓細胞の各培養上清中の総 IgM 抗体量を以下に概略を示す ELISA 法で測定した。96-well アッセイプレート (Falcon #353915, Becton Dickinson and Company) に、coating buffer で適切に希釈したヤギ抗マウス Ig 抗体 (Organon Teknika Co., Durham, North Carolina, USA) を $100 \mu\text{l/well}$ ずつ入れ、一晚冷蔵庫で各 well をコートし、翌日、PBS-Tween で各 well を 3 回ずつ洗浄後、再蒸留水で 5 倍に希釈したブロックエース (雪印乳業、北海道) を $100 \mu\text{l/well}$ ずつ分注して約 1 時間室温下に置き各 well をブロックした。その後、PBS-Tween で各 well を 3 回ずつ洗浄し、段階希釈した培養上清と IgM ミエローマ蛋白、または、IgG ミエローマ蛋白 (Zymed Laboratories, San Francisco, California, USA) を $100 \mu\text{l/well}$ ずつ分注して約 1.5 時間室温下に置いた。次に、PBS-Tween で各 well を 8 回ずつ洗浄して、PBS-Tween で希釈した alkaline phosphatase (AP) 標識抗マウス IgM 抗体、または、AP 標識抗マウス IgG 抗体 (Zymed Laboratorie) を $100 \mu\text{l/well}$ ずつ分注して約 1.5 時間室温下に置いた。さらに、PBS-Tween で各 well を 8 回ずつ洗浄した後、各 well に p- ニトロフェニルリン酸二ナトリウム ($\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_6\text{PNa} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 和光純薬工業、大阪) 溶液 (diethanolamine buffer で 1 mg/ml に溶解) を $100 \mu\text{l/well}$ ずつ分注し、室温下で約 20 ~ 40 分間反応発色させ、マイクロプレートリーダーで各 well の 415 nm と 450 nm における吸光度の差を求め、IgM ミエローマ蛋白、または、IgG ミエローマ蛋白によるスタンダード曲線から培養上清中の総 IgM 抗体、または、総 IgG 抗体の濃度を決定した。

(7) MTT 染色法による腫瘍細胞の定量

96-well マイクロプレート (Falcon #353072, Becton Dicknson and Company) に細胞を 32000 cells/well ~ 125 cells/well の濃度で分注し、RPMI 1640 培養液のみ添加を control とし、1 ppm ビスフェノール A 添加群に加わる濃度のエタノール添加、1 ppm ビスフェノール A 添加の 3 群に分け、0 ~ 72 時間、 37°C 、5 % CO_2 のインキュベーター内で培養した。各時間培養後、96-well マイクロプレートを室温、1000 rpm、10 分間遠心して、各 well から $150 \mu\text{l}$ の培養上清を捨てて 1

mg/ml の濃度の MTT 溶液を 50 μ l ずつ入れ、2 時間インキュベートした。その後、各 well から反応液を吸い取り、生成した MTT formazan の結晶を溶出させるために dimethyl sulfoxide (和光純薬、大阪) を各 well あたり 100 μ l ずつ入れ、マイクロプレートリーダー (model 3550, Bio Rad Laboratories, Hercules, California, USA) のオートミックスモードで 8 秒間攪拌した。さらに、595 nm と 655 nm の 2 波長で各 well の吸光度を測定し、2 波長の吸光度の差を各 well の吸光度とした。培養 0 時間の well あたりの細胞数に対応する吸光度をプロットして得られた曲線を検量線として各 well 中の生細胞数を定量した。

(8) 有意差検定

任意の 2 群間の有意差検定は Student's t-test を用い、 $p < 0.05$ のとき有意差があると判定した。

Ⅲ. 結 果

(1) ビスフェノール A を経口投与したマウスの体重と体重あたりの各臓器重量

3 週齢の雌雄のマウスを、無投与、PBS 0.2 ml 投与、1 ppm のビスフェノール A 溶液 0.2 ml 投与、10 ppm のビスフェノール A 溶液 0.2 ml 投与、の各 4 群に分けて 45 日間ゾンデ針を用いて毎日経口投与した。最後の経口投与の翌日体重を測定し、各群の個々のマウスから脾臓、精巣、精巣上体、卵巣、子宮、精囊、胸腺、肝臓、腎臓を摘出して各臓器重量を測定した。

雌マウスの発育への影響： ビスフェノール A 投与群を PBS 投与群と比較すると、ビスフェノール A 投与群は発育に伴う体重増加が少なく (Fig. 1)、卵巣重量がビスフェノール A の濃度に依存して有意に少なかった (Fig. 2 A)。子宮重量と脾臓重量は個体間のばらつきが大きいため有意ではないがビスフェノール A 投与群が大きい傾向を示し (Fig. 2 B, C)、その他の臓器重量は実験群間で顕著な差が見られなかった。

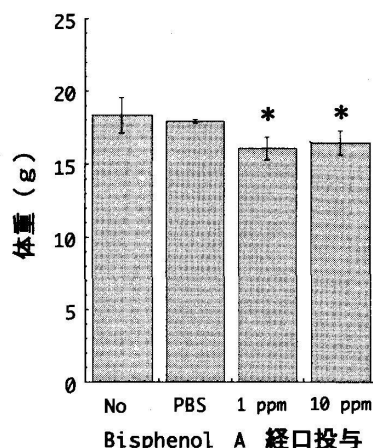


Fig.1 雌マウスの体重増加に及ぼすビスフェノール A 経口投与の影響

45 日間経口投与後、9 週齢時の体重を示す。

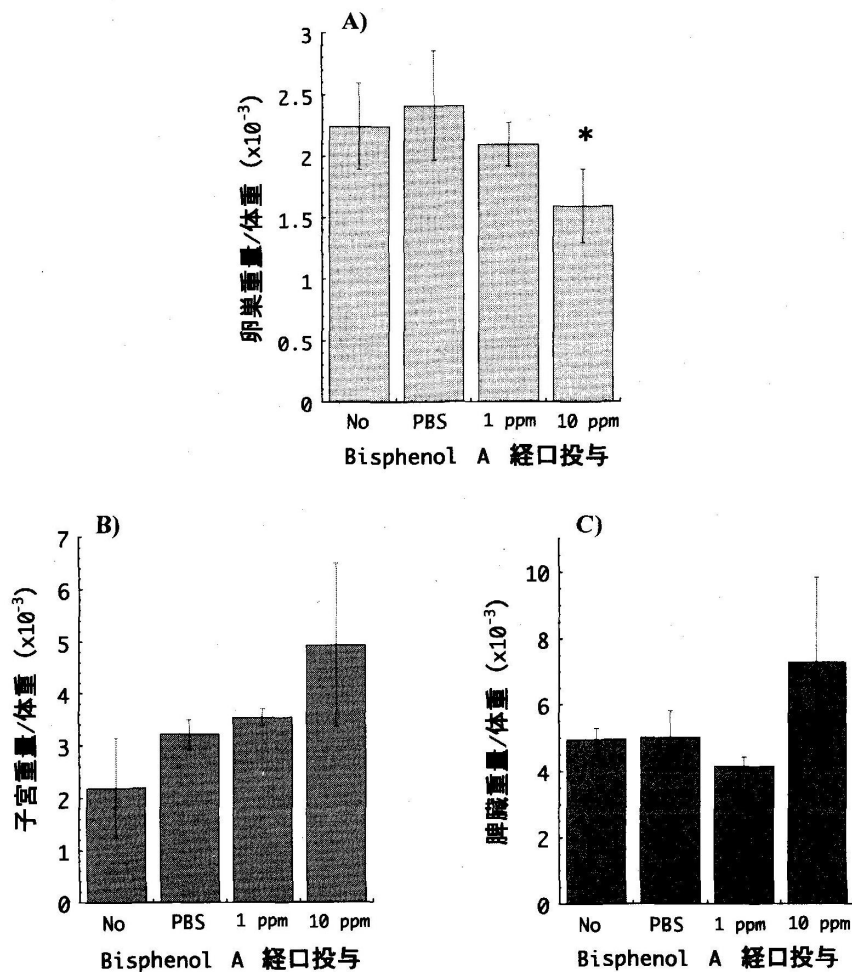


Fig.2 雌マウスの卵巣、子宮、および、脾臓の発育に及ぼすビスフェノール A 経口投与の影響
45 日間経口投与後、9 週齢時の体重あたりの臓器比重量を示す。

A) 卵巣比重量、B) 子宮比重量、C) 脾臓比重量

雄マウスの発育への影響： 雄マウスのビスフェノール A 投与群を PBS 投与群と比較すると、ビスフェノール A 投与群は発育に伴う体重増加が少ない傾向であったが有意差はなく (Fig. 3), 精巣重量も顕著な差がなかった (Fig. 4 A)。しかし、精巣上体重量と精囊重量は 1ppm ビスフェノール A 投与群で有意に少なかった (Fig. 4 B, C)。また、脾臓重量はビスフェノール A の濃度に依存して大きくなる傾向であったが有意差はなかった (Fig. 4 D)。その他の臓器重量は実験群間で顕著な差が見られなかった。

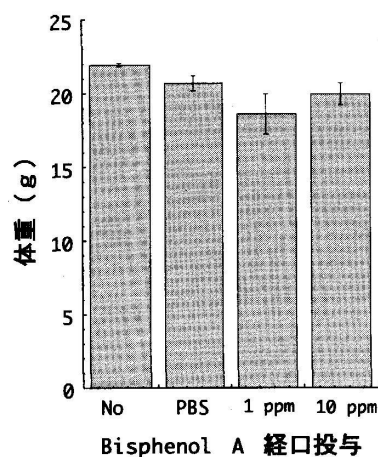


Fig.3 雄マウスの体重増加に及ぼすビスフェノールA経口投与の影響
45日間経口投与後、9週齢時の体重を示す。

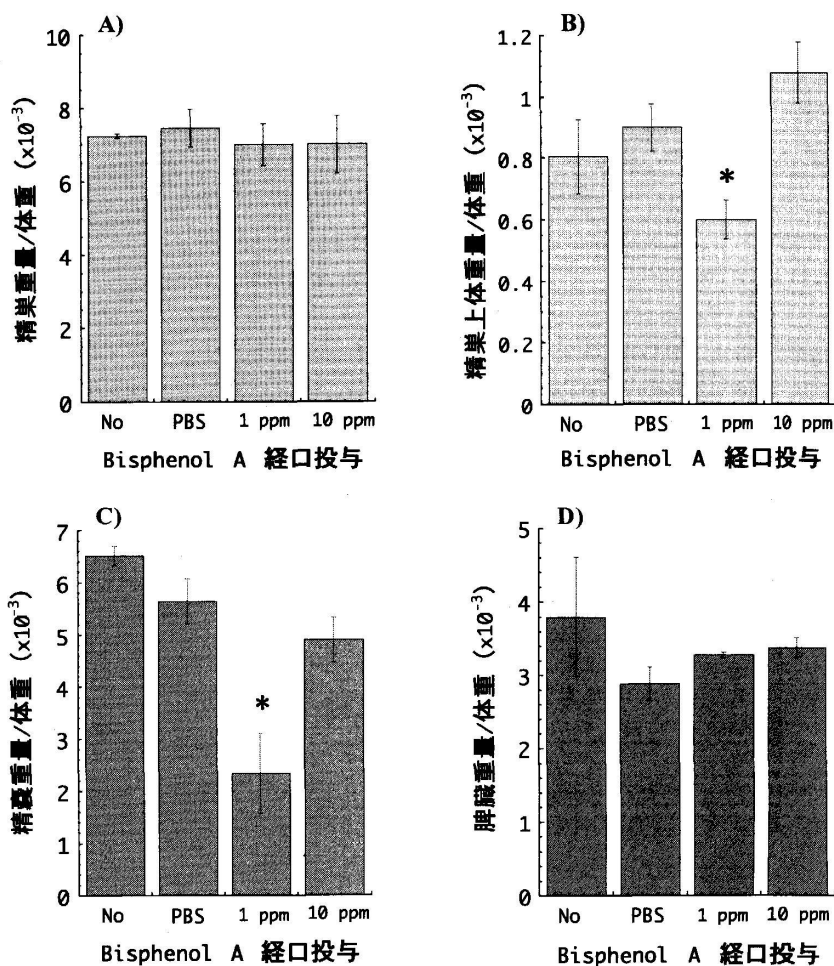


Fig.4 雄マウスの精巣、精巣上体、精嚢および、脾臓の発育に及ぼすビスフェノールA経口投与の影響
45日間経口投与後、9週齢時の体重あたりの臓器比重量を示す。

A) 精巣比重量, B) 精巣上体比重量, C) 精嚢比重量, D) 脾臓比重量

(2) ビスフェノール A を経口投与したマウスの抗体産生能

脾臓重量を測定後、個体ごとに脾臓細胞懸濁液を調整して抗体産生誘導のために材料と方法に示す通り 7 日間培養し、7 日後培養上清中の総 IgM 抗体量と総 IgG 抗体量を測定した。

雌マウスの抗体産生能への影響： ビスフェノール A 投与群を PBS 投与群と比較すると、総 IgM 抗体と総 IgG 抗体ともにビスフェノール A 投与群の方が多い傾向が認められたが、有意差はなかった (Fig. 5 A, B)。

雄マウスの抗体産生能への影響： 雄マウスのビスフェノール A 投与群を PBS 投与群と比較したが、個体間のばらつきが大きいため実験群間で有意な差は見られなかった。

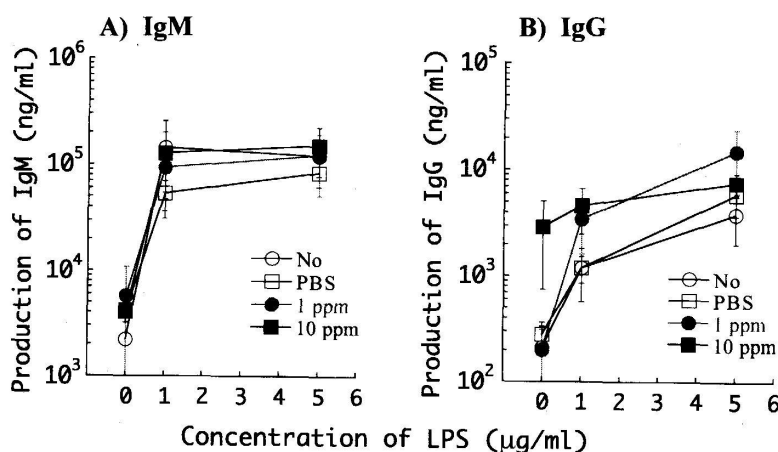


Fig. 5 ビスフェノール A を経口投与されたマウスの抗体産生機能

経口投与無し (白丸)、PBS 投与 (白四角)、1ppm 投与 (灰色丸)、10ppm 投与 (黒四角)、の雌マウス脾臓細胞を x 軸に示す濃度の LPS とともに培養し、抗体産生量を比べた。

(3) 免疫系腫瘍細胞の増殖に及ぼすビスフェノール A の影響

ビスフェノール A の細胞機能への直接作用をみるため、免疫系の腫瘍細胞を種々の細胞濃度で 1 ppm ビスフェノール A 添加条件のもとで培養し、増殖に及ぼす影響を調べた。

P388 細胞への影響： P388 細胞を 96-well マイクロプレートに 16000 cells/well, または, 32000 cells/well の濃度で分注し、無添加 control, エタノール添加 control, 1 ppm ビスフェノール A 添加群に分けて、0 から 3 日間培養し各時点での各 well の生細胞数を定量し、P388 細胞の増殖へのビスフェノール A の影響を調べた。その結果、1ppm のビスフェノール A は P388 細胞の増殖にほとんど影響しなかった (Fig. 6 A)。

EL-4 細胞への影響： EL-4 細胞を 96-well マイクロプレートに 1000 cells/well, 2000 cells/well, または, 4000 cells/well の濃度で分注し、P388 細胞と同様の実験群に分けて培養し、細胞増殖に及ぼすビスフェノール A の影響を調べた。その結果、1ppm の濃度にビスフェノール A を添加した培養では 2 つの control 群に比べ吸光度の増加が遅く細胞の倍加時間が有意に延びた (Fig. 6 B)。この抑制効果は well あたりの細胞数が少ない 1000 cells/well と 2000 cells/well の培養で特に顕著だった。

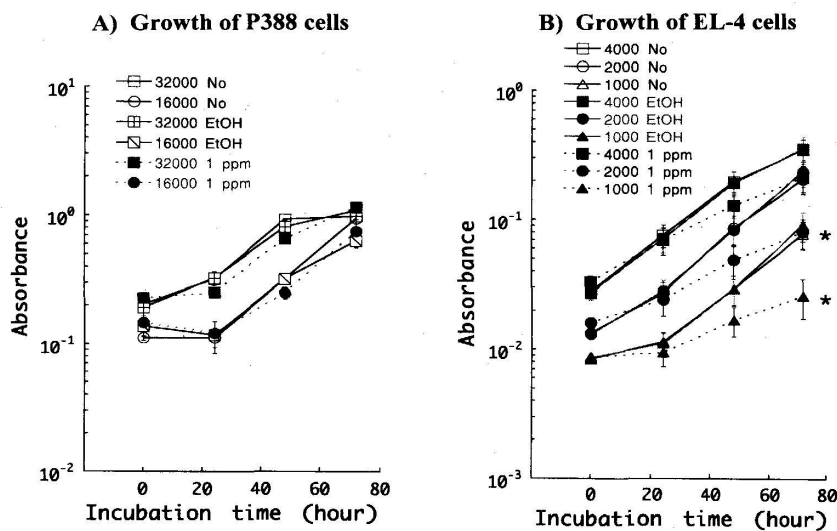


Fig.6 ビスフェノール A の免疫系腫瘍細胞増殖に及ぼす影響

A) P388 細胞への影響, B) EL-4 細胞への影響

凡例の数字は well あたりの培養細胞数を示す。

No: 無添加の対照培養, EtOH: ビスフェノール A を 1ppm の濃度に添加した培養と同じ濃度のエタノールを添加した対照培養, 1ppm: ビスフェノール A を 1ppm の濃度に添加した培養。

IV. 考 察

厚生労働省が食品衛生法で定めているビスフェノール A の溶出基準は 2.5 ppm であり, 本研究で投与したビスフェノール A の 2 つの濃度 (1 ppm と 10 ppm) の間にはいる。また, 欧米で規定されているビスフェノール A の許容量は 0.05 mg/kg 体重・日 である。この許容量を, マウスの体重を 20 g としてマウス 1 匹あたりに換算すると, 1 日あたり 1 μ g となる。本研究で投与したビスフェノール A 溶液の体積は 1 日 0.2 ml であるので, 2 つの濃度, 1 ppm と 10 ppm, を 1 日の摂取量に換算すると, それぞれ, 1 日あたり 0.2 μ g と 2 μ g となる。それゆえ, 欧米で規定されている許容量は本研究で設定した 2 つの濃度条件の間にはいる。

本研究では, マウスが 3 週齢の離乳時から 6 週間余りの間, 日本の溶出基準値と欧米の摂取許容量付近の量を経口投与し続けて, 成長過程におけるビスフェノール A の影響を調べた。その結果, 溶出基準値より低濃度で摂取許容量より少ない投与条件で雄マウスの精巣上体や精囊の発育が有意に抑制された。雌マウスでは溶出基準より 4 倍高濃度で摂取許容量の 2 倍量の投与条件ではあるが, 卵巣の発育が有意に抑制されるとともに子宮の発育が異常に亢進された。マウスの実験結果をそのままヒトに適用することはできないが, 本研究の結果は, 溶出基準値と摂取許容量付近の投与条件でビスフェノール A が成長期のこどもの生殖器の発育に影響することを強く示唆し, 溶出基準値や摂取許容量が適切であるかどうか疑問であることを示す。

このようなビスフェノール A の影響は, ビスフェノール A がエストロゲン類似作用によってこどもの内分泌系, 特に, 性成熟に関わる性ホルモンの働きを攪乱することを示唆する。性ホルモン作用の攪乱は生殖器の発育以外に免疫機能の成熟にも影響することが考えられる。本研究の結果では, ビスフェノール A を経口投与した雌マウスの抗体産生機能, 特に IgG 抗体産

生機能が亢進する傾向であった。女性ホルモンは一般に免疫機能を亢進することが知られている。しかし、ビスフェノール A がエストロゲン類似作用によって抗体産生機能を亢進するかどうかは不明である。

本研究では、T 細胞系の腫瘍細胞、EL-4, は 1 ppm のビスフェノール A を含む培養で有意に細胞周期が延長して増殖が抑制された。対照的に、マクロファージ系の腫瘍細胞、P388, は 1 ppm のビスフェノール A を含む培養でその増殖に全く影響を受けなかった。これらの結果は、ビスフェノール A が免疫系細胞のうちでも T 細胞などの細胞に選択的に作用し、その細胞機能を変化させることを強く示唆する。このような比較的低濃度での細胞選択的な作用様式は、ホルモンがそのレセプターをもつ標的細胞に特異的に作用する様式と同じである。

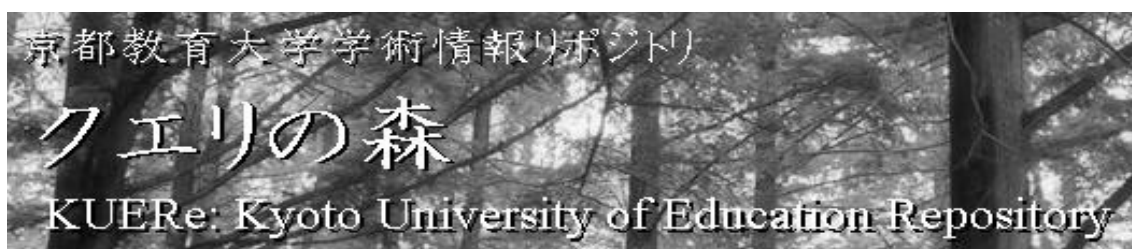
ビスフェノール A の免疫系への影響について結論するには、さらに実験を追加するとともに抗体産生以外の免疫機能についても調査することが必要であることは自明である。しかしながら、本研究結果は現在のビスフェノール A の溶出基準値や許容摂取量の設定が適切であるか再検討する必要があることを示している。

V. 結 論

ビスフェノール A はエストロゲン類似作用により生殖器などの発育と機能に影響を及ぼすといえる。その作用は日常生活環境から経口的に我々の体の中に摂取される程度のビスフェノール A によってひき起こされる可能性が高い。また、ビスフェノール A は EL-4 (T lymphoma) 細胞の増殖を選択的に抑制するため、免疫系に対し、その正常な調節を乱す可能性が高いと考えられる。

文 献

- 1) Korach, K.S. (1993) Editorial surprising places of estrogenic activity. *Endocrinology*, 132: 2277-2278.
- 2) Brotons, J.A., *et al.* (1995) Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ. Health Perspect.* 103: 608-612.
- 3) Colerangle, J.B., *et al.* (1997) Profound effects of the weak environmental estrogen-like chemical bisphenol A on the growth of the mammary gland of noble rats. *J. Steroid Biochem. Mol. Cell. Endocrinol.*, 60: 153-160.
- 4) Steinmetz, R., *et al.* (1998) The xenoestrogen bisphenol A induces growth, differentiation, and *c-fos* gene expression in the female reproductive tract. *Endocrinology*, 139: 2741-2747.



この文献は、国立情報学研究所において電子化されたものを、本学でテキスト加工したものです。

