

「内分泌かく乱物質」

平成10年度採択研究代表者

堤 治

(東京大学医学部 教授)

## 「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」

### 1. 研究実施の概要

内分泌かく乱物質は動物で流産などの生殖異常を生ずるとされ、サルでは微量のダイオキシンが子宮内膜症の病因となると示唆された。ヒトの生殖機能は内分泌かく乱物質に敏感と予測されるが、内分泌かく乱物質による人体の汚染の程度と不妊症や子宮内膜症等を含めた生殖機能に及ぼす影響は明らかではない。

本研究では、各種内分泌かく乱物質によるヒト生殖器官の汚染の程度を疾患との関連で評価する。具体的には卵胞液中濃度と受精や妊娠率等の各種生殖パラメータ、健常人と子宮内膜症患者におけるダイオキシン類濃度などの量-反応関係を明らかにする。既にヒト卵胞液中に約 1pg/ml (0.01 pg TEQ/ml)のダイオキシン類が存在し、微量ではあるがヒト生殖器官がダイオキシン類により汚染されていることを初めて明らかにした。

マウス胚の体外培養系において各種濃度の内分泌かく乱物質を添加し、初期胚発育への影響を検討する。被曝初期胚は仮親に移植し、得られる胎児や出生児の異常の有無を検索し、生殖機能異常への無毒性量(NOAE)および最小毒性量(LOAE)を設定する。最終的にはヒト胚の微小環境安全限界を設定する。既に 1-5pM という非常に低濃度のダイオキシン類が初期胚の発育を抑制あるいは促進することを明らかにした。

また内分泌かく乱物質のエストロゲン受容体 $\alpha$ 、 $\beta$ それぞれを介したエストロゲン作用の発現様式の解析や性分化に関連した遺伝子発現への影響等分子レベルの分析もおこなう。既にマウス初期胚においてエストロゲンレセプターの発現を明らかにした。

本研究の特色は内分泌かく乱物質の生殖機能へ影響をヒト臨床材料による評価、初期胚に対する作用の臨界点、内分泌かく乱作用の分子機作等の面から総合的に明らかにすることであり、ヒト生殖機能への影響という国民全体の不安に具体的に解答することを狙いとする。

### 2. 研究実施内容

ダイオキシン類はエストロゲンレセプターそのものに直接結合せず、特異的レセ

プターである arylhydrocarbon receptor (Ah レセプター) を有する。この特異的 Ah レセプターは初期胚にも検出され、ダイオキシンの生殖器官への汚染が注目される。そこでヒト卵胞液中のダイオキシンの検出をガスクロマトグラフィーマスペクトロメトリー法により試みた。その結果 polychlorinated dibenzodioxin (PCDD) および polychlorinated dibenzofuran (PCDF) が卵胞液中に約 1pg/ml (0.01 pg TEQ/ml) 存在することが明らかになった。血中濃度よりは低いが卵巣への汚染が存在することが示された。

ヒト卵胞液にダイオキシンが存在し、Ah レセプターが初期胚にも発現することから、ダイオキシンの卵や初期胚に対する内分泌攪乱作用も危惧される。そこでマウス 2 細胞期胚を用いてダイオキシンの胚発育への影響を検討したところ、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 (図 1、 )。この作用は 10-100pM では検出されなかった。これより TCDD は低濃度では胚発育に抑制的に作用することが示された。ところが 2 細胞期胚から胚盤胞への発育率では 1-5 pM で観察された抑制効果は認められない (図 1、 )。そこで、8 細胞期胚の胚盤胞への発育率を見ると図 1 の で示すように、TCDD は胚盤胞形成に促進的に作用した。これより TCDD 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。通常 TCDD の in vitro における作用域は nM レベルであることから、胚の TCDD 感受性は高いとも考えられる。

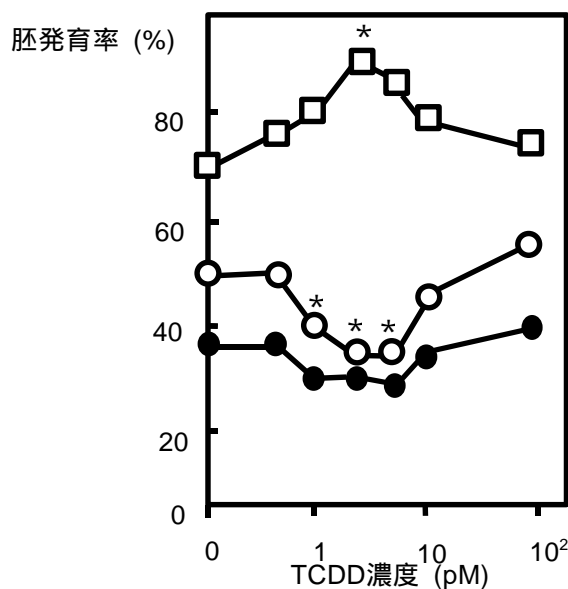


図 1 マウス 2 細胞期胚の発育に及ぼすダイオキシン (TCDD) の影響

更に、TCDD の胚発育への直接作用を検証するために、胚盤胞の細胞数を核染色法により実施した。その結果、胚盤胞は形態的には正常で対照群のものと区別でき

かねたが、細胞数は TCDD の用量反動的に有意の増加を認めた ( 図 2 )。これよりダイオキシンは初期胚発育に直接作用を持つことが裏付けられ、少なくとも 8 細胞期以降の胚への低濃度での影響は単なる毒性ではなく、細胞の増殖や分化を促進することにあると考えられた。

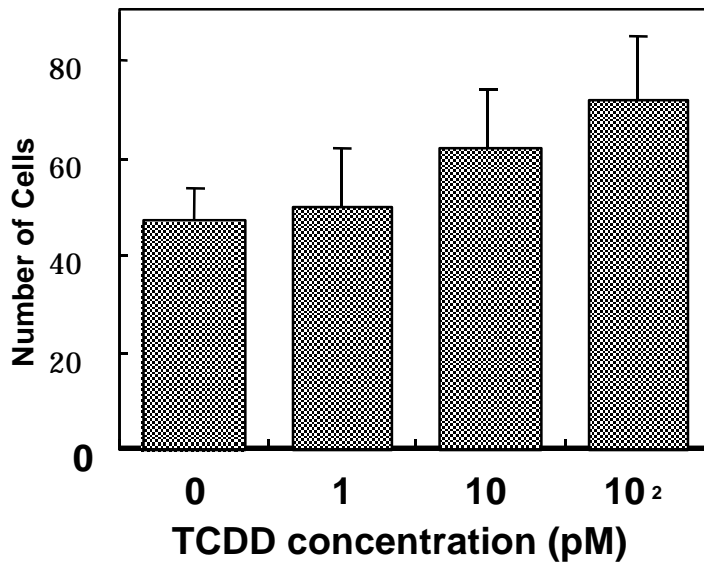


図 2 ダイオキシン ( TCDD ) が胚盤胞の細胞数に及ぼす影響

TCDD の初期胚発育への作用メカニズムは明らかではないが、胚に発現している Ah レセプターが関与することは示唆される。TCDD は epidermal growth factor ( EGF ) のレセプターをダウンレギュレートすることが知られており、TCDD の胚発育への制御機構には EGF 作用を介している可能性もある。TCDD が EGF 同様マウス新生仔期に眼瞼開裂や歯牙の発育を促すことも報告されている。またこれら初期胚にはエストロゲンレセプター の mRNA がともに発現していることを最近明らかにし ( 図 3 ) エストロゲン作用に対する内分泌攪乱作用によっていることが想像される。

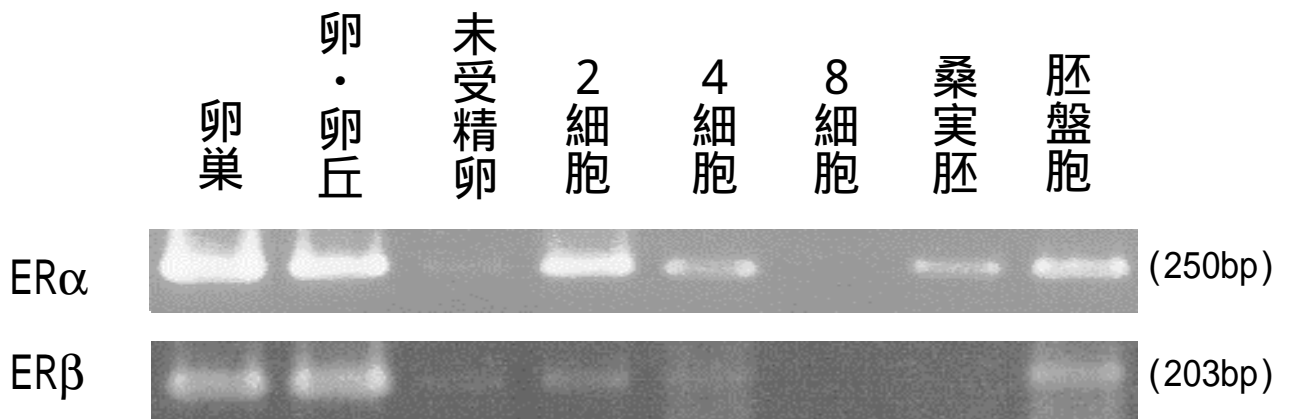


図 3 マウス初期胚における ER $\alpha$ および ER $\beta$ の発現

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

- Hisahiko Hiroi, Mikio Momoeda, Satoshi Inoue, Fujiko Tsuchiya,  
Hiroataka Matsumi, Osamu Tsutsumi, Masami Muramatsu, Yuji Taketani  
Stage-specific expression of estrogen receptor subtypes and estrogen  
responsive finger protein in preimplantational mouse embryos.  
Endocrine Journal, Vol.46, p153-158,1999.
- YOSHIMASA KAMEI, OSAMU TSUTSUMI, AKIO YAMAKAWA,  
YOSHITOMO OKA, YUJI TAKETANI, and JUNKO IMAKI  
Maternal Epidermal Growth Factor Deficiency Causes Fetal Hypoglycemia  
and Intrauterine Growth Retardation in Mice: Possible Involvement of  
Placental Glucose Transporter GLUT3 Expression  
Endocrinology Vol. 140. No.9 4236-, (1999)