

「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。本研究の特色は内分泌かく乱物質の生殖機能への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構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。

ダイオキシンの子宮内膜症発症との関連を解明する目的で、ダイオキシン関連遺伝子のヒト子宮内膜における発現を調べた。その結果、子宮内膜におけるダイオキシン関連遺伝子の発現を確認し、ダイオキシン応答遺伝子p62 (dok) が子宮内膜症重症例で高い傾向にあり、ダイオキシンが子宮内膜に影響を及ぼす可能性が示唆された。子宮内膜症は疫学的に喫煙者に少ないとされるが、喫煙者と非喫煙者との比較ではダイオキシン受容体AhRの発現が喫煙者において低値であり、疫学的な知見を裏付けるものと考えられた。また、ヒト脂肪組織中からのダイオキシン類の検出を試み、全ての脂肪組織からダイオキシン類が検出され、重症子宮内膜症群では軽症群より有意にダイオキシン類濃度が高値であった。ヒト卵胞液からもダイオキシン類が検出され、子宮内膜症群で高い傾向があった。一方、男性不妊症患者の血清中ダイオキシン濃度を測定したところ、35歳未満の乏精子症群で対照群より高い傾向があった。

ビスフェノールAもまた、プラスチックの原料として我が国では年間約25万トン消費され、全河川の57%から検出される内分泌かく乱物質である。昨年、母獣への低用量投与による雄新生仔の前立腺肥大、雌新生仔の性成熟促進などが報告され、ヒトの汚染や生殖機能への影響についても懸念されているが、その詳細は不明である。我々は、ヒト血清中から1-10nMのビスフェノールAを検出し、これとほぼ等しい1-3nMという低濃度でマウス初期胚発育を促進することを明らかにした。

我々は既に1-5pMという非常に低濃度のダイオキシン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ており、初期胚は内分泌かく乱物質への感受性が高いと考えられる。初期胚を用いた我々の実験系は内分泌かく乱物質の低用量作用を検討する上で有用であるため、その他の内分泌かく乱物質やそれらの相互作用なども含めて目下解析を続けている。

## 2. 研究実施内容

### 1) 乳児期の母乳摂取が子宮内膜症発症に及ぼす影響の検討

母乳中のダイオキシン量から試算すると乳児の摂取量は50-100 pgTEQ/kg/日となり耐容一日摂取量をはるかに超過している。母乳は大切な栄養源で人工乳に比べて利点も多いことは明らかであるが、母乳からのダイオキシン摂取が、乳児期の短期間ではあれ、その後の小児期あるいは成人に達した時点で健康に影響に対する可能性は否めない。一方、ダイオキシンはサルの実験で微量(126 pgTEQ/kg/day)でも子宮内膜症の病因となりうる可能性が示された。そこで、日本子宮内膜症協会会員や当科の患者および一般ボランティア女性を対象としたアンケート調査を施行し、母乳哺育が後々の子宮内膜症の発症リスクとなりうるかを検討した。その結果、対照群の母乳哺育率68%に対して腹腔鏡・開腹手術による子宮内膜症患者では同51%と対照で有意に母乳哺育率が高かった(図1)。これより母乳哺育により相対的に高いダイオキシンの被曝を受けることは子宮内膜症発症のリスクとはならないことが示唆された。(Tsutsumi et al. International J. Gynecol Obstet68:151-153, 2000)

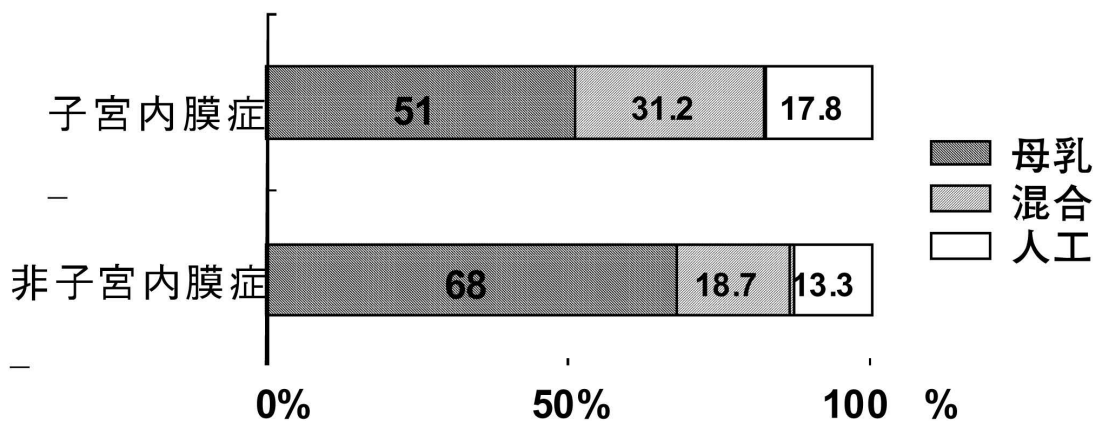


図1 乳児期の栄養方法が子宮内膜症発症に及ぼす影響

### 2) ダイオキシン類関連遺伝子の子宮内膜局所および子宮内膜症発症における関与に関する検討

TCDDの子宮内膜症発症との関連を解明するため、子宮内膜症患者と非子宮内膜症患者とではTCDDの子宮内膜に対する作用が異なるとする可能性を検討する

ため、TCDD受容体であるaryl hydrocarbon receptor ( AhR )、その受容体の共役因子であるAhR nuclear translocator ( Arnt )、TCDDに反応する二つの遺伝子 cytochrome P-450 1B1 ( CYP1B1 ) と p62 ( dok ) に関してmRNAのヒト子宮内膜における発現を半定量的RT-PCR法を用いて調査した。子宮内膜症患者と非子宮内膜症患者との比較ではAhR、Arnt、CYP1B1、p62 ( dok ) の発現に違いを認めなかったが、p62 ( dok ) のみ重症例で高い傾向にあった( 図2 : 次頁 )。子宮内膜におけるAhR等のダイオキシン関連遺伝子の発現を確認し、TCDDが子宮内膜に影響を及ぼす可能性が示唆された。( Igarashi T et al. Endocrine J., 46:765-772, 1999 )

### 3) 子宮内膜症患者における脂肪組織中ダイオキシン類濃度の測定

ヒト脂肪組織中のダイオキシン類の検出を試み、子宮内膜症の重症度の観点から検討した。当科で手術を受けた子宮内膜症患者12例を対象とし、インフォームドコンセント下に手術時に腹壁より1 cm角以下の脂肪組織を採取し試料とした。

その結果、全ての脂肪組織中よりダイオキシン類が検出され、同一患者の臍部と下腹部より採取された脂肪組織中のダイオキシン類濃度は同程度だった。脂肪組織中のダイオキシン類濃度は軽症子宮内膜症群では $11.20 \pm 2.89$  pgTEQ/gだった。一方、重症子宮内膜症群では $19.88 \pm 6.18$  pgTEQ/gで、重症例で有意に ( $p < 0.05$ ) 高い値を示した。

ダイオキシン類が子宮内膜症発症に関与するかは不明だが、重症例で汚染の程度が高い可能性があり、今後生活環境など背景の解析を含めた多数例の検討が必要であると考えられた。

### 4) 子宮内膜症患者における卵胞液中ダイオキシン類濃度の測定

ヒト卵胞液中のダイオキシン濃度の測定を行い、子宮内膜症との関連について検討をおこなった。インフォームドコンセント下に不妊患者の体外受精の採卵時に採取した卵胞液を用い、子宮内膜症群5例、対照群(非子宮内膜症群)4例を対象とした。子宮内膜症群はいずれも腹腔鏡にて内膜症と診断された例、対照群は内膜症はないと診断された例を用いた。卵胞液中のダイオキシン類濃度は子宮内膜症群 :  $0.023 \pm 0.006$  pgTEQ/g fat vs 対照群 :  $0.019 \pm 0.005$  pgTEQ/g fatと、有意差は認められなかったが、前者で高い傾向を示した。ヒト卵胞液よりダイオキシン類が検出され、子宮内膜症群では非子宮内膜症群に比べ、有意差は認められないものの、高い傾向が認められた。

### 5) 男性不妊患者における血清中ダイオキシン類濃度の検討

当科での体外受精施行男性患者38名( 乏精子症18名( 精子濃度 $40 \times 10^6$ /ml未満 )、対照20名 ) を対象としてその血清を試料とした。年齢あるいは精子濃度にて乏精子症患者および対照を4群に分け、各々の群の血清を等量ずつ混合し、ダイオキシン類を高分解能GS-MSにより定量分析を行った。その結果、35歳以上の高年

年齢群では明らかな差異は認められなかったが、35歳未満の低年齢群では乏精子症群で対照よりダイオキシン類濃度が高い傾向を示した（0.087 pgTEQ/g vs 0.057 pgTEQ/g）。

乏精子症にダイオキシン類が関連する可能性が示唆されたが、今後ライフスタイル等背景の解析を含めた多数例の検討が必要であると思われた。

#### 6) Hepatocyte Growth Factor (HGF) の子宮内膜症発症における関与の検討

子宮内膜症において腹腔内環境が変化することは多く報告されているが、子宮内膜症の有無による腹腔内貯留液（PF）中のHGF濃度を測定した。子宮内膜症Ⅲ/Ⅳ期の患者におけるHGF濃度は、0.906 ng/ml（0.561-1.185; median, interquartile range）で有意に子宮内膜症のない患者のHGF濃度（0.315 ng/ml, 0.251-0.472）より高く、子宮内膜症Ⅰ/Ⅱ期の患者ではその中間であった（0.417 ng/ml, 0.310-1.023）。HGFは正常子宮内膜で産生されることは知られているが、子宮内膜症組織においても産生されていることが推測され、腹腔内においてオートクライン/パラクライン的に子宮内膜症を制御している可能性が示唆された。（Osuga Y et al. Mol Hum Reprod 1999; 5:703-7）

#### 7) ビスフェノールAとエストロゲンレセプター および の相互作用に関する検討

ビスフェノールA（BPA）はプラスチックの基材として広く用いられているが、モノマーとして環境中に放出されると、エストロゲンレセプター（ER）に結合しエストロゲン作用に影響する内分泌攪乱物質と考えられている。ERを発現していないHeLa細胞にER、のそれぞれの発現ベクターおよびERE（estrogen responsive element）をもったCAT（chloramphenicol acetyl transferase）レポータープラスミドを遺伝子導入し、実験に用いた。転写活性はER、ともにBPA 1nMから検出され、用量反応性を認め、BPA 1000nMでE2 10nMとほぼ同等の活性となった。E2 10nMとBPAの各濃度の添加では、ERの場合、BPA 1-100nMでは変化がないが、1000nMでは約20%の転写活性の抑制が認められた。BPAはER、を介して単独ではエストロゲン作用を示すが、E2共存下ではERのサブタイプにより選択的にantagonist作用を認めた。ER、は発現臓器が異なっており、今回の結果から、BPAの内分泌攪乱作用は各臓器により異なる可能性が示唆された。（Hiroi H et al. Endocrine J, 46:773-778, 1999）

#### 8) 内分泌攪乱物質ビスフェノールAのマウス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

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。今回、マウス2細胞期胚を1pMから100  $\mu$ 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、発育率を観察した。その結果、1-3nMという低濃度で有意な発育促進効果が認められた。一方、100  $\mu$ M BPAでは有意に発育が抑制された(図2)。BPAは高濃度(100  $\mu$ 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 およびER 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。(Takai Y et al. Biochem Biophys Res Commun 270:918-21, 2000)

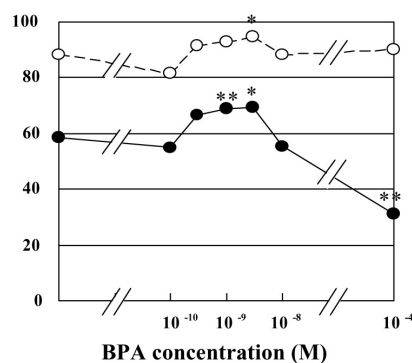


図2 ビスフェノールAのマウス初期胚発育に及ぼす影響

### 3. 主な研究成果の発表(論文発表)

Kamei Y, Tsutsumi O, Yamakawa A, Oka Y, Taketani Y, Imaki J: Maternal EGF deficiency causes fetal hypoglycemia and intrauterine growth retardation in mice: Possible involvement of placental glucose transporter GLUT3 expression. Endocrinology 140(9):4236-4243 1999

Hiroi H, Inoue S, Watanabe T, Goto W, Orimo A, Momoeda M, Tsutsumi O, Taketani Y, and Muramatsu M: Differential immunolocalization of estrogen receptor and in rat ovary and uterus. Journal of Molecular Endocrinology 1999 22:37-44 1999

Hiroi H, Momoeda M, Inoue S, Tsuchiya F, Matsumi H, Tsutsumi O, Muramatsu M, Taketani Y: Stage-specific expression of estrogen receptor subtypes and estrogen responsive finger protein in preimplantation mouse embryos. Endocrine Journal 1999 46: 153-158 1999

Takai Y, Tsutsumi O, Momoeda M, Osuga Y, Sadatsuki M, Kaibara M, Taketani Y: Non-functioning pituitary tumour after long-term treatment with gonadotrophin-releasing hormone agonists in a patient with vaginal agenesis who underwent neovaginoplasty and cauterization of endometriosis under laparoscopy. Human

Reproduction 14: 2661-2614, 1999

Osuga Y, Tsutsumi O, Momoeda M, Okagaki R, Matsumi H, Hiroi H, Suenaga A, Yano T, Taketani Y: Evidence for the presence of hepatocyte growth factor (HGF) expression in human ovarian follicles. *Molecular Human Reproduction* 5: 703-707, 1999

Uechi H, Tsutsumi O, Morita Y, Takai Y, Taketani Y: Comparison of the effects of rapid and ultrarapid cryopreservation on mouse two-cell embryos and subsequent development. *Human Reproduction* 14:2827-2832, 1999

Igarashi T, Osuga Y, Tsutsumi O, et al: Expression of Ah receptor and dioxin-related genes in human uterine endometrium in women with or without endometriosis. *Endocrine Journal*.46:765-772, 1999

Hiroi H, Tsutsumi O, Momoeda M, et al: Differential interactions of bisphenol A and 17 $\beta$ -estradiol with estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and ER $\beta$ . *Endocrine Journal*. 46:773-778, 1999

Osuga J, Ishibashi S, Oka T, Yagyu H, Tozawa R, Fujimoto A, Shionoiri F, Yahagi N, Kraemer FB, Tsutsumi O, and Yamada N: Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 787-92, 2000.

Maruyama M, Osuga Y, Momoeda M, Yano T, Tsutsumi O, Taketani Y: Pregnancy rates after laparoscopic treatment. Differences related to tubal status and presence of endometriosis. *J Reprod Med* 45:89-93, 2000

Tsutsumi O, Momoeda M, Takai Y, Ono M, Taketani Y: Breast-fed infants, possibly exposed to dioxins in milk, have unexpectedly lower incidence of endometriosis in adult life. *Int J Gynecol Obstet* 68:151-153, 2000

Takai Y, Tsutsumi O, Ikezuki Y, Hiroi H, Osuga Y, Momoeda M, Yano T, Taketani Y: Estrogen receptor-mediated effects of a xenoestrogen, bisphenol A, on preimplantation mouse embryos [In Process Citation]. *Biochem Biophys Res Commun* 270:918-21, 2000

Okutsu T, Kuroiwa Y, Kagitani F, Kai M, Aisaka K, Tsutsumi O, Kaneko Y, Yokomori K, Surani MA, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ishino F. Expression and Imprinting Status of Human PEG8/IGF2AS, a Paternally Expressed Antisense Transcript from the IGF2 Locus, in Wilms' Tumors. *J Biochem (Tokyo)* 127:475-483, 2000

Morita Y, Nishii O, Kido M, Tsutsumi O: Parvovirus infection after laparoscopic hysterectomy utilizing fibrin glue hemostasis. *Obstetrics and Gynecology* 95:1026, 2000

堤 治：特集環境ホルモン 内分泌攪乱物質と卵・初期胚発育 産婦人科の世界 51: 95-101, 1999

堤 治：内分泌攪乱物質（環境ホルモン）と生殖機能 日本母性保護産婦人科医

報 51: 12-13, 1999

堤 治、高井泰：内分泌攪乱物質の生殖機能への影響 産科と婦人科 66: 235-243, 1999

堤 治：性分化異常の臨床 性差医学 5: 20-27, 1999

堤 治：ダイオキシンの初期胚発育への影響 第112回日本医学会シンポジウム記録集 内分泌攪乱物質（環境ホルモン）と健康障害 26-31, 1999

堤 治：特集環境ホルモン研究の展開 ダイオキシンと初期胚発育 医学のあゆみ 190: 735-738, 1999

堤 治：環境ホルモンと不妊症 Pharma Medica 17: 120-125, 1999

堤 治：環境ホルモン汚染と問題点 日本産科婦人科学会雑誌 51: N211-214, 1999

堤 治：ダイオキシンと生殖機能 日本医事新報 3910: 161, 1999

堤 治：内分泌攪乱物質（環境ホルモン）と生殖機能 母子保健情報 39: 59-64, 1999

堤 治：内分泌攪乱物質の生殖機能への影響-ダイオキシンと初期胚発育 科学 69: 502-505, 1999

堤 治：ダイオキシンとヒト生殖 日本産科婦人科学会雑誌 51: 705-715, 1999

堤 治：環境ホルモンと哺乳類の生殖機能 エコインダストリー 4;8: 13-19, 1999

堤 治、甲賀かをり：子宮内膜症と環境因子 新女性医学大系 19巻子宮内膜症, 子宮腺筋症 中山書店 東京 261-269, 1999

堤 治：環境ホルモンと子宮内膜症 臨床検査 43: 1657-1659, 1999

堤 治：性分化異常の診断と治療 日本医事新報 3947: 113-114, 1999

堤 治：内分泌攪乱化学物質とジェネティクス 生殖とジェネティクス-ART向上のための遺伝子学 鈴木秋悦他編 メディカルビュー 130-137, 1999

堤 治：外因性内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）の生体への影響と検査 環境ホルモン、特にダイオキシンの初期胚への影響 SRL宝函 23,2: 74-77, 1999

堤 治：内分泌攪乱物質と生殖機能 Environ. Mutagen Res. 21: 287-292, 1999

堤 治：性腺分化の異常：純粹型性腺形成不全症 性分化異常 新図説泌尿器科学講座 4: 77-79, 1999

矢野哲、矢野直美、松見泰宇、和田修、堤 治、武谷雄二：特集生殖生理とアポトーシス 卵胞閉鎖とアポトーシス 産婦人科の世界 51: 9-15, 1999

矢野哲、松見泰宇、矢野直美、和田修、堤 治、武谷雄二：特集生殖とNO NOと卵胞発育 Hormone Frontier in Gynecology 6: 19-23, 1999

高井泰、堤 治：低用量ピルと環境ホルモン ホルモンと臨床 945-951, 1999

高井泰、堤 治、武谷雄二：特集遺伝子疾患診療の未来 性分化異常 総合臨床  
48: 126-130, 1999

堤 治：内分泌攪乱物質 内分泌攪乱物質とその問題点 Bio Clinica 15,2: 16-  
17, 2000

堤 治：環境ホルモンによる生殖障害 内科診療におけるpros.&cons. 内科  
85:569-572, 2000

堤 治：レタスクリニック 子宮内膜症・前編 2000年1月25日号 14巻2号 p.61

堤 治：レタスクリニック 子宮内膜症・前編 2000年2月10日号 14巻3号 p.88