

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
総括研究報告書（平成 10 年度）

ダイオキシン類の汚染状況及び
子宮内膜症等健康影響に関する研究

主任研究者

堤 治

東京大学医学部分院産科婦人科学教室

総括研究報告書

ダイオキシン類の汚染状況及び子宮内膜症等健康影響に関する研究

主任研究者 堤 治 東京大学医学部産科婦人科学教室

研究要旨 ヒト卵胞液中のダイオキシン類が卵胞液中に約 1pg/ml (0.01 pg TEQ/ml)存在することを明らかにした。さらに、マウス 2 細胞期胚を用いてダイオキシン類の 1 種である TCDD の胚発育への影響を検討し、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、8 細胞期胚の胚盤胞への発育率は有意に促進されることを明らかにした。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、初期胚のダイオキシン感受性は高いと考えられた。子宮内膜症患者に対する疫学的調査を行い、その母乳哺育率は正常対照群と比べて有意に低く、母乳哺育を受けることが後の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。

分担研究者 武谷雄二

東京大学医学部

教授

遠山千春

国立環境研究所

部長

諸橋憲一郎

基礎生物学研究所

教授

児期あるいは成人に達した時点での影響が危惧されている。しかしながらダイオキシン類の曝露量ならびに体内負荷量と子宮内膜症発症などを含めた生殖機能に及ぼす影響に関する研究はほとんどなされていないのが現状である。安全限界の設定は暫定的であり、ことに生殖機能への影響の有無、安全限界などは未知であるのが現状である。本研究で明らかにしようとするダイオキシン類の生殖機能への影響が明らかになれば、現行のダイオキシン類規制の見直し、改定にも重要な資料となることが期待される。仮にダイオキシン類濃度と判定指標が陰性となっても、生殖機能への影響に対する不安に答えることになり国民のニーズを満たすことができる。

A. 研究目的

ダイオキシンは極めて有毒な環境汚染物質で、少量でも発癌性を有することなどが知られていた。ダイオキシン類には①大気中への排出による直接的曝露、②食物連鎖による影響、③母乳に含まれるダイオキシン類の新生児・小児への影響などへの不安が高い。最近ダイオキシン類には内分泌攪乱物質として各種動物において生殖・発生異常を生ずることが報告され、サルを用いた実験で子宮内膜症の病因となりうることも示唆され、生殖機能への影響が注目されはじめた。またダイオキシン類は母乳中に多量に含有されることが明らかになり、小

B. 研究方法

1) 子宮内膜症患者手術時に皮下脂肪組織、子宮内膜症組織、子宮内膜組織、腹腔内貯留液、血液を採取する。これら組織および体液中のダイオキシン類濃度およびインターロイキン 6 などのサイトカイン濃度や NK 細胞活性（免疫能評価）の測定もおこなう。

対照は婦人科疾患で手術を受ける患者で、子宮内膜症を有しないことを確認したものとす。

更に、症例の蓄積のみならず患者背景などを含めた疫学的検討も加え解析する。

2) 不妊症患者で精液検査を受ける男性および健常男子ボランティアより精液・血液および皮下脂肪組織を採取、ダイオキシン類濃度を測定し、精液所見（精子濃度、運動率、奇形率）と比較検討する。

3) 体外受精患者の採卵時に得られる卵胞液を、卵胞毎に種別保存し、ダイオキシン類濃度およびエストロゲン、プロゲステロン、各種サイトカイン濃度を測定する。卵成熟度、受精率、卵割率、妊娠率のパラメーターとの比較検討をおこなう。

4) 実験動物（マウス）の未成熟卵、成熟卵、受精卵、发育段階にある卵を採取し各種濃度のダイオキシン存在下で培養し、受精率・胚发育率・糖取り込み能の発達などを解析する。

C. 研究結果

1) 子宮内膜症患者の脂肪組織と対照患者の脂肪組織のダイオキシン類濃度を測定したところ、少数例の検討では有意差を示唆する所見が得られた。

一方、日本子宮内膜症協会会員や東京大学病院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、月経困難症などの症状を持たない健常群の母乳哺育率が 68% に対して腹腔鏡・開腹手術による子宮内膜症群では 51% と健常者で母乳哺育率が高かった。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（下表）。

	総数	母乳哺育	混合乳	人工乳
正常対照群	2281	1550 (68.0)	427	304
内膜症群	567	289 (51.0)	177	101

2) 乏精子症患者と正常対照患者の精液中のダイオキシン類濃度を測定したところ、ダイオキシン類濃度と精子濃度に強い相関を示唆する所見が得られた。

3) ヒト卵胞液中のダイオキシン類の検出をガスクロマトグラフィーマス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生卵巣への汚染が存在することが示された（図 1）。

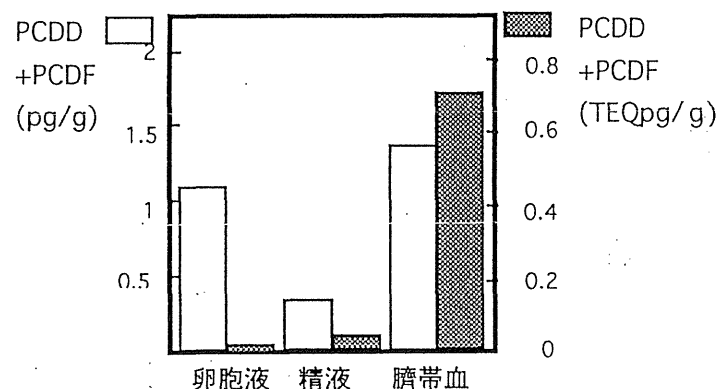


図 1 卵胞液、精液、臍帯血中のダイオキシン類濃度

4) マウス 2 細胞期胚を用いてダイオキシンの胚发育への影響を検討したところ、ダイオキシン類の 1 種である 2,3,7,8-TCDD を 1-5pM 添加した時、2 細胞期の 8 細胞期への发育率は有意に抑制された（図 2、○）。この作用は 10-100pM では検出されなかった。これより TCDD は低濃度では胚发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发育率では 1-5 pM で観察された抑制効果は認められない（図 2、●）。そこで、8 細胞期胚の胚盤胞への发育率を見ると図 2 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 の胚发育に対する作用は胚发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。これにより、初期胚发育における無毒性量（NOAEL）および最小毒性量

(LOAEL) が設定できた。

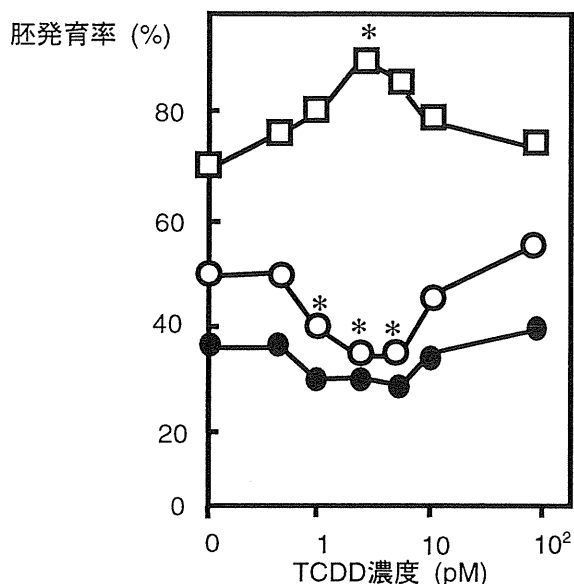


図 2 マウス 2 細胞期胚の発育に及ぼすダイオキシン (TCDD) の影響

D. 考察

子宮内膜症はこの20ないし30年の間に増加の一途をたどっているといわれる。平成9年度の厚生省研究班の調査報告では約12万人の女性が子宮内膜症の診療を受けていることが確認された。子宮内膜症とダイオキシンとの関連が特に注目を集めたのは、Rierらの報告による。これはサルを用いて4年間ダイオキシンを投与、その後10年間経過を観察したところ無投与群、連日5ppt投与群(126 pg/kg/day相当)、75ppt投与群(630 pg/kg/day相当)で子宮内膜症の発生率は各々2/6 (33%)、5/7 (71%)、6/7 (86%)と用量反応的に増加した。また、マウス、ラットを用いた研究でもダイオキシンが実験的子宮内膜症の発育に関係するという成績もある。子宮内膜症の患者の血液中のダイオキシン濃度を測定したところ、健常者より患者で高いとする報告もある。

しかしヒト血中有機塩素量は子宮内膜症と関係ないという否定的データもある。またダイオキシンとAh受容体を介して作用するとされているコプランナーPCBを同系の

サルに投与したArnoldらは無処置群(6/16; 37%)より投与群(16/64; 25%)で子宮内膜症の発生率が低い傾向にあり、投与量と内膜症の進行度との関連も見られなかったと報告した。

今回の我々の少数例の検討では、子宮内膜症患者の脂肪組織中ダイオキシン類濃度は対照患者と比べて有意差を示唆する所見が得られた。また、最近の我々の研究では、子宮内膜症患者の腹腔内貯留液中のkeratinocyte growth factor (KGF)濃度は対照患者と比べて有意に高かった。今後更に症例数を増やし、各種サイトカインの動態とともに、子宮内膜症発症およびその重症度とダイオキシン類濃度との相関について、出産経験の有無や居住地域などを考慮した厳密な controlled study を計画することが急務であると考ええる。

ダイオキシンは母乳中に高濃度に含有され、乳児の摂取は 100pg/kg/day 程度と算定される。ダイオキシンは前述した Rier らの報告では微量(126pg/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。しかしながら、今回の我々の疫学的調査では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。逆に母乳は子宮内膜症の発症を予防する可能性もあり、母乳が優れた栄養源であり、かつ少なくとも過去において安全性に問題がなかったことを支持するデータと考えられる。

母体投与されたダイオキシンは胎盤および母乳を介して胎仔、新生仔期に作用しその後の性機能にも現れる。精巣機能に関しては Mably らが妊娠 15 日のラットにダイオキシンを投与し、用量反応的に精子数が減少することを報告した。異常が現れた最小投与量は 64 ng/kg であった。Gray らはさらに 50 ng/kg でも精子の異常を認めた。これらは、毒性量の 1000 分の 1 レベルで生殖異

常が惹起されるということと同時に、昨今の人類の精子減少傾向にダイオキシン曝露が関係している可能性を示唆する。今回の我々の検討でも精子濃度と精液中ダイオキシン類濃度に有意な相関を認めた。今後は、そのメカニズムについて検討を重ねることが不可欠と思われる。

ダイオキシン類は特異的レセプターであるarylhydrocarbon receptor (Ah レセプター)を有し、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。今回の我々の検討によりヒトの卵胞液よりダイオキシン類が初めて検出され、低濃度ではあるもののヒト初期胚が既にダイオキシン類に曝露されていることが明らかとなった。更に、マウス2細胞期胚を用いた検討により、ダイオキシンは胚発育時期に特異的に、かつ1-5pMという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。

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 α β がともに発現しており、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。今後は、ダイオキシンが非常に低用量で胚発育に作用するメカニズムを糖取り込み能や糖輸送担体発現など生化学的・分子生物学的指標から検討し、更に他の内分泌攪乱物質との相互

作用についても解析していくことが不可欠と思われる。

E. 結論

子宮内膜症患者では正常対照群に比べて母乳哺育を受けた割合が有意に低く(51%対68%)、母乳により相対的に高いダイオキシン類の曝露を受けることが後の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。

ヒト卵胞液中にダイオキシン類が約1pg/ml (0.01 pg TEQ/ml)存在することを明らかにした。さらに、マウス2細胞期胚に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、8細胞期胚の胚盤胞への発育率は有意に促進され、初期胚のダイオキシン類に対する感受性が高いことが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsumi H, Yano T, Koji T, Ogura T, Tsutsumi O, Taketani Y, Esumi H: Expression and localization of inducible nitric oxide synthase in the rat ovary: a possible involvement of nitric oxide in the follicular development. *Biochem and Biophys Res Commun* 243: 67-72, 1998
2. Kamei Y, Tsutsumi O, Taketani Y, Watanabe K: cDNA cloning and chromosomal localization of neural adhesion molecule NB-3 in human. *Journal of Neuroscience Research* 51: 275-283, 1998
3. Kamei Y, Inagaki N, Nishizawa M, Tsutsumi O, Taketani Y, Inagaki M: Visualization of mitotic radial glial lineage cells in the developing rat brain by cdc2 kinase-phosphorylated vimentin. *Glia* 23: 191-199, 1998
7. Takai Y, Tsutsumi O, Harada I, Fujii T, Kashima T, Kobayashi K, Toda T, Taketani Y: Prenatal diagnosis of Fukuyama-type congenital muscular dystrophy by microsatellite analysis. *Human*

- Reproduction 13: 320-323, 1998
8. Momoeda M, Tsutsumi O, Morita Y, Igarashi M, Suenaga A, Osuga Y, Shiotsu H, Yano T, Taketani Y: Differential effect of exogenous human chorionic gonadotropin on progesterone production from normal or malfunctioning corpus luteum. Human Reproduction 13: 1907-1911, 1998
 9. Tsutsumi O, Uechi H, Sone H, Yonemoto J, Takai Y, Momoeda M, Tohyama C, Hashimoto S, Morita M, Taketani Y: Presence of dioxins in human follicular fluid: their possible stage-specific action on the development of preimplantation mouse embryos. Biochem Biophys Res Commun 250: 498-501, 1998
 10. Igarashi T, Yokomizo T, Tsutsumi O, Taketani Y, Shimizu T, Izumi T: Characterization of the leukotriene B₄ receptor in porcine leukocytes. Separation and reconstruction with heterotrimeric GTP-binding proteins. British Journal of Biochemistry 259: 1-8, 1999
 11. Matsumi H, Yano T, Koji T, Ogura T, Tsutsumi O, Taketani Y, Esumi H: Expression and localization of inducible nitric oxide synthase in the rat ovary: a possible involvement of nitric oxide in the follicular development. Endocrine Journal (in press)
 12. Hiroi H, Inoue S, Watanabe T, Goto W, Orimo A, Momoeda M, Tsutsumi O, Taketani Y, and Muramatsu M: Differential immunolocalization of estrogen receptor α and β in rat ovary and uterus. Journal of Molecular Endocrinology (in press)
 13. 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 (in press)
 14. Okagaki R, Osuga Y, Momoeda M, Tsutsumi O, Taketani Y: Laparoscopic findings after ultrasound-guided transvaginal ethanol sclerotherapy for ovarian endometrial cyst. Human Reproduction (in press)
 15. Matsumi H, Yano T, Koji T, Ogura T, Tsutsumi O, Taketani Y, Esumi H: Expression and localization of inducible nitric oxide synthase in the rat ovary: a possible involvement of nitric oxide in the follicular development. Endocrine Journal (in press)
 16. Hamai Y, Fujii T, Miki A, Geraghty DE, Harada I, Takai Y, Kozuma S, Tsutsumi O, Taketani Y: Quantitative assessment of human leukocyte antigen-G protein in amniotic fluid by a double-determinant enzyme-linked immunosorbent assay using anti-human leukocyte antigen-G-specific antibody '87G'. American Journal of Reproductive Immunology (in press)
 17. Matsumi H, Kozuma S, Osuga Y, Yano T, Yoshikawa H, Tsutsumi O, Taketani Y: Ultrasound imaging of pseudomyxoma peritonei with numerous vesicles in ascitic fluids. Ultrasound in Obstetrics and Gynecology (in press)
 18. Osuga Y, Tsutsumi O, Okagaki R, Takai Y, Fujimoto A, Suenaga A, Maruyama M, Momoeda M, Yano T, Taketani Y: Hepatocyte growth factor (HGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. Human Reproduction (in press)
 19. 堤 治: 腹腔鏡下手術の現況 臨床婦人科産科 52: 223-229, 1998
 20. 堤 治、武谷雄二: 卵・初期胚とアクチビン Hormone Frontier in Gynecology 5: 43-47, 1988
 21. 堤 治: 受精卵と初期胚 細胞 30: 122-125, 1998
 22. 堤 治: 不妊症治療における事故防止 周産期医学 28: 270-274, 1998
 23. 堤 治: 卵胞内環境と卵の成熟 新女性医学大系 12巻排卵と月経 中山書店 206-217, 1998
 24. 堤 治: 切迫早産における塩酸リトドリンの副作用と当帰芍薬散 産婦人科漢方研究のあゆみ 産婦人科漢方研究会編 15: 20-27, 1998
 25. 堤 治: 性の決定と分化 図説産婦人科VIEW 31巻 不妊の基礎 メジカルビュー社 東京 14-23, 1998
 26. 堤 治: 内視鏡手術の展開と看護 婦

- 人科領域 オペナーシング 13: 484-487, 1998
27. 堤 治: 腹腔鏡下子宮全摘術 術前術後マニュアル 出月康夫編 エキスパートナースMOOK 照林社 東京 246-248, 1998年
 28. 堤 治: 特集不妊治療の最前線 腹腔鏡下手術による不妊治療 日本医師会雑誌 120: 713-716, 1998
 29. 堤 治: 内分泌領域における内視鏡検査治療の進歩 序文 ホルモンと臨床 46: 739-740, 1998
 30. 堤 治: 腹腔鏡・子宮鏡検査 生体・機能検査のABC 日本医師会雑誌 120: S267-268, 1998
 31. 堤 治: 産婦人科における内視鏡手術の現況と将来 臨床婦人科産科 52: 1460-1463, 1998
 32. 堤 治: 腹腔鏡検査 新女性医学大系 15巻 不妊・不育 中山書店 東京104-112, 1998
 33. 堤 治: 卵胞内環境と卵の成熟 新女性医学大系 12巻 排卵と月経 中山書店 206-217, 1998
 34. Masatoshi Nomura, Ken Kawabe, Sumie Matsushita, Sanae Oka, Osamu Hatano, Nobuhiro Harada, Hajime Nawata & Ken-ichirou Morohashi: Adrenalcortical and Gonadal Expression of the Mammalian Ftz-F1 Gene Encoding Ad4BP/SF-1 Is Independent of Pituitary Control. J. Biochem. 124, 217-224, 1998.
 35. Ken-ichirou Morohashi, Hisae Tsuboi-Asai, Sumie Matsushita, Masahiro Suda, Manabu Nakashima, Hironobu Sasano, Yoshiaki Hataba, Chun-Lin Li, Junichi Fukuta, Junji Irie, Takeshi Watanabe, Hiroshi Nagura, & En Li: Structural and Functional Abnormalities in the Spleen of mFtz-F1 Gene Disrupted Mouse. BLOOD (in press)
2. 学会発表
1. 堤 治: 腹腔鏡下子宮内膜症根治術 ビデオセミナー子宮内膜症の手術 1998年2月8日 京都
 2. 堤 治: 性分化異常の臨床 第7回性差医学研究会 1998年2月28日 東京
 3. 堤 治: 腹腔鏡下手術とGnRHアゴニスト 東大茨城産婦人科集談会 平成10年5月27日 水戸
 4. 堤 治: 子宮筋腫の治療とGnRHアゴニスト 群馬県GnRH研究会 平成6年6月11日 前橋
 5. 堤 治: ランチョンセミナー「腹腔鏡下手術」 第95回日本産科婦人科学会関東連合地方部会 平成10年6月21日 東京
 6. 堤 治: 内分泌攪乱物質(環境ホルモン)と生殖機能 第25回徳島不妊内分泌研究会 9月17日 徳島
 7. 堤 治: 内分泌攪乱化学物質の女子性腺への影響 日本内分泌学会内分泌攪乱化学物質研究会 9月27日 東京
 8. 堤 治: 環境ホルモンの正しい認識 東京都特別区職員研修会 平成10年10月21日 東京
 9. 堤 治: 環境ホルモンと卵・初期胚 第36回日本不妊学会東北支部総会 10月24日 福島
 10. 堤 治: ランチョンセミナー「不妊症の診断・治療と腹腔鏡」 第43回日本不妊学会 平成10年11月12日 鹿児島
 11. 堤 治: 母乳哺育の安全性に関する統計的考察: 母乳中に含まれる環境ホルモン(ダイオキシン類)が子宮内膜症の発症リスクとなりうるか 第43回日本不妊学会 平成10年11月12日 鹿児島
 12. 堤 治: 内分泌攪乱物質ダイオキシンと卵・初期胚発育 アートフォーラム 平成10年11月13日
 13. 堤 治: ダイオキシンの初期胚発育への影響 日本医学会シンポ 環境ホルモンの健康への影響 平成10年12月4日 東京
 12. 堤 治: Presence of dioxins in human reproductive fluid and its action on the development of preimplantation mouse embryos 第1回環境ホルモン学会研究発表会 平成10年12月12日 京都
 13. 諸橋憲一郎、坪井久恵、松下純恵、須田正洋、中島学、笹野公伸、幡場良明、Chun-Lin Li、深田順一、入江準二、渡邊武、名倉宏、En Li: Ad4BP/SF-1ノックアウトマウスにおける脾臓の異常 第21回日本分子生物学会
 14. 川辺顕、鹿山達司、坪井久恵、岡早苗、名和田新、諸橋憲一郎: 視床下部-脳下垂体-性腺・副腎系における Dax-1 の発現とその制御 第21回日本分子生物学会
 15. Ken-ichirou Morohashi: Expression and regulation of transcription factors implicated in adrenal and gonadal development. 8th Adrenal Cortex Conference, Quebec
 16. 諸橋憲一郎: Function of Ad4BP/SF-1 and DAX-1 during steroidogenic tissue differentiation. 第71回日本内分泌学会シンポジウム 福岡
 17. 諸橋憲一郎: Transcription factors implicated in gonadal differentiation. 第9回福岡国際周産期シンポ 福岡

