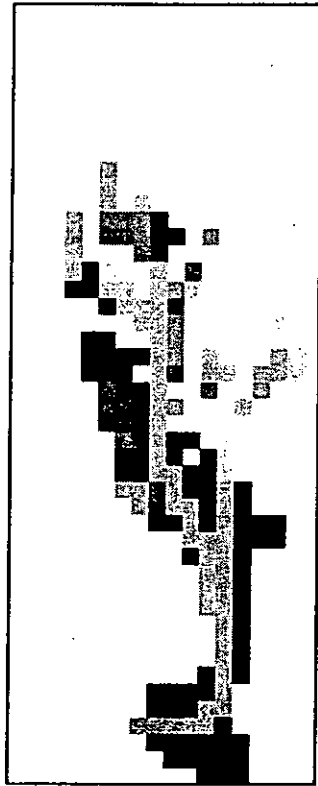
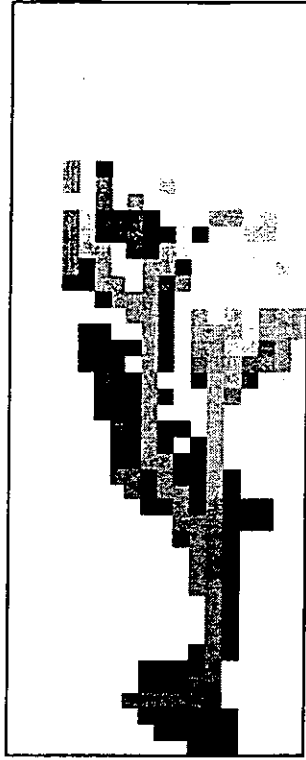


# 影響の面的分布



生物への影響指数 $R_e$ の分布



人に対する評価指数 $R_h$ の分布

# 子供をターゲットとしたリスク評価事例の収集 —幼児期の食事からのダイオキシン類摂取量の推計調査—

研究者 内山 巖雄、佐藤 加代子 国立公衆衛生院

## 研究要旨

一般的に成人はダイオキシン類摂取量の90%は食事から摂取されるといわれているが、成人とは異なる食生活を持ち、成長発達の著しい幼児期におけるダイオキシン類摂取量はこれまでに報告されていない。そこで本年は予備調査として沖縄県沖縄市において3歳児37名の食事調査からのダイオキシン類摂取量を推計し、推計値に関係する因子を検討し以下の結果を得た。

- ① 3歳児のダイオキシン類1日摂取量は $1.56\text{pg} \pm 0.69\text{pgTEQ/kg/日}$ と推定され、同地域の平均的成人の1.5倍（体重1kgあたり）の摂取量であったが、我が国のTDI（耐容1日摂取量） $4\text{pgTEQ/kg/日}$ を下回った。
- ② 魚介類からのダイオキシン類摂取量への寄与率が54.7%であった。魚介類の1日摂取重量は全国の3歳児に比べて少なかった。
- ③ 摂取されている魚介類の内容をみると、水産加工品が36%、県内産の魚介類が10%、県外産の魚介類が34%であった。水産加工品や県内産の魚介類はダイオキシン類含有量が低いと予想され、ダイオキシン類摂取に関しては減少につながると考える。

## A. 研究目的

職業暴露や事故等によってダイオキシン類（PCDD, PCDF, Co-PCB）に高濃度に暴露するとはつ癌や奇形の可能性が指摘されている。また、台湾油症では、暴露された母親から生まれた子供は、成長の遅延・行動上の問題・知力の低下も報告されており、ダイオキシン類の胎児期や乳幼児期への影響が懸念されている<sup>1)</sup>。

わが国では生涯摂取しても健康に影響がないとされる耐容一日摂取量は体重1kgあたり $4\text{pgTEQ/kg/日}$ と定められている。<sup>6)</sup> これまでの調査では、乳児期の母乳からの摂取量や大人の食事からの摂取量はある程度わかっている<sup>3)</sup>が、離乳食からほとんどの食品を食べるようになり大人と同じ食事に移行する成長発達の著しい幼児期<sup>4)</sup>に関してその摂取量はほとんど調査されていない。また、血液中や組織脂肪中のダイオキシン類濃度も体重が小さい乳幼児期には、測定に必要な試料が得られないために、そのデータはほとんど得られていない。従ってダイオキシン類のリスク評価を行う際に、乳児期の母乳による高濃度負荷による体内負荷量とその後の様に減衰して、成人の体内負荷量に移行していくのかが不明であるために、不確実性が大きくなっている。

そこで本調査では幼児期(3歳児)の食事からのダイオキシン類摂取量を、食事摂取状況調査から推計することを目的とした。

## B. 研究方法

### I 対象と方法

#### 1. 対象者

沖縄県沖縄市に居住し平成12年11.12月各1日の3歳児健康審査(以下健診と略す)を受診した108名(受診対象者152名)のうち協力を得られた37名(男児23名 女児14名)を対象とした。

#### 2. 方法

3歳児検診の会場で保護者に対して調査についての説明を行い協力が得られた保護者に自記式調査票・調理用はかりを配布した。主な調査内容は、指定した3日間のうち2日間(平日)に3歳児が喫食した食物について秤量法(材料時の重量)による食物摂取状況調査で、1週間以内に地域の母子保健推進員が家庭を訪問して調査票の記入漏れを確認し回収した。食事摂取状況の内容に不確実な点があるときには栄養士が電話をして確認した。

### II 分析方法

#### 1. ダイオキシン類の1日摂取量の推計

摂取食品を国民栄養調査の食品群別票に基づき以下の14群別に分け各群の重量を算出した。但し今回は14群の飲料水はダイオキシン類濃度を0と仮定して、調査は行わなかった。食品毎の重量への換算と食品群への分類は国民栄養調査の経験のある沖縄県の栄養士に依頼した。

食品群毎のダイオキシン濃度は「平成11年度食品からのダイオキシン1日摂取量調査などの調査結果」<sup>6)</sup>の九州地区Bを使用し、群別摂取量は国民栄養調査食品群別表(平成9年度)<sup>5)</sup>に準じた。このダイオキシン類濃度の測定は「トータルダイエットスタディー」で行われているので、調理後の重量を使用している。一方本調査では調理前の重量を調査しているので調理後の重量として沖縄県における「有機塩素系化合物の群別分析結果および1日摂取量」(1999年度)<sup>7)</sup>を使用して、調理後の値に修正を行った後、食品群ごとのダイオキシン類の量を計算し、各対象者のダイオキシン類1日摂取量を算出した。

#### <食品群>

- 第1群：米・米加工品
- 第2群：穀類・種実類・いも類
- 第3群：砂糖類・菓子類
- 第4群：油脂類
- 第5群：豆類・豆加工品
- 第6群：果実類
- 第7群：緑黄色野菜
- 第8群：その他野菜・きのこ類・海そう類

第9群：調味・嗜好飲料

第10群：魚介類

第11群：肉類・卵類

第12群：乳・乳製品

第13群：その他食品(カール・シユールなど)

第14群：飲料水

なお、トータルダイエツトスタディは、「通常の食生活において、食品を介して化学物質などの特定の物質がどの程度実際に摂取されているかを把握するための調査方法。飲料水を含めた全食品を14群に分け、国民栄養調査による食品摂取量に基づき、小売店などから食品を購入し、必要に応じて調理したあと、各食品群ごとにダイオキシンの分析を行い国民一人あたりの平均的な1日摂取量を推定する。」と定義されている。

### C. 研究結果

#### 1. 食品からのダイオキシン類1日摂取量の推計

3歳児の食品からのダイオキシン類1日摂取量は平均  $1.56 \pm 0.69 \text{pgTEQ/kg/日}$  と推計された。最高値は3.24、最低値は  $0.26 \text{pgTEQ/kg/日}$  であった。

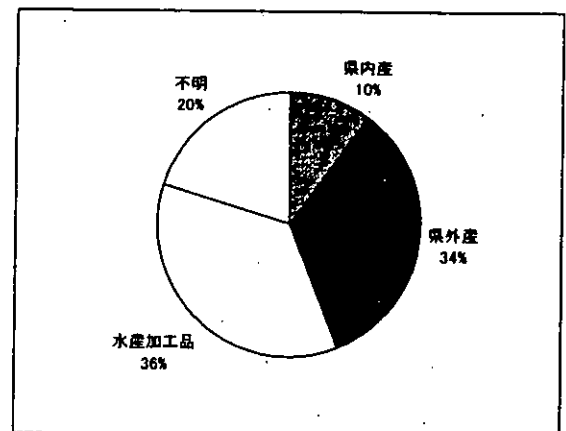
#### 2. 食品群別摂取量

沖縄市の3歳児における食品群別の食品摂取量(平均値)と各群のダイオキシン類摂取量(平均値)と全体の摂取量に占める割合を表1に示した。

表1 食品群別ダイオキシン摂取量

食品群	食品	
	平均摂取量 (g)	平均摂取量 (%) pgTEQ
第1群	74.3	5.589 (25.8)
第2群	70.7	0.051 (0.2)
第3群	34.6	0.28 (1.3)
第4群	7.7	0.038 (0.2)
第5群	36.8	0 (0)
第6群	71.1	0 (0)
第7群	38.2	0.011 (0.1)
第8群	79.1	0.003 (0.0)
第9群	79.1	0 (0)
第10群	25.3	11.856 (54.7)
第11群	72.4	1.208 (5.6)
第12群	205.7	2.657 (12.2)
第13群	10.21	0 (0)
合計		21.69 (100.0)

図1 魚介類の内容



ダイオキシン摂取量の割合が最も多かったのは10群(魚介類)が54.7%で、次い

で1群(米・米加工品)の25.8%、12群(乳・乳製品)12.2%、11群(肉類・卵類)5.6%となった。そこで、最も寄与率の高い魚介類の内容を調査票から分類した(図1)。まず魚介類を一般にいう魚介類、(生魚・タコ・エビ・イカなど未加工のもの)と水産加工品(缶詰・鱈節・練り製品・干物)にわけ、魚介類は県内産と県外産に分けた。産地の分からないものは不明とした。その結果最も多かったのが水産加工品36%で、次いで県外産の魚介類34%、県内産の魚介類10%であった。水産加工品のうち、缶詰は全てマグロの缶詰であった。

次に3歳児の食品群別摂取量が成人と異なる特徴があるか否かを検討した。そのために体重1kgあたりの食品群別摂取量を3歳児と同地域の成人とで比較した。比較には平成9年度国民栄養調査：食品群別摂取量(地域別ブロック別：南九州)を使用した(図2)。3歳児の食品群別摂取量は、ほぼ成人のパターンに類似してい

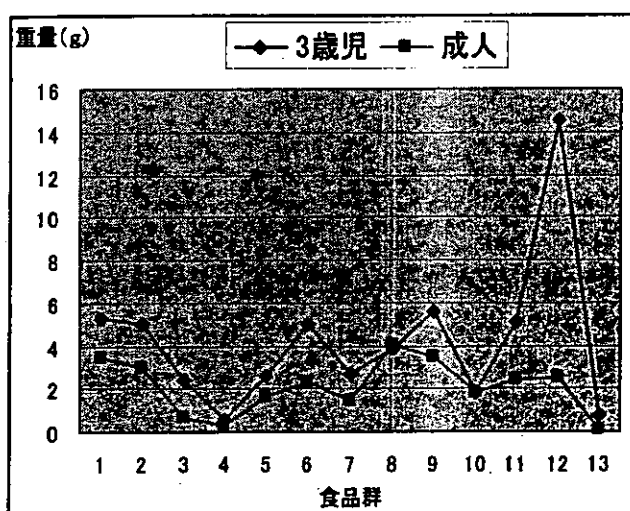


図2 体重あたり食品群別重量の比較

たが、3歳児が多かったのは12群(乳・乳製品)で3歳児14.61g、成人2.49gであった。次に6群(果実類)ではそれぞれ5.04g、2.32g 11群(肉類・卵類)ではそれぞれ5.13g、2.41gであった。一方、寄与率が最も高かった10群(魚介類)は、3歳児1.79g、成人1.81gとほとんど差はなかった。

### 3. 栄養素等摂取量

3歳児の栄養素等摂取量を本調査と全国で比較した。比較には年齢別栄養素等摂取量平均値(保育日)を使用した。<sup>8)</sup> また、目安として食品摂取基準(3~5歳)を列挙した<sup>9)</sup> (表2)。沖縄市の3歳児のエネルギー摂取量、タンパク質、脂質とも、全国値よりもやや少なかった。

表2 栄養素等摂取量の比較 沖縄市：全国

	沖縄市 n=37	全国 n=725	摂取基準 (3-5歳)
エネルギー kcal	1104	1265	1550
タンパク質 g	41	46.4	47.3
脂質 g	39	41.7	47.3

## D. 考察

### 1. 食品からの1日ダイオキシン類摂取量

3歳児における1日ダイオキシン類摂取量は成人よりかなり多いのではないかと予測されていた。その理由としての①3歳児では体重当たり1日エネルギー摂取量が成人に比べて多い、②3歳児の食事は食品群別摂取量で乳・乳製品が多いのではないかと考えたからである。しかし、本調査の3歳児における1日ダイオキシン類摂取量は、1.56pgTEQ/kg/日であり、同地域における成人のダイオキシン類摂取量(九州地区B)の1.19 pgTEQ/kg/日の約1.5倍にとどまった。

国民栄養調査平成9年度：地域ブロック別栄養素等摂取量：南九州地区)<sup>5)</sup>の成人の1日エネルギー摂取量は1953kcal、日本人の平均体重を50kgとする<sup>6)</sup>と、体重1kgあたりエネルギー摂取量は39.1kcalである。一方、本調査の3歳児の1日エネルギー摂取量は1104kcal、平均体重は14.1kgであり、体重1kgあたりのエネルギー摂取量は78.3kcalである。エネルギー摂取量の比から推測すると3歳児のダイオキシン類摂取量は2.39pgTEQ/kg/日となるが実際のダイオキシン類摂取量はそれより低かった。この理由を以下の食品群別摂取量、魚介類の内訳の分析結果から考察していくこととする。

### 2. ダイオキシン類摂取量の食品群別寄与率

食品群別の寄与率を見ると、今回の調査では魚介類に次いで、1群の米・米の加工品の寄与率が高いが、同時に調査された他の地域の1群のダイオキシン類濃度はほとんど0 pgTEQであった。これまでの調査でも1群の寄与率はほとんどない。この事実について、調査責任者に問い合わせたが、単純な集計ミスではなく、測定値が高かった理由は不明であった。

最も寄与率の高かった魚介類を体重あたりの摂取重量で比較すると3歳児では1.77g 成人は1.81gでほとんど差がなかった。これが予測値ほど高くなかった原因の1つと考えられる。また12群(乳・乳製品)の寄与率が12.2%と大きかったが、食品群別重量でも成人は2.5g 3歳児は14.6gと、3歳児が6倍と著明に多かった。これは3歳児に共通な特徴思われたが、この地域の乳・乳製品中に含まれるダイオキシン類濃度が低いことが、予測値より低かった第2の理由と考えられる。

また魚介類の内容をについてさらに詳しく検討すると水産加工品が36%、県内産の魚介類が10%、県外産の魚介類が34%であった。水産加工品は未加工の魚介類に比べてダイオキシン類濃度がかなり低いことが報告されている(それぞれ平均0.452pgTEQ/g、1.492pgTEQ/g)ので、この摂取割合が多いことも、予測値より低かった理由と考えられる。さらに沖縄近海の県内産の魚介類のダイオキシン類濃度は県外産のものより、かなり低いことも報告されている。

## E. 結論

1. 沖縄市の3歳児における1日ダイオキシン摂取量は1.56pgTEQ/kgbw/dayで、成人の約1.5倍であり。わが国のTDI（耐容1日摂取量）4pgTEQ/kgbw/dayを下回った。
2. ダイオキシン類摂取量の食品群別寄与率は10群（魚介類）が53.9%をであった。つぎに、1群（米類・米加工品）25.8%、12群（乳・乳製品）12.2%であった。
3. 寄与率の大きかった魚介類の内容はダイオキシン類尾濃度の低い水産加工品36%、県内産魚介類10%、県外産魚介類34%であった。また、成人や全国平均値と比較して、魚介類の摂取量が少ないことが、本調査の3歳児に認められた。

## F. 謝辞

本研究は沖縄市保健婦仲宗根様・母子推進員の皆様、コザ保健所栄養士知念様、在宅栄養士東嵩西様・上原様・米城様、国立公衆衛生院専攻課程看護コース佐藤祐子さんのご協力をいただきました。また調査にご協力いただいた沖縄市の皆様に感謝致します。

## 参考文献

- 1) 環境庁ダイオキシンリスク評価研究会、ダイオキシンのリスク評価、中央法規出版、1988、1-5 62-75 87-103
- 2) Carrier G, Ayotte P, Dewailly E, Health Risk Assessment for Newborns Exposed to Organochlorine Compounds Through Breast Feeding, ORUGANOHALOGEN COMPOUNDS ; 21 : 1994、45-50
- 3) 内山 厳雄、<環境ホルモンのトピックス>ごみ焼却とダイオキシン、公衆衛生、1999 ; 63、7 : 468-477
- 4) 二木 武、偏食とは何か どう防ぐか、食生活、1993 ; 8、14-23
- 5) 厚生省、国民栄養の現状 平成9年度国民栄養調査の結果、厚生省保健医療局地域保健・健康増進栄養課生活習慣病対策室、1997
- 6) 豊田 正武 他、平成11年度厚生科学研究費補助金 ダイオキシン類の食品経由総摂取量調査研究報告書案、厚生省生活衛生局、2000
- 7) 玉那覇康二・上原隆・玉城宏幸・古謝あゆ子、沖縄県における日常食品からの環境汚染物質等の1日摂取量調査(1999)、沖縄県衛生環境研究所報、2000 ; 34 : 129-136
- 8) 君羅満、平成10年度厚生科学研究(子ども家庭総合研究事業)報告書(第3/6) 幼児のライフスタイルに対応し、食物摂取および発育・発達を踏まえた食教育の枠組みに関する研究 分担研究 : 保育所通所児における食物摂取の状況について、厚生省、1998、294-298、
- 9) 第6次改訂 日本人の栄養所要量-食事摂取基準-の活用 平成12年3月、厚生省、2000
- 10) 平成11年度 食品からのダイオキシン類摂取状況調査結果、東京都衛生局、2000

## ヒト胚及び卵胞液中での影響物質の分析に関する研究

研究者 堤 治 東京大学医学部・分院産科婦人科学教室

### 研究要旨

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。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、若年の乏精子症群で対照群より高い傾向があった。マウス2細胞期胚をダイオキシン存在下に培養したところ、1-5 pMという非常に低い濃度で胚の発育段階特異的に発育を抑制あるいは促進することが明らかとなった。

ダイオキシンと並んで内分泌攪乱物質としての作用が注目されるビスフェノールA (BPA)はヒト体液中にも数 nM 検出される。新たに開発された簡便な BPA 測定法である ELISA 法によりヒト羊水中の BPA 濃度を測定したところ、妊娠中期の羊水より他の体液の数倍に達する濃度の BPA が検出された。また、マウス2細胞期胚を BPA 存在下に培養したところ、1nM では有意な発育促進効果が認められ、100 $\mu$ M では有意な抑制効果が認められた。得られた胚盤胞を胚移植し、得られた新生仔の発育および生殖能を検討したところ、生後3週における体重で30%以上の有意な発育の促進が認められた。初期胚の BPA に対する感受性は高く、着床前の曝露もまた次世代の発育に影響を及ぼすことが示唆された。

### A. 研究目的

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、小児期あるいは成人に達した時点での影響が危惧され、健康不安は国民全般に及んでいる。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造精機能や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。

本研究の第1の目的として、ダイオキシン類の生殖機能へ影響を明らかにするために、ダイオキシン類濃度とヒトにおける各種生殖パラメーターとの量-反応関係を明らかにする。生殖パラメーターとして、①精子濃度や運動能などの造精機能、②子宮内膜症の発症や進行度、③体外受精患者の採卵時得られる卵胞液中濃度と卵成熟度、受精率、胚発育率、妊娠率との関係などを検討する。

第2の目的として、実験動物(マウス)の卵や胚、胎仔の発育に及ぼすダイオキシンの影響を定量的に解析する。具体的には未成熟卵、成熟卵、受精卵、発育段階にある胚を採取し各種濃度のダイオキシン存在下に培養し、成熟・受精・発育せしめた上で受精率・胚発育率・標識 2-deoxyglucose を用い glucose の取り込み能の発達を解析する。また、受精



卵を子宮内に胚移植して妊娠・出産せしめ、新生仔の発育や生殖能力に及ぼすダイオキシンの影響を検討する。

第3の目的として、ダイオキシンの作用機序を分子レベルで明らかにする。具体的には、エストロゲン応答配列を転写活性領域に含むルシフェラーゼ発現プラスミドを構築する。それを細胞に発現させ、様々な濃度のダイオキシンを細胞培養液に加え、ルシフェラーゼ活性を定量し、エストロゲン活性を測定する。

第4の目的として、ダイオキシソ類以外の内分泌攪乱物質（ビスフェノールAなど）についても、その汚染状況や受精、初期胚・胎児発育、生殖機能、次世代の行動や学習能力への影響に関して検討を進める。

## B. 研究方法

### 1) 不妊女性におけるダイオキシソ類汚染とその背景の検討

インフォームドコンセント下に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、ダイオキシソ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。

### 2) 不妊男性患者におけるダイオキシソ類汚染とその背景の検討

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インフォームドコンセントを得て精液・血液および皮下脂肪組織を採取、ダイオキシソ濃度を測定する。精液所見（精子濃度、運動率、奇形率、精子染色体）と濃度間の比較検討をおこなう。患者背景（本人の生育が母乳哺育か人工乳であるかなど）に関する疫学的検討も加える。

### 3) ダイオキシソ類以外の内分泌攪乱物質による人体の汚染状況の把握と生殖機能や次世代に及ぼす影響の検討

ダイオキシソ類以外の内分泌攪乱物質（ビスフェノールAなど）についても、その汚染状況や内分泌攪乱のメカニズム、更に受精、初期胚・胎児発育、生殖機能や次世代の行動や学習能力への影響に関して検討を進める。我々によって確立されたマウス初期胚を用いた実験系とラット胎内被曝モデルを用いた実験系を中心に解析を進める。

## C. 研究結果

### 1) ダイオキシソ類による性腺の汚染

内分泌攪乱物質の汚染は卵巣あるいは卵胞に及ぶことが推察される。Jarrellらはカナダの3つの都市で得られた体外受精時の卵胞液中ポリ塩化ビフェニール（PCB）等の濃度を測定し、受精率や妊娠予後との関連を検討した。PCBは電気製品、熱媒体として用いられ現在生産中止となっているが、いまだに環境中から検出されている内分泌攪乱物質の一つである。血液中と同様に卵胞液中にもPCBは検出されたが、そのレベルは低くその濃度と受精率との相関を認めなかった。また地域による汚染レベルの差は確認されたが体外受精の成績には影響を認めなかった。この成績からは内分泌攪乱物質は卵胞液をも汚染するが、

現状では卵のクオリティー等に影響を与えるには至っていないと考えられる。

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り、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 (図 1)。同時に精液からもダイオキシン類が検出され、精子もまたダイオキシン類により汚染されていることが確認された。

## 2) 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) (図 2)。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。

## 3) ビスフェノール A による性腺・羊水の汚染

ビスフェノール A (以下 BPA) はプラスチックの原料等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攪乱物質である。BPA はエストロゲン様活性を持ち、低用量投与によるマウス初期胚発育の促進 (0.23-0.68 ng/ml)、雄の前立腺肥大と精子産生減少 (2 ng/g 母獣体重)、雌の性成熟促進 (同 2.4 ng/g) など、次世代の生殖機能に影響を及ぼすとの報告もあり、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。今回、我々は、母体血、臍帯血、羊水、卵胞液からの BPA の検出に成功し、その汚染の程度について検討した。BPA 濃度の測定は、試料にアセトニトリルを加え除蛋白し、固相抽出後に濃縮、抗 BPA 抗体を用いた競合 ELISA 法により分析した。BPA はすべての検体から検出された。

血中 BPA 濃度は、ボランティア女性では  $2.04 \pm 0.71$  (0.65-3.71) ng/ml、不妊患者では  $1.76 \pm 1.12$  (0.76-6.01) ng/ml で、両者に有意差はなかった。一方、卵胞液中 BPA 濃度は  $2.38 \pm 0.78$  (0.84-4.45) ng/ml で、生殖器官の汚染も確認された。不妊患者の卵胞液において、採卵数、受精率、卵の grade について BPA 濃度との間に相関はなかった。しかしながら、羊水穿刺で得られた妊娠 15-18 週の羊水において BPA 濃度が他のヒト体液より数倍高い可能性が示唆された。妊娠末期の羊水では他の体液とほぼ同様の濃度であるため、ヒト胎児は内分泌攪乱物質など外来の物質に対する感受性が高いと考えられている妊娠中期において、環境中よりも高い BPA に曝露されていることが示唆された。BPA がヒトの生殖機能や母体・胎児に及ぼす影響やその体内動態、また不妊症、疾患、先天奇形などとの関連についてはいまだ不

明であるが、一部の内分泌攪乱物質や外来物質においては、胎児の代謝・排出のメカニズムが未熟であるために、母胎よりも汚染の程度が高い可能性があり、今後更に多数例での検討と原因の究明が不可欠であると思われる。

#### 4) ダイオキシン類の初期胚発育に及ぼす影響

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3、○)。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3、●)。そこで、8細胞期胚の胚盤胞への発育率を見ると図3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。

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の用量反応的に有意の増加を認めた(図4)。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。TCDDが細胞の増殖や分化を促進する作用としては、胎児の口蓋部におけるものが知られている。この作用は口蓋裂の発生に直接関与し、興味深いことに、ダイオキシンが胎盤を通過して、直接胎児自身のAhレセプターに作用するためと考えられている。その根拠として、AhレセプターのノックアウトマウスではTCDD投与によって口蓋裂が生じないことが明らかとなっている。

#### 5) ビスフェノールAの初期胚発育に及ぼす影響

ビスフェノールA (BPA) は、エストロゲンレセプター (ER) に結合するため、ダイオキシン同様内分泌攪乱物質としての作用が注目ないし危惧されている。これまでも、ラット子宮・腔の細胞増殖促進作用 (300ng/g·day)、母獣投与による仔マウスの精子産生減少 (20ng/g·day)、ラット下垂体細胞におけるプロラクチン分泌促進作用 (0.1-1.0μM)、ERαあるいはERβ発現培養細胞における転写活性促進作用 (100-1000nM) などが報告されている。更に最近、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。我々は既にマウス初期胚にERαおよびERβが発現することを認めて報告しているが、今回、BPAが初期胚発育に及ぼす影響を明らかにしようとした。

5-7週齢B6C3F1マウスをPMSGおよびhCGにて過排卵刺激後交配させ、hCG投与の40時間後に2細胞期胚を採取した。更に、得られた胚を1pMから100μMまでのBPAあるいはER

阻害剤である tamoxifen (100nM) 存在下に培養し、24 時間後と 48 時間後にそれぞれ 8 細胞期胚形成率と胚盤胞形成率を算定し、 $\chi^2$  乗検定により解析した。培養にはフェノールレッド不含の Brinster's BMOC3 培地 (Gibco BRL 社) を用いた。得られた胚盤胞は Hoechst33258 で核染色し、細胞数を算定した。2 細胞期胚から 72 時間培養後の拡張胚盤胞を BPA を含まない FO-CMRL 培地で培養し、48 時間後の trophoblast spreading (栄養胚盤胞の広がり) をコンピュータによる画像解析により定量した。

2 細胞期胚からの 8 細胞期胚形成率は、対照 (BPA: 0) の 88.0% に対して、3nM BPA 存在下では 94.0% と有意に増加した。また、2 細胞期胚からの胚盤胞形成率は、対照 (BPA: 0) の 58.7% に対して 1nM、3nM でそれぞれ 69.0%、69.2% と有意な発育促進効果が認められた。一方、100 $\mu$ M BPA では 31.2% と有意に発育が抑制されたが、8 細胞期胚形成率は対象と差がなかった。10nM から 10 $\mu$ M では促進効果も抑制効果も認められなかった (図 5)。

1nM および 3nM BPA 存在下における胚盤胞への発育促進効果は ER 阻害剤である 100nM tamoxifen の添加で有意に抑制された (図 6B; 49.1% および 52.1%)。一方、100 $\mu$ M BPA 存在下における発育抑制効果は、tamoxifen により消失した (72.4%)。tamoxifen 単独では促進効果も抑制効果も認められず、8 細胞期胚への発育率は tamoxifen より影響を受けなかった (図 6A)。

得られた胚盤胞は形態的に差がなく、細胞数は対照、1nM、3nM、100 $\mu$ M で差がなかった。他方、BPA 曝露下に得られた拡張胚盤胞を BPA 非存在下に 48 時間培養して trophoblast spreading を観察したところ、対照、1nM、3nM では差がなかったが、100 $\mu$ M BPA 存在下に得られた胚盤胞では trophoblast spreading が有意に増大した (図 7)。

以上のように、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 $\alpha$  および ER $\beta$  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。BPA に曝露された初期胚は形態的には差がなく、細胞数にも有意差は認められなかった。しかしながら、得られた胚盤胞の trophoblast spreading を観察することによって質的な差異を検討したところ、高濃度 (100 $\mu$ M) の BPA に曝露された初期胚でむしろ発育能が高いという結果が得られた。

これにより BPA が胚盤胞の着床後の発育に影響を及ぼす可能性が示唆されたため、得られた胚盤胞を 5-7 週齢 ICR 雌マウスに胚移植し、得られた新生仔の発育および生殖能を検討した。生まれた仔に外表奇形はなく、性比や出生時体重にも有意差はなかった。しかし、生後 3 週における体重は、対照の  $9.7 \pm 2.8$  g に対して 1nM および 100 $\mu$ M ではそれぞれ  $13.5 \pm 1.6$  g および  $13.0 \pm 1.6$  g であり、BPA 曝露群で 30% 以上の有意な発育の促進が認められた (図 8)。これより初期胚の BPA に対する感受性は高く、BPA の内分泌攪乱作用が明らかになった。胚移植により得られた新生仔の発育が BPA 曝露群で促進されることより、妊娠後期の曝露のみならず着床前の曝露もまた次世代の発育に影響を及ぼすことが示唆された。

我々ヒトは多量のBPAに曝露されており、我々の最近の検討では血清や卵胞液中からもnMレベルのBPAが検出されている。今回、これとほぼ等しい濃度(1-3nM)でマウス初期胚の発育に影響を及ぼすことが示されたことは、今後の内分泌攪乱物質の研究において重要な意義を持つものといえる。

#### 6) その他の内分泌攪乱物質の初期胚発育に及ぼす影響

フタル酸エステル類、スチレンポリマーについても初期胚を用いた同様の解析を行ったところ、内分泌攪乱物質作用が疑われる前者と内分泌攪乱物質としての作用が否定的とされることの多い后者で、初期胚発育に及ぼす影響に相違点が観察された。このことは初期胚を用いた本実験系が内分泌攪乱物質作用と毒性を区別する上で有用なツールであることを示唆すると考えられるため、今後はミレニアムプロジェクトで指摘された物質を中心に、対象物質を増やして検討していきたいと考えている。

#### D. 考察

ダイオキシン(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、Ahレセプターが関与していることは示唆される。また、我々の検討ではこれら初期胚にはエストロゲンレセプター $\alpha$ および $\beta$ 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ることも想像される。TCDDはEGF receptorをdown regulationすることが報告されており、TCDDとEGFの作用の類似性も指摘されている。更に最近、TCDDは細胞質のSrc kinaseを活性化することが報告され、これがEGFレセプターなど種々の成長因子レセプターのSH2ドメインを介して細胞増殖の情報伝達に関与している可能性が示唆されている。TCDDの胚発育への作用機構にはEGF作用を介している可能性があり、ダイオキシン類を始めとする内分泌攪乱物質は成長因子の作用をも攪乱することが考えられるため、更なる検討が必要と思われる。

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、用量反動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、男性不妊症患者の血清ダイオキシン類濃度を測定し、35歳以上の高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、乏精子症、特に若年者のそれにダイオキシン類が関連する可能性が示唆された。今後も引き続き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り、更に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。

ビスフェノールA(BPA)はプラスチックの基材などとして広く用いられており、現在最もその生理作用が注目されている内分泌攪乱化学物質の一つである。その分子構造は

estradiolとは異なり、むしろ diethylstilbestrol (DES)に類似する。BPA は食料品の缶の内側のコーティング剤、歯科治療時の充填剤、ポリカーボネート系プラスチック製品の材料として広く用いられており、実際にオートクレーブ処理された培養フラスコ、熱処理された缶入り野菜、歯科治療時の唾液などから検出されている。

前項に述べたごとく、ビスフェノール A (BPA)は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化学物質と考えられている。最近新しい ER (ER $\beta$ )が発見され、従来の ER $\alpha$ と比較して、その発現様式やリガンドに対する転写活性が異なることが報告されている。今回我々は、BPA の ER $\alpha$ 、 $\beta$  のそれぞれを介したエストロゲン作用の発現様式を解析し、BPA は ER $\alpha$  および ER $\beta$  を介して単独でエストロゲン作用を示すことが明らかにした。Kuiper らによると、BPA 1000nM は、同濃度の E2 と比べて ER $\alpha$  および ER $\beta$  を介してそれぞれ 50% および 41% の転写活性を示すことが報告されているが、我々の検討でも同様に、10nM の BPA は同濃度の E2 の約半分の転写活性を示した。更に、E2 共存下では ER $\alpha$  を介した経路では antagonist 作用を認めたが、ER $\beta$  を介した経路では agonist 作用のみを認めることが明らかとなった。ER $\alpha$ 、 $\beta$  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。

前項に述べたように、ビスフェノール A (BPA) はエストロゲンレセプター (ER) と結合し、内分泌攪乱化学物質としての作用が注目ないし危惧されている。これまでも、ラット子宮・膣の細胞増殖促進および c-fos 誘導作用 (300ng/g·day)、ラット下垂体細胞におけるプロラクチン分泌促進作用 (0.1-1.0 $\mu$ M)、MCF-7 乳癌細胞におけるプロゲステロンレセプター mRNA の発現と細胞増殖促進作用 (25nM) などが報告されてきた。そして BPA の母獣投与による雄仔マウスの前立腺腫大と精子産生減少 (2-20ng/g·day) が報告されたことをきっかけとして、これに対する否定的な報告がなされるなど環境中のレベルとほぼ等しい ppb レベルでの BPA の生殖機能への影響が議論されることになった。

更に最近、BPA の母獣への投与により雌仔マウスにおいてもその発育および性成熟の促進をもたらすことが報告され、トピックスとなっている。報告によると、環境中のレベルとほぼ等しい 2.4ng/g·day の BPA を妊娠 11-17 日目に母獣に投与すると、生まれた雌新生仔の発育が出生直後では差がないにも関わらず日齢 22 では有意に促進し、性成熟も早まることが示された。更にこの BPA による発育促進効果は雌新生仔の子宮内における内因性エストロゲン曝露量によって異なり、最もエストロゲン曝露量の多い 2 匹の雌マウスに挟まれた雌新生仔では促進効果が大きい一方、最もエストロゲン曝露量の少ない 2 匹の雄マウスに挟まれた雌新生仔では有意差がみられなかった。内因性エストロゲン曝露量により BPA の新生仔に及ぼす影響が異なることを示したこの報告は、胎仔ないしは胎児が特定のエストロゲン環境下では内分泌攪乱化学物質に対して高い感受性を持ちうることを示す非常に興味深いものである。

今回我々は、マウス着床前初期胚を BPA に曝露し、1nM という環境中濃度に等しい低濃度で有意な発育促進効果が認められた。更に、得られた胚盤胞を胚移植し、得られた新生仔

の発育および生殖能を検討したところ、生後3週における体重で30%以上の有意な発育の促進を認めた。これより初期胚のBPAに対する感受性は高く、胚移植により得られた新生仔の発育がBPA曝露群で促進されることより、前述した妊娠後期の曝露のみならず着床前の曝露もまた次世代の発育に影響を及ぼすことが示唆された。そして最近我々は、従来の液体クロマトグラフィーよりも簡便な、BPA特異的抗体を用いたELISA法によりヒト体液中のBPA濃度を測定することに成功した。BPAは血液中のみならず卵胞液からも検出され、卵子や初期胚もまたBPAに直接曝露されていることを示した。更にヒト妊娠中期（妊娠15-18週）の羊水からは母体血液や妊娠末期の羊水よりも有意に高い濃度のBPAが検出されたことも特筆すべきであり、胎児の感受性の高いと考えられる妊娠初期—中期にむしろ羊水中に蓄積し、母体よりも高濃度のBPAに曝露されていることを示すものである。このような胎児期特異的な被曝様式を示す内分泌攪乱物質がないかどうか、更には他の内分泌攪乱物質を含めた複合汚染の状況やその影響はどうか、今後も引き続き検討を重ねていくことが急務であると考えられた。

## E. 結論

今回の我々の研究により、人体はダイオキシン類やビスフェノールAなどの内分泌攪乱物質により汚染されていることが明らかとなった。その濃度は非常に低いとはいえ、マウス初期胚を用いた研究では胚発育や細胞分裂、更には次世代の発育などに影響を及ぼしている可能性もあるため、今後は他の内分泌攪乱物質による人体の複合汚染の現状の把握やダイオキシン類などとの相乗効果なども含めて検討を進めていくことが不可欠であると考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

広田泰、岡垣竜吾、末永昭彦、大須賀穰、藤原敏博、百枝幹雄、武谷雄二、堤 治(2000) 精液所見に影響する生活習慣および環境因子の検討. 日本受精着床学会雑誌 17: 241-244.

Hiroi H, Momoeda M, Yamauchi N, Abe Y, Yoshikawa H, Tsutsumi O, Taketani Y (2000) An earlier menopause as clinical manifestation of granulosa-cell tumor: a case report. *J Obstet Gynaecol Res* 26:9-12.

Hiroi H, Kozuma S, Hayashi N, Unno N, Fujii T, Tsutsumi O, Okai T, Taketani Y (2000) A fetus with Prader-Willi syndrome showing normal diurnal rhythm and abnormal ultradian rhythm on heart rate monitoring. *Fetal Diagn Ther* 15:304-7.

Ikeda K, Sato M, Tsutsumi O, Tsuchiya F, Tsuneizumi M, Emi M, Imoto I, Inazawa J, Muramatsu M, Inoue S (2000) Promoter analysis and chromosomal mapping of human EBAG9 gene [In Process Citation]. *Biochem Biophys Res Commun* 273:654-60.

Kamei Y, Tsutsumi O, Taketani Y, Watanabe K (1998) cDNA cloning and chromosomal localization of neural adhesion molecule NB-3 in human. *J Neurosci Res* 51:275-83.

Koga K, Osuga Y, Tsutsumi O, Momoeda M, Suenaga A, Kugu K, Fujiwara T, Takai Y, Yano T, Taketani Y (2000) Evidence for the presence of angiogenin in human follicular fluid and the upregulation of its production by human chorionic gonadotropin and hypoxia. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3352-5.

Koga K, Osuga Y, Tsutsumi O, Okagaki R, Momoeda M, Yano T, Fujiwara T, Takai Y, Kugu K, Morita Y, Taketani Y (2000) Increased concentrations of soluble tumour necrosis factor receptor (sTNFR) I and II in peritoneal fluid from women with endometriosis [In Process Citation]. *Mol Hum Reprod* 6:929-33.

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

Matsumi H, Yano T, Koji T, Ogura T, Tsutsumi O, Taketani Y, Esumi H (2000) Expression and localization of inducible nitric oxide synthase in the rat ovary: a possible involvement of nitric oxide in the follicular development. *Endocr J* in press.

Matsumi H, Yano T, Osuga Y, Kugu K, Tang X, Xu JP, Yano N, Kurashima Y, Ogura T, Tsutsumi O, Koji T, Esumi H, Taketani Y (2000) Regulation of Nitric Oxide Synthase to Promote Cytostasis in Ovarian Follicular Development. *Biol Reprod* 63:141-146.

Morita Y, Nishii O, Kido M, Tsutsumi O (2000) Parvovirus infection after laparoscopic hysterectomy using fibrin glue hemostasis. *Obstet Gynecol* 95:1026.

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 (2000) Expression and imprinting status of human PEG8/IGF2AS, a paternally expressed antisense transcript from the IGF2 locus, in Wilms' tumors. *J Biochem (Tokyo)* 127:475-83.

Osuga J, Ishibashi S, Oka T, Yagyu H, Tozawa R, Fujimoto A, Shionoiri F, Yahagi N, Kraemer FB, Tsutsumi O, Yamada N (2000) 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.

Osuga Y, Koga K, Tsutsumi O, Igarashi T, Okagaki R, Takai Y, Matsumi H, Hiroi H, Fujiwara T, Momoeda M, Yano T, Taketani Y (2000) Stem cell factor (SCF) concentrations in peritoneal fluid of women with or without endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 44:231-5.

Osuga Y, Tsutsumi O, Fujiwara T, Kugu K, Fujimoto A, Taketani Y (2001) Usefulness of Long Jaw Forceps in Laparoscopic Cornual Resection for Interstitial Pregnancies. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* in press.

Ryo E, Shiotsu H, Takai Y, Tsutsumi O, Okai T, Taketani Y, Takeuchi Y (2001) Effects



of pulsed ultrasound on development and glucose uptake of preimplantation mouse embryos. *Ultrasound in Medicine and Biology* in press.

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

Takai Y, Tsutsumi O, Harada I, Morita Y, Momoeda M, Fukushima Y, Taketani Y (2000) A case of XY pure gonadal dysgenesis with 46,XYp-/47,XXYp- karyotype whose gonadoblastoma was removed laparoscopically. *Gynecol Obstet Invest* in press.

Takai Y, Tsutsumi O, Ikezuki Y, Kamei Y, Osuga Y, Yano T, Taketani Y (2001) Preimplantation exposure to bisphenol A advances postnatal development. *Reprod Toxicol* 15:71-74.

Takeuchi T, Tsutsumi O (2000) Basal leptin concentrations in women with normal and dysfunctional ovarian conditions. *Int J Gynaecol Obstet* 69:127-133.

Tsutsumi O, Momoeda M, Takai Y, Ono M, Taketani Y (2000) 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.

Osuga Y, Koga K, Tsutsumi O, Yano T, Kugu K, Momoeda M, Okagaki R, Suenaga A, Fujiwara T, Fujimoto A, Matsumi H, Hiroi H, Taketani Y (2001) Evidence for the presence of keratinocyte growth factor (KGF) in human ovarian follicles. *Endocr J* in press.

堤 治：月経の人工移動 今日の小児治療指針

堤 治 (2000) ヒト (女性) の生殖への影響 ドクターサロン 44: 129-132.

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

堤 治 (2000) 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,

堤 治 (2000) 産婦人科における内視鏡下手術の展望 21世紀の内視鏡下手術の展望 日本内視鏡外科学会雑誌 5(1):57-60.

堤 治 (2000) 内視鏡手術の機器・器具 内視鏡手術ケアマニュアル オペネーシング 15: 330-334.

堤 治 (2000) 特集内分泌攪乱化学物質「内分泌攪乱化学物質の着床前初期胚への直接作用」 日本臨床 58:90-94.

堤 治、高井泰 (2000) 母体血清マーカー Lab-Topics. 21(1): 4.

堤 治 (2000) 特集内分泌 Up-to-Date 月経異常の診断の進め方 内科 85: 50-55.

堤 治他 (2000) ビデオ「GnRH アナログ療法の最前線」

堤 治、小島俊行 (2000) 特集「総合的な女性の健康をめざして—プライマリケアで女

性を診療する時に必要な知識-」 プライマリケアにおける褥婦の診方治療.

堤 治、森田昌敏、紫芝良昌 (2000) 座談会 内分泌攪乱物質の状況とヒトへの影響 治療学 34(5): 545-555.

堤 治、生月弓子 (2000) 内分泌攪乱物質に対する治療学的アプローチ-ダイオキシンの体外排出除去の可能性 治療学 34(5): 542-543.

堤 治 (2000) 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.

堤 治 (2000) 母子保健と子宮内膜症 母子保健 489: 7.

岡垣竜吾、丸山正統、大須賀穰、百枝幹雄、堤 治、武谷雄二 (2000) 内視鏡下手術の術中所見と術後妊娠 臨床婦人科産科 54(4): 590-595, 医学書院.

高井泰、森田豊、亀井良政、堤 治 (2000) 胚発育と成長因子. 産婦人科の世界 52:141-146.

高井泰、堤 治 (2000) 患者の性行動 (セクシャリティ) を考慮したインフォームド・コンセント. 先端医学 p.227-234.

高井泰、堤 治 (2000) 産婦人科領域における遺伝子診断. 臨床成人病 30:414-20.

高井泰、堤 治 (2000) 内分泌攪乱物質とピル. 産婦人科の実際 印刷中.

高井泰、堤 治 (2000) 内分泌攪乱物質の卵子、胚への影響. 治療学. 34:501-504.

高井泰、廣井久彦、堤 治 (2000) エストロゲン- 最近の話題- 内分泌攪乱化学物質. Hormone Frontier, 7:79-85.

高井泰、堤 治 (2000) 内分泌攪乱物質 内分泌攪乱物質の女性性機能への影響 Bio Clinica. 15, 2: 33-38.

西井 修、堤 治 (2000) 特集 症状・症候からみた産婦人科外来診療ガイド. ラパロスコピー (腹腔鏡検査) 産婦人科治療 80 増刊, 永井書店.

西井修、堤 治 (2000) 子宮内膜症の診断と腹腔鏡下手術 救急医学. 24(1): 83-86, ヘルス出版.

堤 治 (2001) 内分泌攪乱化学物質. 臨床に役立つ内分泌疾患診療マニュアル-2001 年版-医学の世界社. 31-34.

堤 治 (2001) 多嚢胞性卵巣症候群. 臨床に役立つ内分泌疾患診療マニュアル-2001 年版-医学の世界社. 179-181.

西井 修、堤 治 (2001) 細径腹腔鏡によるデイサージェリー 医学のあゆみ. 196:488-489.

竹内 亨、堤 治 (2001) 血清レプチン濃度の性差ならびに性ホルモンとの関連性についての検討 性差医学 No 7:58-63.

堤 治 (2001) 婦人科疾患に対する内視鏡下手術 medicina 38.

堤 治: 月経の人工移動 今日の小児治療指針.

堤 治 (2001) 生殖と環境ホルモン Hormone Frontier in Gynecology 8:55-60. 堤 治

- (2001) 子宮内膜症の増加と環境因子 臨床と薬物治療 20:8-11.
- 堤 治 (2001) 子宮内膜症と環境因子 日本臨床 59:230-235.
- 堤 治 (2001) 内分泌攪乱物質と生殖機能 Annual Review 2001 内分泌・代謝:47-53.
- 堤 治 (2001) 内分泌総論 内分泌攪乱化学物質 ホルモンと臨床 49:31-34.
- 堤 治 (2001) ロキタンスキー症候群 臨床婦人科産科 55:251-253.
- 堤 治 (2001) 子宮内膜症と環境因子 組織培養工学 27:80-83.
- 堤 治 (2001) 不妊治療の基礎と臨床- 卵子と精子のタイミングよい出会いをいかに演出するか 医学のあゆみ 196:469-472.
- 堤 治 (2001) これからの内鏡視下手術 婦人科領域 オペナーシング.印刷中
- 堤 治: 環境ホルモンと人類の未来 三重母性衛生学会会報.印刷中
- 堤 治: 内分泌攪乱物質と人類の未来 産婦人科の世界増刊号「生殖医療の基礎と臨床.印刷中
- 堤 治: 特集/リプロダクティブヘルスと内分泌 序文 ホルモンと臨床.印刷中
- 堤 治: 特集/リプロダクティブヘルスと内分泌 「原発性無月経の診断と治療」 ホルモンと臨床.印刷中
- 堤 治: 特集赤ちゃんの不思議「性分化はどのようにしておこるの」 周産期医学.印刷中
- 堤 治: 特集「内分泌攪乱化学物質研究の最新の動向」 内分泌攪乱化学物質の着床前初期胚への影響 生活と環境.印刷中
- 堤 治: 環境ホルモンとその問題点 目黒区医師会報 東京.印刷中
- 堤 治: XY型性腺形成不全症 新女性医学大系 性の分化とその異常.印刷中
- 堤 治: 原発性無月経の診断と治療 知っておきたい月経異常の診断と治療 真興交易東京.印刷中
- 堤 治: ホルモン補充療法と環境問題 高齢女性の健康増進のためのホルモン補充療法ガイドライン メディカルレビュー 東京.印刷中
- 堤 治: 内視鏡下手術 今日の産婦人科治療指針 武田佳彦、武谷雄二編 医学書院.印刷中
- 堤 治: 伴性遺伝 今日の産婦人科治療指針 武田佳彦、武谷雄二編 医学書院.印刷中
- 堤 治、武谷雄二: ダイオキシンと子宮内膜症 周産期医学.印刷中
- 堤 治: 性分化異常 今日の治療指針 医学書院 東京.印刷中
- 堤 治: 性腺機能低下症 今日の治療と看護 南江堂.印刷中
- 堤 治、武谷雄二: 婦人科手術におけるバイポーラーシザーズの応用 産婦人科治療.印刷中
- 竹内亨、堤 治: 中毒学-基礎・臨床・社会医学 荒木俊一編 朝倉書店.印刷中

## 2. 学会発表

- 堤 治：環境ホルモンと生殖医療 第15回更埴産婦人科医会学術講演会 2000年5月20日 長野
- 堤 治：環境ホルモン汚染と問題点 日本産科婦人科学会公開講座 2000年5月27日 金沢
- 堤 治：環境ホルモンと生殖医療 第5回環境ホルモン学会講演会 2000年6月7日 東京
- 堤 治：内分泌攪乱化学物質の問題点について 第73回日本内分泌学会 2000年6月16日 京都
- 堤 治：内分泌攪乱物質の問題点 山口県内分泌研究会 2000年6月30日 山口
- 堤 治：環境ホルモンと生殖機能 日産婦学会熊本地方部会第174回学術講演会 2000年7月1日 熊本
- 堤 治：環境ホルモンと生殖機能 茨城県内分泌研究会 2000年8月23日 水戸
- 堤 治：内分泌攪乱物質と生殖医療 第33回香川臨床内分泌研究会 2000年9月1日 高松
- 堤 治：子宮内膜症の最近の話題—病因論から最新の治療法まで— 世界産科婦人科学会議シンポジウム 2000年9月6日 ワシントンDC (米国)
- 堤 治：特別講演「環境ホルモンとウーマンズ・ヘルス」 第5回和歌山ウーマンズ・ヘルス懇話会 2000年9月30日 和歌山
- 堤 治：「子宮内膜症とダイオキシン」JEMA ミレニアム日米子宮内膜症フォーラム 2000年10月4日 東京
- 堤 治：特別講演「産婦人科における内視鏡手術の現況と将来」千葉内視鏡フォーラム 2000年10月6日 千葉
- 堤 治：特別講演「婦人科領域の腹腔鏡下手術の現況と将来」第6回四国婦人科内視鏡懇話会 2000年10月7日
- 堤 治：環境ホルモンと生殖医療 第51回南信医学会 2000年10月14日 諏訪
- 堤 治：特別講演「環境ホルモンと人類の未来」第15回三重母性衛生学会総会 2000年10月21日 津
- 堤 治：ランチョンセミナー「子宮内膜症の最近の話題」日本産科婦人科学会関東連合地方部会 2000年10月22日 大宮
- 堤 治：特別講演 内分泌攪乱物質と生殖機能 第45回日本不妊学会 2000年11月23日 神戸
- 堤 治：内分泌攪乱物質（環境ホルモン）と生殖内分泌学 第19回北陸合同内分泌・代謝懇話会 2000年11月25日 金沢
- 堤 治：最小侵襲手術の婦人科領域における応用とその教育・トレーニング 第6回日本最小侵襲整形外科研究会 2000年12月10日 東京
- 堤 治：女性性器の解剖と術野の展開 第3回日本内視鏡学会 12月14-15日 大阪
- 堤 治：環境ホルモンと生殖医療 第3回日本環境ホルモン学会 12月16日 横浜