

尿道下裂患児とその両親のステロイド代謝に関する研究

分担研究者 小柳知彦 北海道大学大学院医学研究科腎泌尿器外科学教授

研究協力者 野々村克也、柿崎秀宏、村雲雅志

三上篤（札幌市衛生研究所）

研究要旨

当科で経験した尿道下裂6症例とその両親（5家族）について、テストステロン生合成系における異常の有無を調べるため、血清中の3-ヒドロキシステロイド（DHEA, 17-Hydroxypregnenolone, Pregnenolone）、3-ケトステロイド（Androstenedione, 17-Hydroxyprogesterone, Progesterone）を測定して、その比をとることによって代謝酵素の活性を求めた。6症例の尿道下裂の程度は遠位型が2例、近位型が4例であった。遠位型の症例ではとくに合併症や妊娠中の異常を認めなかったのに対し、近位型では停留精巣の合併を1例に認めたほか、兄弟における発生例を含んでおり、この兄弟例ではいずれも妊娠中に切迫早産の既往があった。

遠位型1例と近位型3例（うち2例は兄弟）において3 β ヒドロキシステロイド脱水酵素（3 β HSD）と17-, 20-リアーゼ活性の単独または両方の低下を認めた。遠位型症例の父親には3 β HSDおよび17-, 20-リアーゼ活性の低下が、また近位型兄弟例の母親に17 α 水酸化酵素と17-, 18-リアーゼ活性の低下が認められた。まだ少ない症例の検討ではあるが、尿道下裂症例にステロイド代謝異常が高頻度で認められ、また代謝異常が家族性に見られることが示唆された。こうした知見は内分泌攪乱物質が尿道下裂の発生に関与する可能性を濃厚に示しており、今後の広汎な検討が必要である。またステロイド代謝産物の測定による疾患の胎児診断・母体への薬物投与による胎児治療などへの応用が期待される。

A. 研究目的

尿道下裂の成因に関しては不明な点が多くさまざまな説が提唱されているが、近年では胎児期の内分泌環境の異常がクローズアップされており、内分泌攪乱物質との関連からも深い関心が持たれている。

われわれは昨年度の研究において、尿道下裂症例では思春期前の段階から刺激に対

するテストステロン分泌の反応性が低下しており、精巣機能障害とくにライディッヒ細胞の機能障害が存在する可能性を指摘したが、その詳細をより明らかにするためにはテストステロン生合成に関与するステロイド代謝酵素の異常を検索する必要があった¹⁾。そこで本年度の研究においてはステロイド代謝経路において重要な中間代謝産

物について測定系を確立し、実際に尿道下裂患児およびその両親についてテストステロン生合成系に問題がないかどうか検索を行った。

B. 研究方法

当科にて2000年7月から2001年2月までに尿道下裂形成術を受けた症例のうち、協力の得られた5組の家族を対象として以下の項目を検討した。

まず臨床的背景として、

- 1) 尿道下裂の程度
- 2) 尿路性器合併異常
- 3) 妊娠・分娩の異常
- 4) 妊娠中の薬物投与
- 5) 家族歴

を調べた。

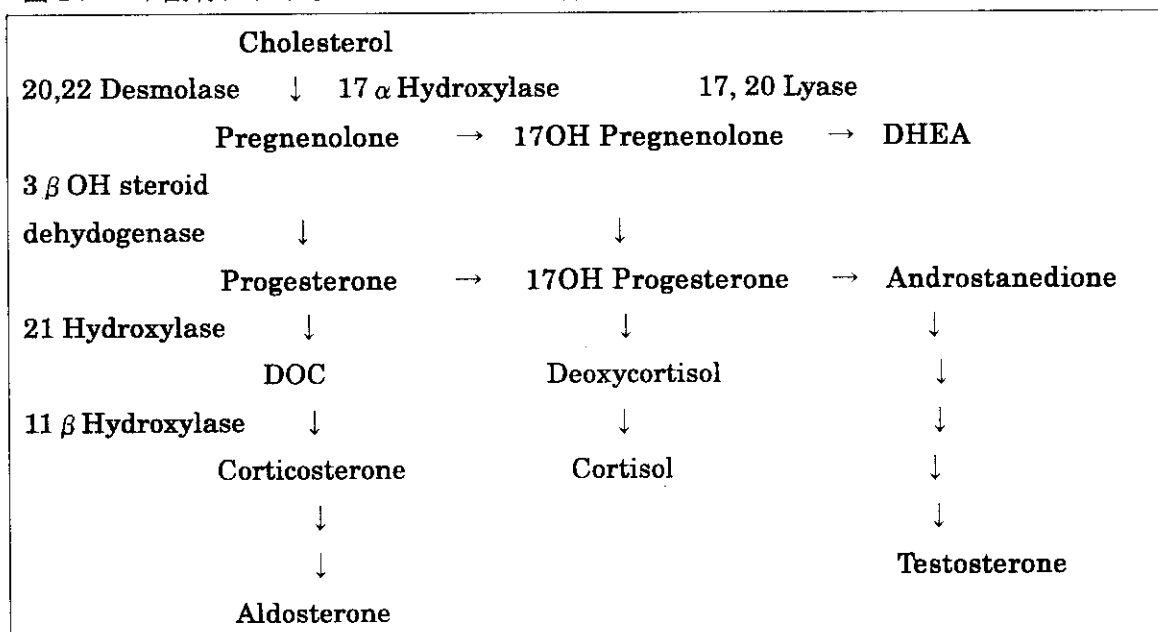
血清中のステロイド代謝産物を測定するために、患児から2ml、両親から3mlの静脈血をヘパリン添加採血管に採取して、すみやかに血清を分離し-20℃で冷凍保存し

た。測定の対象としたのはヒト副腎におけるテストステロン生合成系(図1)の中間代謝産物である、

- 1) Pregnenolone (Prog.)
- 2) 17-OH Pregnenolone (17-OH Prog.)
- 3) Progesterone (Prog.)
- 4) 17-OH Progesterone (17-OH Prog.)
- 5) DHEA
- 6) Androstenedione (Andro.)

の6種類である。これらの中間産物の中で、前駆物質と生成物質との比を指標として、テストステロン生合成において重要な3つの酵素～3βヒドロキシステロイド脱水酵素(以下3βHSD)、17α水酸化酵素(以下17αOHase)、17-, 20-リアーゼ～の活性を推定した。中間代謝産物の分析は液体クロマトグラフィー法で行い、高感度セミマイクロカラム対応システム(資生堂ナノスペースSI-1)を用いた(使用カラムCAPCELL PAK C18UG120S3、35℃、流速100μl/minで波長254nmにて検出)。

図1. ヒト副腎におけるテストステロン生合成系



(倫理面への配慮)

本研究における検討項目のうち臨床的背景については、尿道下裂に対する手術的治療の方針決定のために必要な臨床情報であることを良く説明し、両親の了解を得てから、詳細な問診と理学的所見の検討、必要に応じて超音波検査や尿路面像診断を行った。またステロイド代謝酵素の測定に関しては、治療に関して必須な検査ではないこと、尿道下裂における代謝異常を検討するための医学的研究目的であること、研究への参加は保護者である両親の自由意志によるものであること、もし研究に参加しない場合でも以後の診療においていかなる不利益を被ることはないことを主治医から十分に説明して、インフォームドコンセントを受けた上で採血・検査を行った。

C. 研究結果

(1) 臨床的背景

本年度中に協力を得られたのは5家族であり、いわゆる遠位型(軽度)が2例、近位型(重度)が4例(うち2例は兄弟例)であった。遠位型の2例については他の合併異常はなく、妊娠・分娩経過も正常で、妊娠中の薬剤使用歴はなく、家族歴にも特記すべきことはなかった。これに対し、近位型では1例に両側停留精巣を合併していた。また兄弟例では妊娠12週および28週において切迫早産の既往があった。

(2) ステロイド代謝産物測定結果

測定結果を図2に示す。*は測定上の精度にやや難がある例であり、以後の解析には用いなかった。

図2. ステロイド中間代謝産物. 単位 ng/ml

症例	Preg	Prog	17-OH Preg	17-OH Prog	DHEA	Andro	No.
D.I.	18.77	2.44	*142.19	0.88	*0	*0	1
(母)	1.56	0.38	4.33	*0	1.25	0.63	2
(父)	6.61	0.83	2.42	0.3	1.63	0.48	3
S.M.	18.55	0.51	10.42	1.51	0.41	0.15	4
K.M.	9.79	0.47	2.51	*0	0.93	0.17	5
(母)	15.82	43.47	15.04	3.85	0.82	1.19	6
(父)	*0	0.32	5.79	0.73	1.76	0.87	7
M.T	*0	0.4	4.69	1.56	0.32	*0	8
(父)	4.06	0.62	4.14	0.77	2.14	0.68	9
K.T.	18.61	0.68	14.57	2.04	*0	0.92	10
(母)	7.25	1.09	2.54	0.95	3.17	0.98	11
(父)	10.25	*0	3.25	0.43	3.82	0.98	12
R.M.	*0	1.09	23.94	1.33	0.18	*0	13
(母)	7.16	7.47	5.72	1.29	0.96	0.4	14
(父)	*0	0.55	17.63	1.39	0.34	0.75	15

3 β HSD活性の指標として Preg./Prog., 17-OH Preg./17-OH Prog. DHEA/Andro. の比を求めた(図3,4,5)。17 α OHase活性

の指標には Preg./17-OH Prog., Prog./17-OH Prog. の比を(図6,7)、また 17-, 20-リアーゼ活性には 17-OH

Preg./DHEA, 17-OH Prog. /Andro. の比

(図 8,9) を求めた。

図 3~5. 3βヒドロキシステロイド脱水酵素活性の指標

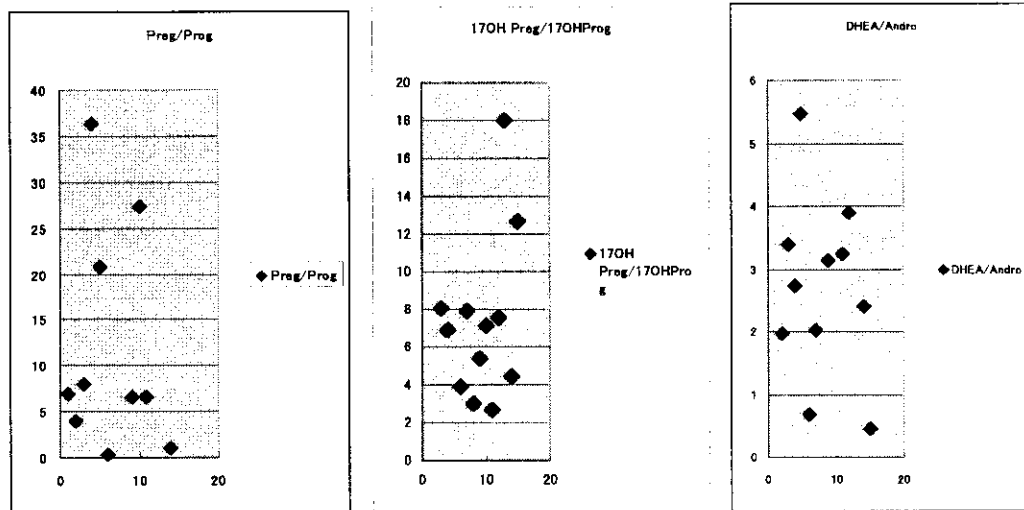
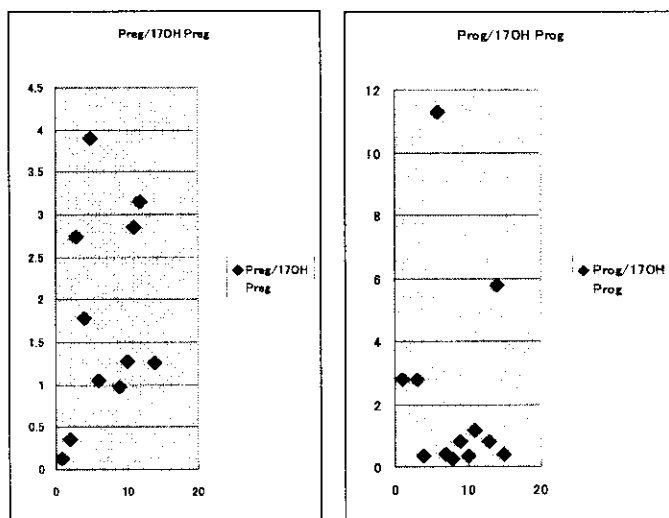


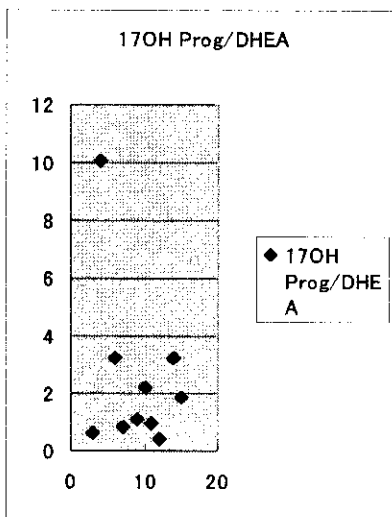
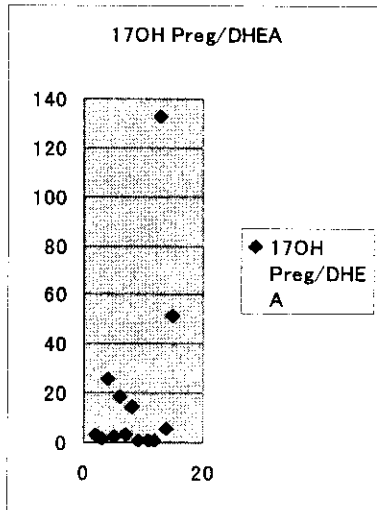
図 6,7. 17α水酸化酵素活性の指標



酵素活性の異常が疑われた尿道下裂症例は6例中4例（遠位型1例、近位型3例うち2例は兄弟）である。近位型の兄弟例では3βHSD活性の低下が認められ、弟においては17-, 20-リアーゼ活性も低下してい

た。さらに母親の17αOHase、17-, 20-リアーゼ活性も低下していた。また遠位型例では患児・父親ともに3βHSDと17-, 20-リアーゼ活性の低下が認められた。

図 8.9. 17-, 20-リアーゼ活性の指標



D. 考察

尿道下裂には陰囊内容の異常が高頻度に合併することが知られており、当科で経験した症例においても停留精巣をはじめ、無精巣症や精巣形成不全など明らかなテストステロン分泌障害例が含まれていた。また妊娠中のプロゲステロン投与と尿道下裂との関係は有名であるが、プロゲステロンはステロイド代謝経路において重要な 3β ヒドロキシステロイド脱水素酵素活性を低下

させることが知られている。こうしたことから、尿道下裂の成因として胎児の精巣機能やステロイド代謝の異常が深く関与することが指摘されてきた。とくに重度の尿道下裂においては、精巣が正常位置に下降している例でも5%程度の症例でテストステロン生合成異常を伴う場合があることが報告されており^{3, 4)}、ステロイド代謝における何らかの異常が想定されていた。

いっぽう先天性のステロイド代謝異常として臨床的に顕性な先天性副腎過形成では、男児における外性器異常の原因にはなりにくいと言われてきた²⁾、ステロイド中間産物の測定系が不安定であったことや、測定のためには比較的大量の血液を必要としたことなどから、尿道下裂とステロイド代謝異常との関係については十分な検討がなされないままとなっていた。

この状況に一石を投じたのは Aaronson⁵⁾であり、検討した30例の尿道下裂のうち実に15例(50%)において、 3β ヒドロキシステロイド脱水素酵素・17水酸化酵素・17, 20リアーゼの3種類の酵素が単独または複合して異常を示したことを報告し、尿道下裂の成因としてのステロイド代謝異常の重要性を具体的に指摘した。

今回の検討では、まだ少数例のみの解析ではあるものの、尿道下裂の患児にステロイド代謝異常が想像以上に多いことがうかがわれ、尿道下裂の成因としての胎児期のテストステロン生合成異常の意義を大きくクローズアップするものである。われわれの昨年度の検討では、思春期前の尿道下裂症例における精巣機能異常の存在を示したものの、それが胎児期から存在していたものなのか、また尿道下裂の発生に直接関与

するものなのかを解き明かすことはできなかつた。しかし軽度の代謝異常のうち多くものは成長とともに代償されると考えられており、幼児期まで残存する異常は胎児期にも存在したと考えるのが妥当であろう。

先に述べたプロゲステロンのほか、最近では母親が妊娠中に植物性エストロゲンを多く含む食事を摂取すると尿道下裂が発生しやすいとする報告⁹⁾があり注目されている。ただし植物性エストロゲンを多量に摂取する日本での発生頻度が欧米よりも高いわけではない。今後も多角的な疫学調査によって、どのような外因性物質が影響してくるのかを解明していく必要がある。

今回の検討で代謝異常が家族性に認められたのは大変興味深い。従来から尿道下裂の家族発生については日本で6%、欧米で21%とする報告^{6,7)}がある。また尿道下裂患児の次子が尿道下裂である確率は12~17%と報告^{7,8)}されており、尿道下裂症例のうちには明確な遺伝性のあるものが含まれることが想定されてきた。しかしその詳細に関する知見はほとんど報告されていない。今後詳細な解析とくに遺伝子多型の解析を進めることで、尿道下裂の病因についての理解が深まり、また早期診断・早期治療への展望が拓けてくるであろう。

E. 結論

当科で経験した尿道下裂6例とその両親について(計5家族)血清中のステロイド中間代謝産物を測定した。下裂の程度は遠位型(軽症)2例、近位型(重症)が4例であった。遠位型の2例については合併異常などを認めなかつた。近位型では1例停留精巣を合併していたほか、兄弟発生例を

認めた。兄弟例においては妊娠中に切迫流産の既往があつた。

6例中4例にステロイド代謝酵素活性の異常を認め、3例(2家系)では家族性に異常を認めた。

尿道下裂症例のステロイド代謝を詳細に調査することで、発症のメカニズムの解明のみならず、ステロイド代謝酵素活性の測定による出生前診断や、妊娠中の薬剤投与による胎児治療の可能性につながるものが期待される。

〈今後の課題〉

今後より多くの症例についてステロイド代謝異常の有無を確認していく必要がある。尿道下裂発生との因果関係については基礎的な実験が必要であり、内分泌かく乱物質を妊娠ラットに投与することでラット胎児のステロイド代謝異常が生じるかどうかを調べ、尿道下裂の原因となりうるかどうかを追求していく予定である。

F. 研究発表

論文発表

Koyanagi T, Nonomura K, Kakizaki H, Murakumo M: One-stage urethroplasty with paramental foreskin flap (OUPF)-Quest for single-stage repair applicable to all types of hypospadias. *Asian Medical Journal* 43: 517-531, 2000

H. 参考文献

- 1) 小柳知彦、野々村克也、柿崎秀宏、村雲雅志: 先天性外陰奇形(尿道下裂)の内分泌環境に関する症例対照研究. 平成11年度厚生科学研究費補助金研究報告

- 書. 内分泌かく乱物質の生殖機能と次世代への影響、とくに生殖泌尿器系・先天異常の成因に関する疫学的研究 pp35-42.
- 2) Grumbach MM, Conte FA: Disorders of sexual differentiation. In: Williams Textbook of Endocrinology, 8th ed. Edited by J.D. Wilson and D.W.Foster. Philadelphia: W.B.Saunders Co., chapt. 14, pp. 916-921, 1992
 - 3) Savage MO, Chaussain JL, Evain D et al.: Endocrine studies in male pseudohermaphroditism in childhood and adolescence. Clin Endocr, 8: 219, 1978
 - 4) Campo S, Monteagudo C, Nicolau G et al.: Testicular function in prepubertal male pseudohermaphroditism. Clin Endocr 14:11, 1981
 - 5) Aaronson IA, Cakmak MA, Key LL: Defects of the testosterone biosynthetic pathway in boys with hypospadias. J Urol 157, 1884-1888, 1997
 - 6) 榑原尚行、野々村克也、松野正、他：尿道下裂の臨床、内分泌学的検討. 日泌尿会誌 76: 716-722, 1985
 - 7) Bauer SB, Retik AB, Colodny AH: Genetic aspect of hypospadias. Urol Clin North Am 8: 559-564, 1981
 - 8) Stoll C, Alembik Y, Roth MP et al.: Genetic and environmental factors in hypospadias. J Med Genet 27: 559-563, 1990
 - 9) North K, Golding J, The Alspac Study Team: A maternal vegetarian diet in pregnancy is associated with hypospadias. BJU Int 85: 107-113, 2000

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

不妊・不育症患者における異物代謝酵素遺伝子多型解析ならびに母体血・羊水中のビスフェノール A 濃度の年次推移

主任研究者

岸 玲子（北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野教授）

分担研究者

藤本征一郎（北海道大学大学院医学研究科生殖発達医学講座婦人科学分野教授）

研究要旨

北海道大学附属病院産婦人科を受診した不育症および不妊症の症例対照研究により、GSTM1 遺伝子完全欠損型は、不育症・不妊症ともに危険因子となることが示唆された。また、高齢妊娠の適応で妊娠 16 週時に出生前羊水染色体検査を受け、胎児染色体核型が正常であった女性の 10 年間にわたり妊娠 16 週時の BPA 濃度を解析した結果、母体血では減少傾向が認められた。羊水の BPA 濃度は、母体血中濃度に比較して低レベルであった。したがって、母体血から羊水への BPA の移行ないし蓄積は軽微であると考えられた。しかしながら、症例によっては羊水への BPA の移行および蓄積が認められ、BPA の胎児に対する影響は無視できないと考えられた。

研究協力者

山田 秀人（北海道大学大学院医学研究科生殖発達医学講座婦人科学分野講師）

古田伊都子（北海道大学大学院医学研究科生殖発達医学講座周産期医学分野助手）

平山 恵美（北海道大学大学院医学研究科生殖発達医学講座婦人科学分野）

三國 雅人（北海道大学大学院医学研究科生殖発達医学講座婦人科学分野助手）

奥山 和彦（北海道大学大学院医学研究科生殖発達医学講座周産期医学分野助教授）

佐田 文宏（北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野講師）

貢 英彦（北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野）

精査を実施しても約半数はその原因が不明である。原因不明の習慣流産においては、近年、免疫学的異常や凝固能異常がその発症機構に関与していることを示唆する研究報告が散見できるが、根本的な原因解明は未だなされていない。内分泌攪乱物質や遺伝的素因が不育症の発症機構に関与している可能性も存在する。

子宮内膜症は生殖年齢層の女性の妊孕能を障害し、不妊症や少子化にも関与する。有病率も高く、本疾患の成因を解明することは社会的に見ても意義は大きいといえる。近年増加傾向にあるため、現代のライフスタイルや生活環境と関連している可能性が考えられる。近年、ダイオキシンとの関連が報告されたことから、内分泌攪乱物質と子宮内膜症との関連を解明することの意義は大きく、発症予防

研究目的

難治性不育症（習慣流産）においては、

につながる可能性がある。

難治性不妊症に関して、現在わが国では出生数の低下が進行中であり、出産人口の一層の減少を来し、高齢化社会における諸問題をさらに深刻化させるところが危惧される。男性乏精子症、女性排卵障害ならびに生殖器奇形は、内分泌環境および母体内での影響（胎内環境）と関連するため、その発症における内分泌攪乱物質の関与が予想される。生殖年齢にある女性の約1割を占めるといわれる不妊症の予防は、出生数の増加の他、医療経済的にも莫大なメリットがあり、本疾患の解明・予防は社会的に極めて重要と推察される。

先天異常に関しては、多遺伝子要因ならびに多くの環境要因が複雑に交絡して発症するものと考えられているが、その発症機構における内分泌攪乱物質の関与に関する研究実績は未だ十分とはいえない。

したがって、難治性不育症、子宮内膜症、難治性不妊症ならびに先天異常例に対して内分泌攪乱物質の関与の有無を調べることは斬新な手法であり、有用な解析結果が得られる可能性が極めて高いと考えられる。

研究方法

1) 従来より保存していた子宮内膜症・不妊・不育症の患者血液およびDNAを用いて、GSTM1, NQO1, CYP1A1, CYP17, の遺伝子多型をPCR-RFLP法を用いて解析を行う。

2) 母体血と羊水中のビスフェノールA (BPA)を測定し、両者の濃度相関ならびに年次変化を調べることを目的とした。1989年から1998年の期間に北海道大学

医学部附属病院において、高齢妊娠(35歳以上)の適応で妊娠16週時に出生前羊水染色体検査を受け、胎児染色体核型が正常であった女性のうち、各年20人(平均年齢36歳)合計200人を無作為に選択した。空腹時に採取され凍結保存されていた出生前診断時の母体血清および羊水(200組)中のBPAをエコ・アッセイビスフェノールA ELISAキット(大塚製薬)を用いて測定した。

また、同一期間において胎児染色体核型が異常(主に21, 18トリソミー)であった女性71人の母体血と羊水中のBPAを測定した。

3) 分娩時母体血、臍帯血および羊水中のBPAを上記方法で測定し、各々の濃度相関を調べることを目的とした。2001年から現在までに北海道大学医学部附属病院において妊娠36週から40週までに分娩した女性11人を無作為に選択し対象とした。

4) 前方視的に正常児ならびに胎児奇形症例の臍帯血、母体血、羊水を検体採取、保存を行い、PCB, ダイオキシンおよびBPAなどの内分泌攪乱物質を測定し、その濃度の比較検討を行う。

倫理面への配慮

出生前羊水染色体検査時には、羊水穿刺に対する同意文書を作成しすべて同意が得られている。羊水穿刺時の母体血ならびに羊水中のホルモン測定については、口頭で同意が得られている。分娩時母体血、臍帯血および羊水の採取については、文書にて採取と使用について同意書を取得している。

結果と考察

1) 現在までに解析の終わった予備的な結果として、GSTM1 遺伝子の完全欠損型は、不育症では 65% (56/86), 不妊症では 51% (40/86) の頻度でみられたのに対し、対照群では 22% (11/51) に過ぎず、不育症においては、オッズ比 5.1 (95%信頼区間 2.3-11.1), 不妊症では、オッズ比 3.7 (95%信頼区間 1.7-8.2) となり、GSTM1 遺伝子完全欠損型は、不育症、不妊症の危険因子になることが示唆された。NQO1 遺伝子の HinfI 多型 (P187S) は、不育症では C/C 型 44% (37/84), C/T 型 43% (36/84), T/T 型 13% (11/84) みられ、不妊症では C/C 型 52% (38/73), C/T 型 40% (29/73), T/T 型 8% (6/73) みられた。一方、対照群では C/C 型 59% (32/54), C/T 型 32% (17/54), T/T 型 9% (5/54) みられた。NQO1 遺伝子 HinfI 多型は、いずれの疾病にも有意な影響を与えなかった。CYP1A1 遺伝子 MspI 多型 (3' 側) に関しては、不育症例では m1/m1 型 48% (40/84), m1/m2 型 42% (35/84), m2/m2 型 11% (9/84) みられ、不妊症では m1/m1 型 68% (32/47), m1/m2 型 21% (10/47), m2/m2 型 11% (5/47) みられた。不妊症では m1/m1 型のホモ接合の割合が多く、ヘテロ接合の割合が少ない傾向がみられた。CYP17 遺伝子 MspA1I 多型 (5' 側) に関しては、不育症例では A1/A1 型 21% (18/86), A1/A2 型 52% (45/86), A2/A2 型 27% (23/86) みられ、不妊症例では A1/A1 型 18% (4/22), A1/A2 型 55% (12/22), A2/A2 型 27% (6/22) みられた。

今後、解析を継続し、さらに CYP1A2, CYP1B1, GSTT1 遺伝子など内分泌かく乱物質の代謝に関与する酵素遺伝子の多型

を解析する予定である。

2) 母体血の BPA 濃度 ($M \pm SD$ ng/ml) は、6.18 \pm 2.43 (1989 年), 2.66 \pm 1.22 (90 年), 5.16 \pm 3.17 (91 年), 3.28 \pm 1.82 (92 年), 3.67 \pm 3.46 (93 年), 3.73 \pm 3.34 (94 年), 2.84 \pm 2.83 (95 年), 1.88 \pm 0.81 (96 年), 1.50 \pm 0.50 (97 年) および 1.05 \pm 0.49 (98 年) を示し、近年、減少傾向が認められた。一方、羊水の BPA 濃度は、各々 0.25 \pm 0.59, 0.22 \pm 0.23, 0.27 \pm 0.21, 0.29 \pm 0.34, 0.68 \pm 0.14, 0.63 \pm 0.20, 1.13 \pm 1.26, 0.53 \pm 1.21, 0.46 \pm 1.03 および 0.41 \pm 0.63 ng/ml であり、母体血中濃度に比較して低いレベルであった。妊娠 16 週では母体血から羊水への BPA の移行ないし蓄積は軽微であると考えられた。しかしながら、羊水 BPA 濃度が 2 ng/ml 以上を示した 8 例 (2.80 5.62 ng/ml) のうち 7 例では、羊水 BPA 濃度が母体血濃度を超えていたことから、症例によっては羊水への BPA の移行および蓄積が認められ、したがって BPA の胎児に対する影響は無視できないと考えられた。

胎児染色体核型が異常であった女性 71 人の母体血と羊水中の BPA は、現在、測定結果を解析中であり、早々に何らかの結論を出す予定である。

3) 分娩時母体血、臍帯血および羊水の BPA 濃度 ($M \pm SD$ ng/ml) はそれぞれ、3.58 \pm 1.37, 5.63 \pm 2.91, 4.40 \pm 2.36 であった。有意差はなかったが、臍帯血や羊水の BPA 濃度は母体血より高値であった。

4) に関しては、現時点で胎児奇形 7 症例の臍帯血、母体血、羊水の検体保存が

完了しているが、内分泌攪乱物質の測定は未だなされていない。対照例を含めて十分な検体数が確保できた時点で測定を行う予定である。

結論

GSTM1 遺伝子完全欠損型は、不育症・不妊症ともに危険因子となることが示唆された。また、10 年間にわたり妊娠 16 週時の BPA 濃度を解析した結果、母体血では減少傾向が認められた。羊水の BPA 濃度は、母体血中濃度に比較して低レベルであった。したがって、母体血から羊水への BPA の移行ないし蓄積は軽微であると考えられた。しかしながら、症例によっては羊水への BPA の移行および蓄積が認められ、BPA の胎児に対する影響は無視できないと考えられた。今後、胎児染色体異常、胎児奇形例での BPA 濃度を解析することによって、BPA の胎児に対する影響を明らかにしていきたい。また、PCB やダイオキシンなど他の内分泌攪乱物質の関与についても、十分な例数と検体数が集積できた時点で測定を行う予定である。

研究発表

1. 論文発表

Kishida T, Hoshi N, Hattori R, Negishi H, Yamada H, Okuyama K, Hanatani K, Takagi T, Sagawa T, Fujimoto S. The efficacy of maternal serum screening in the prenatal detection of fetal chromosome abnormalities in Japanese women. *Fetal Diagn Ther* 15, 112-117, 2000.

Yamada H, Hoshi N, Kato EH, Ebina Y, Kishida T, Sagawa T, Matsuno K,

Fujimoto, S. Novel mutation (E113X) of antithrombin III gene (AT3) in a woman with gestational recurrent thrombosis. *Am J Med Genet* 91:348-350, 2000.

Kobashi G, Yamada H, Asano T, Nagano S, Hata A, Kishi R, Fujimoto S, Kondo K. Absence of association between a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and preeclampsia in Japanese women. *Am J Med Genet* 93:122-125, 2000.

Yamamoto R, Azuma M, Wakui Y, Kishida T, Yamada H, Okuyama K, Sagawa T, Shimizu K, Satomura S, Fujimoto S. Alpha-fetoprotein microheterogeneity: a potential biochemical marker for Down's syndrome. *Clin Chim Acta* 304:137-141, 2001.

Yamada H, Kato EH, Kobashi G, Ebina Y, Shimada S, Morikawa M, Yamada T, Sakuragi S, Fujimoto S. Recurrent pregnancy loss: etiology of thrombophilia. *Semin Thromb Hemost*, 2001 (in press).

Kobashi G, Hata A, Shido K, Yamada H, Kato EH, Kanamori M, Kishi R, Fujimoto S, Kondo K. Multivariate analysis of genetic and acquired factors: T235 variant of angiotensinogen gene as a potent independent risk factor for preeclampsia. *Semin Thromb Hemost*, 2001 (in press).

Yamada H, Kato EH, Kobashi G, Ebina Y, Shimada S, Sakuragi S, Fujimoto S. High NK cell activity in early pregnancy

correlates with subsequent abortion with normal chromosomes in women with recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol*, 2001 (in press).

Tsutsumi A, Atsumi T, Yamada H, Kato EH, Ichikawa K, Fujimoto S, Koike T. Anti-phosphatidylserine/prothombin antibodies are not frequently found in patients with unexplained recurrent miscarriages. *Am J Reprod Immunol*, 2001 (in press).

山田秀人, 平山恵美, 森川 守. ガンマグロブリン大量療法. 不育症診療の新展開. *産科と婦人科* 68 (6), 2001 (印刷中).

2. 学会発表

Yamada, H., Kato, E.H., Fujimoto, S. Massive immunoglobulin treatment in women with four or more recurrent spontaneous primary abortions of unexplained etiology. 6th International Symposium Japanese-German Society of Obstetrics and Gynecology, Erlangen, June, 2000.

Sata F, Yamada H, Wada S, Kobashi G, Tozaki S, Tanabe H, Hirayama EK, Fujimoto S, Kishi R. Glutathione S-transferase M1 polymorphism and susceptibility to female infertility and recurrent spontaneous abortion. 3rd Asian-Pacific Congress of Epidemiology, Kita-kyushu, September, 2001.

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

生殖毒性の早期影響マーカーとしての神経内分泌動態と
次世代影響に関する研究

主任研究者 岸 玲子（北海道大学医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野教授）

研究要旨

内分泌かく乱作用の疑いのある有機溶剤スチレンモノマーは産業的にも種々の用途に広範囲に使用され、日常生活でも食品トレイ、ポリスチレン製食器など多量に使用されている。取り扱い作業者の数も多く、疫学調査では女性労働者で不妊、低体重児出産などの報告もある。このことから、スチレンの健康影響として内分泌機能への影響もあることが示唆される。スチレンモノマー曝露による血中プロラクチンレベルの増加に関する報告はいくつかあるが、何ら相関はないという報告もあり、一定の結果は得られていない。そこで我々は、二種類の方法でスチレンモノマーをラットへ曝露し、プロラクチンをはじめ各種ホルモンへの影響を検討した。また今まで毒性試験などでも扱われにくい、神経行動学的評価にもつながるような次世代影響を引き起こすメカニズムについても考慮し、基礎的なスチレン代謝酵素の妊娠による変化、雌雄による差、週齢差があるかを検証する実験も行った。スチレン曝露 *in vivo* 実験により、ラットのプロラクチンなどが変化し、内分泌かく乱作用のマーカーとして神経内分泌系の測定が有効であることが示唆された。また、スチレンモノマー代謝酵素活性は、成熟ラットでは雌雄による性差がみられ、CYP2C11/6 は成熟雄で活性が高かった。一方、妊娠中はスチレンモノマーの薬物動態が非妊娠時とは異なり、酵素活性が減少していた。

研究協力者

佐田 文宏（北海道大学医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野講師）
片倉 洋子（北海道大学医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野）
梅村 朋弘（北海道大学医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野）
倉橋 典絵（北海道大学医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野）
那須 民江（信州大学医学部公衆衛生学講座講師）

A 研究目的

近年、内分泌かく乱物質の健康影響が重要視されているため、内分泌かく乱物質を含めた環境化学物質曝露による神経内分泌物質の動態と、生殖毒性の発現を明らかにすることを目的とした。

スチレンモノマーの産業分野での用途の広さ、また日常的にも食品用容器としての使用量の多さにともない、スチレンの取り扱い作業者の数も多い。スチレンは変異原性や催奇形性の疑いもあり、ヒトの疫学でも月経障害などへの影響につ

いて検討されている。実験動物を用いて、内分泌かく乱作用を有しているかどうかを血清中のホルモンを測定し、発生の初期から成長後までそれぞれの時期に対応した鋭敏な次世代影響の検出方法の開発を検討する。今までの毒性試験などでは扱われにくい、神経行動学的評価にもつながるような次世代影響を引き起こすメカニズムについても考慮し、生殖毒性の有無をみる上でも必要と思われる雌雄による代謝の差、妊娠中の変化を知るために体内での代謝酵素に関しても検討を行う。スチレンなどの有機溶剤はおもに肝ミクロソーム画分に存在する薬物代謝酵素(チトクローム P450)によって代謝されるが、このチトクローム P450 には種々の isozyme が存在し、毒性発現にとって重要である。成熟ラットと同じよう活性が低週齢でも認められ性差がみられるのか、また、妊娠中におけるスチレンの代謝酵素活性が非妊娠時と異なっているかについて in vitro で検討を行う。

B 研究方法

対象動物:動物は Wistar 系雄性ラット、雌性ラット(日本クレア(株)・東京)を用いた。12 時間昼夜逆転サイクルで 1 週間以上飼育を行い、餌(MF:オリエンタル・イースト)と水は自由摂取とした。

1) 内分泌動態の変化

吸入曝露処置群に対しては、動物は 8 週齢の雌系ラットを各群 8 匹ずつ用いた。スチール製のチャンバーを用い、100ppm スチレンモノマーを 9:00~17:00 の 8 時間/日で 2 週間曝露した。餌は曝露中も自由摂取とした。2 週間の曝露後、直ちに採血し、血漿成分を分離して、血漿中の

プロラクチン(PRL)、黄体形成ホルモン(LH)、成長ホルモン(GH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)レベルを、酵素結合免疫測定法(ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay)で測定した。

皮下投与群は 8 週齢雌雄ラットを用い、2 週間の皮下連続投与(10g/kg)後、直ちに採血をし、吸入曝露群と同じように、PRL、LH、GH、TSH について ELISA で測定した。

2) スチレン代謝における性差、週齢差、妊娠による代謝酵素活性の変化

週齢差は新生仔として(0日、誕生後 12 時間以内)、離乳直後(誕生後 21 日目)、成熟ラットは 18 週目を使用した。妊娠ラットは、プラグ確認日を妊娠 0 日とし、各妊娠時期として妊娠中期は妊娠 10 日目、妊娠後期は妊娠 21 日目とした。各週齢と各妊娠日にそれぞれ雌雄共にと殺を行い、肝と肺を切除し液体窒素中で凍結し、ミクロソームの調整に用いるまで -80°C で保存、各群 5 匹、または 7 匹を試料とした。肝臓は新生仔ラット以外は 1 固体ごとに肝重量の 3 倍の 1.15%KCl 溶液中でホモジナイズし、10,000g \times 10 分で冷却遠心を行い、沈査を 105,000g \times 60 分で遠心した。調整したミクロソーム画分は -85°C で酵素アッセイまで凍結保存した。ミクロソーム蛋白は Lowry et al. (1951)の方法で測定した。チトクローム P450 量の測定は Omura & Sato (1964)の方法で行った。

酵素活性アッセイ:肝のスチレン代謝酵素活性はミクロソーム画分にスチレンを加えて、代謝物スチレングリコールの生成量の測定を行った。スチレン基質は 0.085mM (low-Km 酵素用 P450IIE1)、

185mM (high-Km 酵素用 P450IIC11/6) 濃度を加えた。薬物代謝酵素活性の測定はバイアル平衡法 (Sato & Nakajima, 1979) で行った。

モノクロナール抗体反応：性、年齢、妊娠期間によるスチレン代謝変化と薬物代謝酵素 P450 との関係はモノクロナール抗体を使用して行った。今回使用したは anti-CYP2C11/6 MAb(clone 1-68-11)、anti-CYP2E1 MAb (clone 1-91-3)である。

統計解析は ANOVA を行った。グループ間に有意差がみられたときは t-検定または paired T 検定も行った。

(札幌医大動物実験倫理委員会、北海道大学倫理委員会の指針に従って実験を行った)

C 研究結果

1) 内分泌動態の変化について

吸入曝露群では、スチレンモノマー曝露群では雌のみ PRL レベル、LH レベルともに増加を示したが、TSH、GH レベルでは差はみられなかった。

皮下投与群 (雄) では、スチレンモノマー曝露で LH レベルが増加し、TSH が減少した。一方、皮下投与群 (雌) では、LH レベルと GH レベルが増加した。雌雄ともに PRL での変化はみられなかった。

2) スチレン代謝における性差、週齢差、妊娠による代謝酵素活性の変化

①マイクロソーム蛋白量と P450 量の性差、週齢差について表 1 に示した。3 週齢 (21 日目) ではマイクロソーム蛋白量は雄で雌に比較して多かった。チトクローム P450 量に差はみられなかった。しかし成熟ラット (18 週齢) ではマイクロソーム蛋白量に雌雄間で差がなく、チトクロ-

ム P450 量が雄で多かった。18 週齢の成熟ラットでは明確にチトクローム P450 量に性差が現れていた。

週齢による差について、雄では 3 週齢 (21 日目) に比べ 18 週齢 (成熟ラット) でマイクロソーム蛋白量、チトクローム P450 量が増加していた。新生仔では検出できなかった。雌ではマイクロソーム蛋白量は成熟ラット (18 週齢) と若齢ラット (新生仔、3 週齢) の間に差があるが、チトクローム P450 量は 21 日目で成熟ラットと同じレベルであった。しかし、3 週齢のほうが新生仔ラットより多かった。

表 2 に妊娠に伴う変化を示した。マイクロソーム蛋白量については妊娠各期で大きな変化はみられなかったが、チトクローム P450 量は妊娠後期 (妊娠 21 日目) で妊娠前期、妊娠中期 (妊娠 10 日目) と比べ減少していた。

②スチレンの P450 代謝酵素活性に関しては、スチレングリコール生成量の測定を行った。18 週齢の成熟ラットで性差がみられ、雄のほうが高い活性があり、成熟ラットでは 3 週齢ラットに比べ、倍近い活性がみられた。雌では週齢による差はみられなかった。妊娠後期になると非妊娠時より低い活性であった。妊娠時期による差は妊娠週齢に伴って漸減する傾向がみられた。

③モノクロナール抗体によるスチレン代謝の抑制に関しては、モノクロナール抗体によるスチレングリコール生成抑制の割合を求めた。抗 CYP2C11/6 モノクロナール抗体で処理をした場合、CYP2C11/6 は、特に雄で強い影響を受け、成熟ラット (18 週齢) で未熟ラットに比べ、有意に高い活性を示した。また、雌では妊娠後期 (妊娠 21 日目) で有意に減少してい

た。CYP2E1 は3週齢では雌雄とも同程度発現しており、雄3週齢で60%、雌3週齢で66%の抑制がみられた。その後雄では減少しているが雌では減少程度は小さく、妊娠後期で発現量は減少した。

D 考察

1) 内分泌動態の変化について

Bergamaschi (1996) らの疫学調査の報告によると、スチレンモノマーを曝露された作業員では、プロラクチンレベルが有意に増加していた。Mutti (1998) からも同様の報告をしている。我々の動物実験の結果では、予備的検討ではあるが、実際に 100ppm 2週間曝露でプロラクチンレベルが増加し、過去の疫学的報告を裏付ける結果となった。また、全てのスチレン曝露群において、LH レベルが増加を示した。また、雌雄の差なく、スチレン曝露で LH を増加させるという結果であった。このことはスチレンに内分泌かく乱作用がある可能性を示唆している。つまり、スチレン自体にエストロゲン様作用があるわけではなく、エストロゲンを制御する働きのある LH に作用することで内分泌作用に影響を及ぼす可能性も考えられる。

今後の課題として、実際の性ホルモンの動態を明確にすることがあげられる。さらに、プロラクチン抑制作用があるといわれるドーパミン、GABA といった神経伝達物質についても検討し、スチレンが線条体など脳内の組織学的にどのような変化をおよぼしているかを明らかにすることが必要と思われる。

また、今回、曝露濃度は一点 (100ppm) のみの測定であったので、曝露濃度を変化させ、ホルモンの変動を測定し、ホル

モンへの影響を生じない閾値を推定することも可能と思われる。

2) スチレン代謝における性差、週齢差、妊娠による代謝酵素活性の変化

これまで行ってきたスチレンモノマーの妊娠中曝露による生殖、胎仔への影響の観察から、スチレンモノマー高濃度曝露によって発達毒性がみられていたが、このメカニズムを解明するために代謝酵素変化に対するスチレンモノマーの影響を検討した。大抵の動物では肝ミクロソーム酵素活性のレベルは発達段階によって異なり未成熟な時期では活性は低い、しかし生後急速に増加し、外来性化学物質に対する代謝も行われる。チトクローム P450 はその isozyme によっては性特異性をもち、発達に伴って調整されている。スチレンの場合も酵素活性は未成熟ラットで低く、思春期 (青春期) 以降に活性が高くなっていた。今回の実験からこれは雄特異的チトクローム CYP2C11/6 の発現によるものとみられる。18週齢で未熟期の数10倍の誘導がみられ、雌では雄よりも18週齢では低い発現量であった。ラットではほかの種に比べて性差が強くあらわれ、芳香族炭化物、トルエンでみられたが、トリクロールエチレンではなかったとの報告 (Nakajima 1992) があるが、今回、スチレンでは性差がみられた。この性差は雄特異的チトクローム CYP2C11/6 の体内分布によると考えられ、この分子種に対する親和性の違いによるものと思われる。またこの分子種は性ホルモンの代謝に関連していることから、性ホルモン動態との関連も考慮に入れる必要があると考えられる。

代謝酵素誘導への妊娠にともなう影響

についてはチトクローム酵素経由の代謝に変化がみられるが、まだそのメカニズムについてはよく知られていない。また、CYP2E1 のほうは性差による影響はあまり受けなかった。しかし、妊娠後期では発現量が減少し、酵素活性が低下した。P450 isozymes 全体が妊娠にともなって減少するといわれているが、妊娠時のスチレンなどの炭化水素の代謝に及ぼす影響を調べるためには、胎仔への影響は、成熟動物とは異なることを考慮する必要があると思われる。

E 結論

1) スチレン曝露 *in vivo* 実験により、ラットのプロラクチンなどが変化し、内分泌かく乱作用のマーカールとして神経内分

泌系の測定が有効であることが示唆された。

2) スチレンモノマー代謝酵素活性は成熟ラットでは雌雄による性差がみられ、未成熟ラットではみられなかった。チトクローム CYP2C11/6 は成熟雄で活性が高かった。

3) 妊娠中はスチレンモノマーの薬物動態が非妊娠時とは異なり、酵素活性が低下していた。

F 研究発表

Katakura Y, Kishi R, Ikeda T, Miyake H. Effects of Prenatal Styrene Exposure on Postnatal Development and Brain Serotonin and Catecholamine Levels in Rats. *Environ Res* 85:41-47, 2000.

表1 スチレン曝露、皮下投与による内分泌ホルモン動態の結果要約

(n=8, 予備的データ)

	PRL	LH	GH	TSH
曝露群 (雌)	↑ (p < 0.05)	↑ (p < 0.05)	差なし	差なし
皮下投与群 (雌)	差なし	↑↑ (p < 0.01)	↑	差なし (p < 0.01)
皮下投与群 (雄)	差なし	↑ (p < 0.01)	差なし	↓ (p < 0.01)

↑ : コントロール群より有意に増加

↓ : コントロール群より有意に減少

表2 ミクロソーム蛋白量とチトクローム P450 量の性差

Age	Sex	Microsomal protein (mg/ g liver)	Cytochrome P450 (nmol/ mg protein)
21st day	Male	25.2 ± 3.0*	0.597 ± 0.022
	Female	18.4 ± 1.5	0.600 ± 0.023
Adult [18w]	Male	30.7 ± 1.8	0.739 ± 0.073**
	Female	28.4 ± 3.4	0.584 ± 0.046

表3 ミクロソーム蛋白量とチトクローム P450 量の週齢差

Age	Male		Female	
	Microsomal protein [mg/g liver]	cytochrom P450 [nmol/mg protein]	Microsomal protein [mg/g liver]	cytochrome P450 [nmol/mg protein]
Newborn	ND	ND	17.96 ± 1.9	0.094 ± 0.01
21st day	25.2 ± 3.0	0.597 ± 0.022	18.4 ± 1.5	0.60 ± 0.023
Adult [18w]	30.7 ± 1.8*	0.739 ± 0.073*	28.4 ± 3.4**	0.584 ± 0.046**

ND: Not determined

*: p<0.05

** : p<0.01

表4 ミクロソーム蛋白量とチトクローム P450 量の妊娠に伴う変化

gestation period	Microsomal protein (mg/ g liver)	Cytochrome P450 (nmol/ mg protein)
Non-pregnant	28.4 ± 3.4	0.584 ± 0.046
10th day	28.2 ± 1.9	0.592 ± 0.045
21st day	26.3 ± 1.8	0.489 ± 0.018**

** : p<0.01

表5 スチレン酵素代謝活性の性差、週齡差、妊娠による変化

	styrene glycol
Male, 3 w	50.7 ± 6.6
Male, 18 w	92.5 ± 7.1 ^a
Female, 3 w	41.5 ± 3.4
Female, 18 w	38.2 ± 3.8
Pregnant (10 d)	29.0 ± 8.2
Pregnant (21 d)	22.1 ± 4.9 ^b

(nmol/ g liver/ min)

a: p<0.01, significantly different from 18 weeks of female group and 3 weeks of male group

b: p<0.05, significantly different from non-pregnant group