

3. 「発達障害児の母親及び本人の新生児期甲状腺マスキリーニング結果  
及び現在の甲状腺機能に関する後ろ向き研究」

主任研究者 岸玲子 北海道大学大学院医学研究科社会医学専攻公衆衛生学分野教授  
研究協力者 佐田文宏 北海道大学大学院医学研究科社会医学専攻公衆衛生学分野講師  
玉置淳子 北海道大学大学院医学研究科社会医学専攻公衆衛生学分野助手  
加藤静恵 北海道大学大学院医学研究科社会医学専攻公衆衛生学分野  
倉橋典絵 北海道大学大学院医学研究科社会医学専攻公衆衛生学分野  
西條泰明 北海道大学大学院医学研究科社会医学専攻公衆衛生学分野  
氏家武 北海道こども心療内科氏家医院  
長沼陸雄 北海道立札幌肢体不自由児療育センター小児神経科

研究要旨

甲状腺機能と注意欠陥・多動（ADHD）及び学習障害（LD）など神経発達障害の関連の関係を明らかにする目的で、小児神経精神科にて発達障害の診断のもと通院している児の親、及び注意欠陥・多動（ADHD）及び学習障害（LD）親の会を通じて360名に調査への参加を募り、調査研究を進めている。患者の母の妊娠中の甲状腺機能検査の結果、及び新生児甲状腺機能検査結果の閲覧、及び現在の時点での児の採血にたいする同意を得られた方を対象に検討する。

A. 研究の目的

内分泌攪乱物質が甲状腺への作用を介しての神経発達への影響が危惧されている。特に、サルにおいてPCB、鉛の曝露実験でADHD類似の行動上の問題が指摘されている<sup>1) 2) 3)</sup>。また長山らはバックグラウンドの曝露を受けている母親のダイオキシン類濃度が児の甲状腺刺激ホルモン（TSH）濃度と正の相関があると報告している<sup>4)</sup>。Koopmanらは母乳中のダイオキシン、PCBが高値であれば有意に母体血清中のT3、T4値が低値であり、児の生後2週目と3ヶ月後の血清TSH値は高値であると報告している<sup>5)</sup>。Hadowらは妊娠中の診断のついていない甲状腺機能低下が胎児へ影

響を及ぼし知能に影響を及ぼすのでスクリーニングが必要であると報告している<sup>6)</sup>。松浦らは母乳のダイオキシンとPCBは乳児の甲状腺機能に大きな影響は認められないが、長期的な影響についての観察が必要であるとしている<sup>7)</sup>。Weissらは一般集団（<1%）に比してADHD患児で高率（5.4%）に甲状腺異常がみとめられたと報告している<sup>8)</sup>。

札幌市では1986年6月より妊婦甲状腺マスキリーニングを施行しており、発達障害児の母親の甲状腺マスキリーニング結果と児の発達の関連について検討するとともに、質問紙による曝露リスクについても明らかにすることを目的とした。後ろ向きコホートでは、曝露評価が十分でなく、

今後前向きコホート研究において、妊婦および新生児を対象に内分泌攪乱物質の胎児期暴露評価と甲状腺機能および神経発達の評価が必要である。

#### B. 研究の方法

札幌市内の小児精神科 2 箇所及び ADHD、LD 親の会を通じて発達障害児の保護者に対して、妊婦及び新生児甲状腺機能検査を受けた母児と限定して調査研究への参加者を募った。

札幌市衛生研究所に保存されている過去の妊婦及び新生児甲状腺マスキング検査結果を症例群とコントロール群について解析する。更に、承諾を得られた発達障害児に対して甲状腺機能検査を施行する。

#### C. 研究結果

現在、調査依頼文書を配布し、同意書を回収し、逐次採血を施行している。

#### D 倫理面への配慮

北海道大学の倫理委員会遺伝子解析審査小委員会の指針に従って実施する。2. 疫学調査におけるインフォームドコンセントはヘルシンキ宣言に基づいて行う。患者または家族が研究への参加を自発的に中止しても不利益を被らないよう配慮する。対象者のプライバシーの保持には細心の注意を払う。3. 両親の了解を得てから詳細な問診と理学所見の検討を行う。神経発達・免疫学的ならびに内分泌学的検査に関しては、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を十分に説明し、すべて事前にインフォームドコンセントを得て行う。

すべての実験・研究は、北海道大学医学研究科及び北海道大学大学院獣医学研究

科で規定されている、ヒト組織及び動物を用いた実験指針に準じ、また、北海道大学の倫理委員会遺伝子解析審査小委員会の指針に従う。実験動物の飼育及び安楽死に関しては最大限の配慮をする。

#### E. 参考文献

- 1) Rice DE Parallels between attention deficit hyperactivity disorder and behavioral deficits produced by neurotoxic exposure in monkeys :Environ Health Perspect 2000 Jun ;108 Suppl 3 :405-8
- 2) Rice DE Behavioral impairment produced by low-level postnatal PCB exposure in monkeys: Environ Res 1999Feb;80:S113-121
- 3) Arnold DL, Bryce F, Mes J, Tryphonas H, Hayward S, Malcom S: Toxicological consequences of feeding PCB congeners to infant rhesus (*Macaca mulatta*) and cynomolgus (*Macaca fascicularis*) monkeys :Food Chem Toxicol 1999 .37:153-67)
- 4) Hagayama, J., Okamura, K., Iida, T., Hirakawa, H., Matsueda, T., Tsuji, H., Hasegawa, M., Igarashi, H., Fukushima, J., Watanabe, T., 1998b. Perinatal exposure to chlorinated dioxins and related chemicals on thyroid hormone status in Japanese breast-fed infants . Organohalogen compd. 37, 313-316
- 5) Corine Koopman-Esseboom, Dennis C. Morse, Nynke Weisglas-Kuperus, Ineke J. Lutkeschipholt, Cornelis G. Van Der Paauw, Louis G.M.T. Tuinstra, Abraham

Brouwer, Pieter J.J. Sauer: Effect of dioxins and Polychlorinated Biphenyls on Thyroid Hormone Status of Pregnant Women and Their Infants :Ped. Reser. 1994, vol36(4)468-473

- 6) J E. Haddow, G E. Palomaki, W C Allan, J R Williams, G J Knight, J Gagnon, C E O'Heir, M L Mitchell, R J Hermos, S.E. Waisbren, J D Faix, R Z Klein: Maternal Thyroid Deficiency during Pregnancy and Subsequent Neuropsychological Development of the Child: N Engl J Med 1999; 341:549-555
- 7) Nobuo Matsuura, Tomoaki Uchiyama, Hiroshi Tada, Yosikazu Nakamura, Naomi Kondo, Masatoshi Morita, Masaru Fukushima : Effects of Dioxins and Polychlorinated Biphenyls (PCBs) on Thyroid Function in Infants Born in Japan: Report from Research on Environmental Health : Clin Pediatr Endocrinol 2001; 10(1):1-6
- 8) Roy E Weiss, M A Stein, B Trommer, S Refetoff : Attention-deficit hyperactivity disorder and thyroid function : J Pediatr 1993; 123:539-45

F 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

4. 「注意欠陥障害多動症 (attention-deficit hyperactivity disorder, ADHD) における甲状腺機能の検討」

分担研究者 田島敏広 北海道大学・大学院医学研究科  
病態制御学専攻生殖発達医学講座小児発達医学分野 助手

研究要旨

注意欠陥障害多動症 (attention-deficit hyperactivity disorder, ADHD) と甲状腺機能について検討した。我々がフォローしている 45 例のクレチン症の患者では ADHD を認めなかった。ADHD と診断された 2 例において甲状腺機能は正常であった。いずれも症例数を増やして検討する必要がある。甲状腺ホルモン不応症の 1 家系でその児に ADHD は認めなかった。

A. 研究目的

ADHD の原因は生物学的ものと考えられているが、その正確な成因は不明である。しかしいくつかの報告では ADHD と甲状腺機能との関連が注目されている。

全身性の甲状腺ホルモン不応症 (以下 GRTH) は甲状腺ホルモンの受容体 (thyroid hormone receptor, TR) の一つである TR $\beta$  遺伝子の異常によって甲状腺ホルモンに対する不応を示す疾患であるが、この疾患で ADHD、または学習障害が多く認められると報告された (N Engl J Med 1993;328:997-1001)。

逆に ADHD の症例の中に甲状腺機能異常を有する頻度が一般の頻度より高いことも報告されている (J Pediatr 1993;123:539-45)。そこで現在当科においてフォローしているクレチン症 (先天性甲状腺機能低下症) のなかで ADHD の症例がいるのか、あるいは ADHD の症例のなかで甲状腺機能低下症、または GRTH が存在するのかを検討することを目的とした。倫理面への配慮

甲状腺機能の検査については事前に家族に十分な説明を行い、その同意を書面で得た上で行う。

B. 研究方法

1. 新生児マススクリーニング後の追跡フォローにて当科において病型診断を行うことができた患者 [甲状腺形成異常 (5 名、女児 16 名)、ホルモン合成障害 (男児 22 名、女児 12 名)] を対象とし、田中ビネー法または WISC 法または WISC. III 法を用いて知能検査を行う。また ADHD とと思われる症例についてはさらなる精査対象とする。

2. ADHD と診断された症例で甲状腺ホルモン (T4, T3, freeT4, freeT3)、甲状腺刺激ホルモンを測定し、甲状腺機能との関連について検討する。また甲状腺ホルモンの低値または TSH の軽度上昇が認められ、潜在的な甲状腺機能低下が疑われる症例については Thyrotropin-releasing hormone (TRH) 試験を行う。この試験でも異常が認められる場合には精密検査の対象とし、甲状腺機能低下の原

因について検討する。

3. GRTH と考えられた症例については TR $\beta$  遺伝子の異常を PCR-直接塩基配列法により解析する。

#### C. 研究結果

1. IQ が 90 以上の症例は形成異常群で 60% (9/15)、合成障害群で 90% (27/30)、合計 80% であった。

2. 今回我々がフォローしているクレチン症については ADHD は存在しなかった。

3. ADHD と診断された 1 例について TR $\beta$  遺伝子を検索したが異常は見出せなかった。

4. 母親の妊娠中の freeT<sub>4</sub>, freeT<sub>3</sub> の高値、TSH 正常より GRTH と診断した 1 家系については TR $\beta$  遺伝子の exon 8 のホルモン結合領域の E460K の比較的多く認められる変異を同定した。

#### D. 考案

今回の我々の検討ではマススクリーニング以前に比べ、知能予後は改善していることが示された。しかし未だに IQ 低下を認める症例が存在し、今後治療など改善する余地があると思われた。また明かな ADHD については認められなかったが、さらなる専門的診断が必要である。今後さらに微細脳障害など長期的フォローをしていく予定である。ADHD を対象とした甲状腺機能の検索はいまだ症例数が少なくさらに症例を増やして検討する必要がある。GRTH の 1 家系については今後知能検査、ADHD などの有無について検討する必要がある。

#### E. 結論

今回のクレチン症患者にははっきりした ADHD は認められなかった。

#### G. 研究発表

##### 学会発表

1. 佐藤孝平、奥原宏治、中江淳、田島敏広、篠原望、藤枝憲二 新生児スクリーニングで発見されたクレチン症患者の病型、知能予後についての検討

第 35 回日本小児内分泌学会、10/3-10/7、東京、2001

2. 田島敏広、佐藤孝平、奥原宏治、中江淳、篠原望、藤枝憲二 新生児スクリーニングで発見されたクレチン症患者の病型ならびに知能予後、ADHD の有無について

第 29 回日本マススクリーニング学会 10/20-10/21、横浜、2001

5. 「レトロスペクティブに見た発達障害児の両親の生活状況と  
発達状況との関連に関する研究」

分担研究者	佐藤 剛	札幌医科大学保健医療学部・作業療法学科	教授
研究協力者	仙石 泰仁	札幌医科大学保健医療学部・作業療法学科	講師
	中島そのみ	札幌医科大学保健医療学部・作業療法学科	助手

研究要旨

(1) プレスタディとして研究者らが実際に作業療法を実施している学習障害児 21 名の問診票および診療記録による周産期の状況および発達特性について調査を行った。その結果、低体重出生や仮死既往など周産期リスクを持つものが対象児も半数におよんでいた。また、レトロスペクティブに見た発達状況では乳幼児期から言語理解、落ち着きのない行動、集団への適応性に問題を示していたこどもが多く存在し、これらの発達指標が早期からの障害の発見に有用であると考えられた。

(2) プレスタディを基に発達状況、現在の症状に関する質問項目を設定すると共に、両親の生活状況に関する質問を加えたアンケート調査票を作成し、北海道内の親の会に参加している者や医療機関に通院しているこどもを対象に調査を実施した

A. 研究の目的

環境化学物質の脳神経系への影響については未だ十分に解明されていない状況にある。しかし、Warren<sup>1)</sup>らは農薬含有水を与えた雄マウスの疫学的研究で、2種類の混合農薬含有水を与えたマウスで甲状腺ホルモン濃度の変化と行動上の攻撃性の増加を確認したことを報告している。また、Corborn<sup>2)</sup>や星野<sup>3)</sup>は、いわゆる環境ホルモンやある種の食物、食物添加物が学習障害（Learning disability; 以下 LD）や注意欠陥・多動性障害（Attention Deficit Hyperactivity Disorder; 以下 ADHD）を引き起こす危険性があることを指摘している。このように、環境化学物質への曝露が次世代の脳神経系の発達に何らかの影響を与え、LD や ADHD などの発達障害を生じさせる原因となることが示唆されている。一方、LD や ADHD は用語そのものは教育領域に留まらず、医療の中でも頻繁に用いられるようになってきているが、定義・診断に統一された見解が得られていないことや、その障害が軽度であるために早期発見・治療にも課題が残されている<sup>4)~6)</sup>。そこで、本年度の研究では、LD もしく

は ADHD と診断されているこどもの両親が該当児を妊娠した時期にどのような生活状況にあったのかを明らかにし環境化学物質の曝露リスクを検討すると共に、曝露リスクと周産期の状況および発育歴や臨床症状との関連を明らかにすることを目的とした。

B. 研究の方法

調査を行うに当たり、プレスタディとして研究者らが札幌医科大学保健医療学部で実際に作業療法を行っている LD 児を対象とし、問診票、診療記録を基に周産期の状況、合併症の有無、乳幼児期の生活史および運動・言語発達、臨床症状、WISC-R 知能検査結果を調査し対象児の特性を抽出する（研究 1）。更に、この研究 1 の結果に基づいて発達状況、現在の症状に関する質問項目を設定すると共に、両親の生活状況に関する質問を加えたアンケート調査票を作成し、北海道内の親の会に参加している者や医療機関に通院しているこどもを対象に調査を行う事を計画した。（研究 2）研究 1 および 2 も対象者には研究内容について十分な説明をした上で、同意を得られた者のみに

実施した。

## 1. 研究1の方法

### (1) 対象

対象の選択基準は、1981年から現在まで学習障害と児童精神科医により診断され、研究者らが評価および作業療法を行った126名の児童の中で、CTもしくはMRI検査で脳の器質的な異常が認められない者の内、知能水準がICD-10の診断基準に従いIQ70以上で知的障害がない者<sup>7)</sup>とした。このような基準により選択された対象者は22名（男児20名、女児2名）、平均年齢は初診時7.7±2.13歳であった。

### (2) 調査内容

調査した内容は周産期の状況、合併症の有無、乳幼児期の生活史および運動・言語発達、臨床症状、WISC-R知能検査結果についてである。特に、周産期の状況に関しては、母親の服薬状況、出産時の母親年齢、妊娠期間、出生時体重、出生時状況の各項目について行った。以上の項目について母親への問診票、診療記録の記載から調査を行った。

## 2. 研究2の方法

### (1) 対象および調査内容

対象は北海道内で活動しているLDおよびADHDの親の会3団体の会員260名と、小児精神科医が常勤で勤務診療を行っている4医療施設に通院しているLDおよびADHD児の両親80名である。

アンケート調査は一般情報として記入者、家族構成、こどもの性別・年齢・通学先の5項目、現在像として診断名、各種検査結果、言葉の理解力に関する6項目、話し言葉に関する8項目、文字に関する11項目、計算に関する11項目、生活に関する4項目、運動に関する7項目、行動に関する11項目、社会性に関する8項目、更に服薬状況の69項目を設定した。こどもの発育状況に関しては周産期の状況、出生後1年間の健康上状態および神経学的徴候、運動発達に関する36項目の質問項目を設けた。また、

1歳から6歳までの発達状況を運動発達に関して12項目、前庭感覚系に関連した発達11項目、触感覚に関する15項目、視覚系に関する8項目、聴覚・言語に関する7項目、嗅覚、味覚、排泄、睡眠に関する7項目、その他3項目の63項目を設定した。該当児を出産するまでの両親の健康状態では、生活地域、職業、既往歴、喫煙習慣、就業時および家庭で化学物質との接触状況などに関する質問項目を設定した。

## C. 研究結果

### 1. 研究1の結果

周産期での母親の服薬状況は2名が抗てんかん薬を服用していた。出産時の母親年齢は26～35歳以下での出産が17名と比較的高齢での出産が多かった。妊娠期間では、在胎9ヶ月未満の早期出産が2名、出生時体重では1500g以下の低体重出産児は1名であった。出生時状況のリスク因子としては仮死の既往がある者が9名であった。合併症としては、脳波所見の異常を認める者が3名で、内1名は症候性てんかんの診断を受けていた。その他、先天性心疾患が1名含まれていた。

生活史では乳児期に哺乳微弱傾向が認められた者が5名、泣いてばかりいて手がかかった者が1名、逆におとなしくてほとんど手のかからなかった者が8名であった。運動発達では、10ヶ月以降に座位、18ヶ月以降に独歩を獲得したという、乳児期の発達の遅れを示した者は、それぞれ3名と4名であった。しかし、就学期になってもスキップが出来ないといった幼児期後半における達成課題になると11名が問題を持つようになっていた。一方、巧緻運動に関する、就学期になっても鉛筆やクレヨンが上手に使えないでは4名が問題を示すに留まっていた。言語発達に関しては18ヶ月以降に初発語が出た者が3名、3歳以降に2語文を獲得した者が6名であったが、就学期になっても頼み事を十分理解できない者は13名に増加してい

た。

WISC-R 知能検査では、対象者全員の平均値では全IQ85.1、言語性IQ87.9、動作性IQ85.1という結果であった。また、言語性IQと動作性IQで15以上の顕著な差を示した者は10名で、その内6名が言語性優位、4名が動作性優位という結果であった。臨床症状としては、言語理解や文字学習の遅滞、不器用、多動・衝動性といった症状を対象者の半数以上が示していた。

仮死の既往の有無と生活史の関連では、乳児期の生活史では哺乳微弱傾向が仮死の既往のある者が4名、逆におとなしくて手がかからないが仮死既往のない者が6名と特徴的な傾向があった。運動発達では仮死の既往の有無による差異は認められなかった。言語発達では就学期になっても頼み事を十分に理解できないという項目で、仮死の既往のある者が7名とやや多くなっていた。仮死の有無と知能検査結果および臨床症状の関連では、知能検査結果では言語性IQが仮死の既往のある者が82.5、ない者が92.6と仮死の既往がある者が有意に低くなっていた。また、言語性と動作性の差に関しては言語性優位の者がそれぞれ3名づつであるが、動作性優位の者は仮死既往のある者が3名、ない者が1名と仮死既往のある者に多い結果であった。臨床症状では仮死の有無による明確な相違は認められなかった。しかし、傾向として、言語理解や文字学習の遅滞と多動・衝動性が、ほとんどの仮死既往の者に認められていた。

## 2. 研究2の結果

対象者へのアンケート調査表の配布が終了し現在回収中である。

## D. 考察

### 1. 研究1の考察

学習障害と周産期リスクとの関連は、低出生体重児や早期出産時の追跡研究を通じて多く

の報告がされている<sup>8,9)</sup>が、今回の調査でも対象児20名の内9名に仮死や低体重出生の周産期リスクが認められ関連性が示唆された。乳幼児期の生活史ではこれまでの報告<sup>10,11)</sup>と同様に理解言語の未熟さや落ち着きのない行動、集団生活への不適應などが認められた。一方、周産期リスクがあるこどもでは幼児期に言語発達の遅れを指摘されていることが多く何らかの関連性が示唆される結果であった。周産期のリスクは何らかの中枢神経系の障害を示唆する一つの根拠とはなるが<sup>12)</sup>、その所見と実際の臨床症状と結びつけて考えることは不確定さを伴っていることは事実である。しかし、早期からの予防的な関わりを行っていく上で、レトロスペクティブな研究の必要性が示唆された。

## 引用文献

- 1) Warren P. Porter, James W. Jaeger and Ian H. Carlson, "Endocrine, immune and behavioral effects of aldicarb (carbamate), atrazine (triazine) and nitrate (fertilizer) mixtures at groundwater concentrations," TOXICOLOGY AND INDUSTRIAL HEALTH Vol. 15, Nos. 1 and 2 (1999), pgs. 133-150.
- 2) Corborn T, Dumanoski D, Myeers JP. Our Stolen Future. Dutton, 1996. (第7章 シングルヒット、第11章 がんだけでなく、長尾力訳。翔泳社発行。1997.)
- 3) 星野仁彦, 八島祐子, 熊代永. 学習障害・MBDの臨床. 新興医学出版社. 1992.
- 4) 前川喜平: 学習障害—診断と対応—. 小児科 39(2): 161-168, 1998
- 5) 栗田広: 学習障害の概念とその課題. 発達障害研究 17(3): 188-195, 1995
- 6) 上野一彦: 学習障害の概念・定義に関する考察. 東京学芸大学紀要 42: 111-117, 1991
- 7) WHO ICD-10, 1988 Draft of Chapter V, Categories F000-F99, Mental Behavioral



and Developmental Disorders : WHO,  
1988 : 厚生省精神保健医療研究「精神疾  
患の診断基準作成に関する研究」 班訳, 国  
立精神・神経センター精神保健研 究所出版  
社

8) Hunt JV et al : Very low birth weight  
infants at 8 and 11 years of age : Role of  
neonatal illness and family status.  
Pediatrics 82 : 596-603, 1988

9) 齊藤久子, 他 : 極小・超未熟児の学齢期. 小  
児の精神と神経 34 : 15-27, 1994

10) 森永良子, 他 : LDの幼児期特性. 小児の  
精神と神経 26(1) : 45-50, 1986

11) 絹川涼子, 他 : 学習障害児の生活史. 情緒  
障害研究紀要 11 : 7-15, 1992

12) Casiro OG et al : Language development  
of very low birth weight infants and  
full-term  
controls at 12 months of age. Early  
Human Development 24(1) : 65-77, 1990

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

6. 「ダイオキシンなど環境科学物質による次世代影響 特に増加する小児疾患発症  
メカニズムの解明とリスク評価」

分担研究者 西村 孝司 北海道大学遺伝子病制御研究所・免疫制御分野教授  
研究協力者 富樫 裕二 北海道大学遺伝子病制御研究所・免疫制御分野助手

研究要旨

コホート内症例対照研究の形で、アトピー、喘息および化学物質過敏症の患者と、対照に関する Th1/Th2 バランスの評価として、サイトカインの測定を行い、各種因子との関連を検討することを目的とし、まずT細胞からのサイトカイン産生能を細胞内サイトカイン測定により評価する方法の確立を行った。その結果、CD4<sup>+</sup>T 細胞の細胞内サイトカイン(IFN- $\gamma$ /IL-4)を測定することによる、Th1/Th2 バランスを測定する評価系を確立することができた。

A. 研究目的

コホート内症例対照研究の形で、アトピー、喘息および化学物質過敏症の患者と、対照に関する Th1/Th2 バランスの評価として、サイトカインの測定を行い、各種因子との関連を検討することを目的とする。まずT細胞からのサイトカイン産生能を細胞内サイトカイン測定により評価する方法の確立を行う。

B. 研究方法

健常人ボランティアの末梢血を Ficoll-Paque を用い比重遠心分離により末梢血単核球 (PBMC) を得た。

得られた PBMC を BrefeldinA(BFA, 10 $\mu$ g/mL) 存在下 4 時間 Phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA) 25ng/mL およびカルシウムイオノフォア (A23187) 250ng/mL で刺激した。培養後、細胞を回収し PerCP 標識抗 CD4 抗体で染色後、FITC 標識抗 IFN- $\gamma$ 抗体、PE 標識抗 IL-4 抗体を用い細胞内サイトカインの染色を行い FACSCalibur にて CD4<sup>+</sup>細胞の IFN- $\gamma$ /IL-4 産生を調べた。

また PBMC を MACS により CD4<sup>+</sup>細胞を濃縮した後 PE 標識抗 CD4 抗体、FITC 標識抗 CD45RA 抗体で染色し、CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>NaiveT 細胞を

FACSVantage により単離した。単離した CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>NaiveT 細胞を、Th1 条件下 (IL-2 100U/mL, IL-12 40U/mL, IFN- $\gamma$  15ng/mL, 抗 IL-4 抗体 1 $\mu$ g/mL)、あるいは Th2 条件下 (IL-2 100U/mL, IL-4 10ng/mL, 抗 IL-12 抗体 1 $\mu$ g/mL, 抗 IFN- $\gamma$ 抗体 1 $\mu$ g/mL)、固相化抗 CD3 抗体で刺激し、培養した。培養 14 日目に細胞を回収し、固相化抗 CD3 抗体により 6 時間再刺激(最後の 4 時間は BFA の存在下)し IFN- $\gamma$ /IL-4 産生を、上記方法にて解析した。

倫理面への配慮は、北海道大学医学部、北海道大学遺伝子病制御研究所の倫理規定に従って実施した。

C. 研究結果

PBMC より得られた CD4<sup>+</sup>細胞の IFN- $\gamma$ /IL-4 産生細胞の解析結果を図 1 に示す。IFN- $\gamma$ 産生細胞は 8%、IL-4 産生細胞は 4%であった。IFN- $\gamma$ /IL-4 すなわち Th1/Th2 バランスは、2 (8/4)であった。

CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>NaiveT 細胞より誘導された Th1 細胞の IFN- $\gamma$ /IL-4 産生細胞の解析結果を図 2 に示す。IFN- $\gamma$ 産生細胞は 61%、IL-4 産生細胞は 2%であった。IFN- $\gamma$ /IL-4 すなわち Th1/Th2 バランスは、30.5 (61/2)であった。

CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>NaiveT 細胞より誘導された Th2 細胞の IFN- $\gamma$ /IL-4 産生細胞の解析結果を図 3 に示す。IFN- $\gamma$ 産生細胞は 1%、IL-4 産生細胞は 15%であった。IFN- $\gamma$ /IL-4 すなわち Th1/Th2 バランスは、0.1 (1/15)であった。

D. 結論

末梢血および誘導された Th1 細胞、Th2 細胞の Th1/Th2 バランスを測定する評価系が確立された。われわれの過去の実験なども参考にすると、刺激剤は固相化抗 CD3 抗体が良いと考えられた。以上より、この評価系を用いることにより、アトピー、喘息および化学物質過敏症の患者と、対照に関する Th1/Th2 バランスと各種因子との関連を検討することができる。と考える。

E. 参考論文

1: Sato M, Chamoto K, Tsuji T, Iwakura Y, Togashi Y, Koda T, Nishimura T.

Th1 cytokine-conditioned bone marrow-derived dendritic cells can bypass the requirement for the functions during the generation of CD8(+) CTL.

J Immunol. 2001;167:3687-91.

2: Takaoka A, Tanaka Y, Tsuji T, Jinushi T, Hoshino A, Asakura Y, Mita Y, Watanabe K, Nakaike S, Togashi Y, Koda T, Matsushima K, Nishimura T.

A critical role for mouse cxc chemokine(s) in pulmonary neutrophilia during the type 1-dependent airway inflammation.

J Immunol. 2001;167:2349-53.

F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

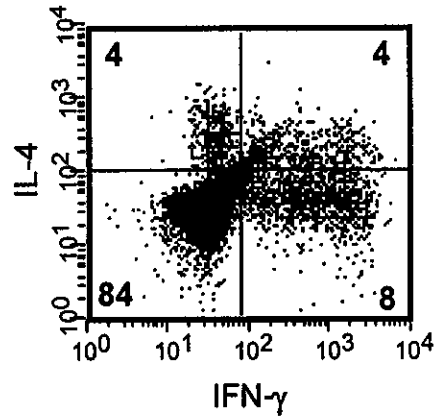


図 1.  
末梢血 CD4<sup>+</sup>T 細胞の IFN- $\gamma$ /IL-4 産生

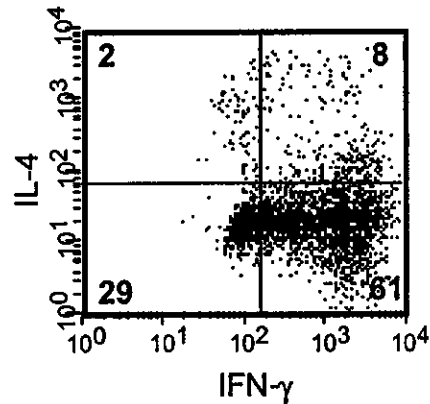


図 2.  
CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>NaiveT 細胞より誘導された Th1 細胞の IFN- $\gamma$ /IL-4 産生

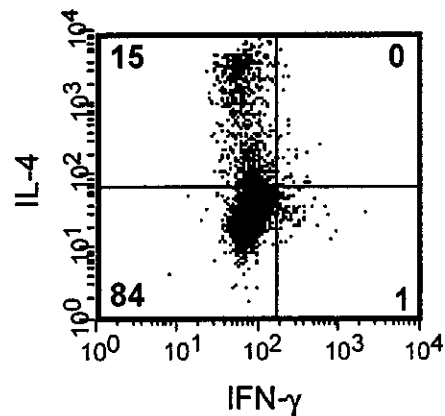


図 3.  
CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>NaiveT 細胞より誘導された Th2 細胞の IFN- $\gamma$ /IL-4 産生

7. 「P450 をバイオマーカーとした曝露影響評価」

分担研究者 藤田正一 北海道大学・大学院獣医学研究科 教授

研究要旨

シトクロム P450 (P450、CYP) は広範な生物種に存在し、生理活性物質の生合成や、医薬品・環境汚染物質などの代謝排泄に関与する、生体のホメオスタシス維持の為に重要な酵素である。P450 には様々な分子種が存在するが、環境汚染物質の曝露によって、分子種特異的にその発現レベルが変動することが報告されている。従って、広範な P450 分子種の mRNA 発現量、蛋白量、酵素活性を測定することにより、鋭敏に外来化学物質が引き起こす初期の生体反応を検出できるだけでなく、PCB、DDT など比較的良く知られている物質以外の、未知環境化学物質の影響も評価できる可能性がある。ヒトを対象とした場合、サンプリング及び解析の為に非侵襲的方法が必要であるが、これまで、胎盤や血液中に P450 が発現し、特に、喫煙と血液 P450 発現レベルとの間に相関が得られることが報告されている。そこで、本研究では、胎盤、母体血中の異物代謝酵素 P450 をバイオマーカーとして環境汚染のヒトへの影響を評価することを目的とする。平成 13 年度では、実際にこれらのサンプルを使って解析を行うための基礎研究を行った。まず、血液サンプルが本研究の対象となることから、環境汚染物質の曝露が、血液に発現する遺伝子群にどのような影響を与えるのかについて調べた。実験動物であるラットに AhR (aryl hydrocarbon receptor) アゴニストのベンゾピレンを投与し、マイクロアレイ解析法を用いて、発現レベルが変動する mRNA 群について同定した。

一方、環境汚染物質の曝露以外に、P450 発現レベルや活性に影響する因子として、P450 やその調節因子の遺伝多型、ステロイドホルモンなどの生理活性物質濃度の変化、臨床的な薬剤投与があげられる。特に、今後サンプリング対象となる妊娠期間中の母体では、薬物代謝酵素群の活性が非妊娠期と異なるとの報告もある。そこで、今年度は、妊娠期の薬物代謝が非妊娠期とどのように異なるのかを明らかにするため、妊娠及び非妊娠動物に AhR リガンドを投与し、異物代謝能の変化を調べた。妊娠期では、P450 をはじめとする異物代謝酵素群の外来異物による発現誘導が抑制されることが示唆された。また、エストロゲンなどのステロイドホルモンは、ステロイドホルモン受容体を介して AhR と相互作用する事が報告されている。そこで、ステロイドホルモン、特に内因性及び外因性のエストロゲン類が AhR の標的遺伝子である CYP1 ファミリーの発現に及ぼす影響について、実験動物や培養細胞を用いてその作用メカニズムを明らかにした。

研究協力者

数坂昭夫（北海道大学・大学院獣医学研究科・助教授）、石塚真由美（北海道大学・大学院獣医学研究科・助手）

A. 研究目的

シトクロム P450 (P450、CYP) は細菌、植物から哺乳類まで多くの生物種に存在し、ステロイドホルモンやビタミン、エイコサノイドなどの生理活性物質の生合成・代謝を行うと同時に、医薬品や環境汚染物質など、多くの異物の代謝も担っている一酸素添加酵素である。P450 には様々な分子種が存在し、哺乳類では数百に及ぶアイソフォームが報告されている。P450 の中でも、CYP1、CYP2、CYP3、CYP4 ファミリーは様々な外来異物によってその発

現量が変動することが知られているが、それらのレギュレーターとして、AhR (aryl hydrocarbon receptor) や PXR (pregnane X receptor)、CAR (constitutive androstane receptor)、PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) が知られている。環境汚染物質の中でも、ダイオキシン類やコプラナーPCB は AhR、フタル酸エステルは PPAR、ビスフェノール A は PXR、DDT や平面構造を持たない PCB、農薬は CAR や PXR などのリガンドと結合し、プロモーター領域に応答配列を持つ異物代謝酵素を誘導する。従って、広範な P450 分子種の mRNA 発現量、蛋白量、酵素活性を測定することにより、鋭敏に外来化学物質が引き起こす初期の生体反応を検出できるだけでなく、PCB、DDT など比較的知られている物質以外の、未知の環境化学物質の影響も評価できる可能性がある。

ヒトを対象とした場合、サンプリング及び解析の為に非侵襲的方法が必要であるが、これまで、胎盤や血液中に P450 が発現し、特に、喫煙と血液 P450 発現レベルとの間に相関が得られることが報告されている。そこで、本研究では、胎盤、母体血中の異物代謝酵素 P450 をバイオマーカーとして環境汚染のヒトへの影響を評価することを目的とする。平成 13 年度では、実際にこれらのサンプルを使って解析を行うため、基礎研究を行った。本研究の試料として、血液サンプルを用いることから、環境汚染物質の曝露が、血液に発現する遺伝子群にどのような影響を与えるのかについて、実験動物に AhR のアゴニストであるベンゾピレンを投与し、その影響をマイクロアレイを用いて解析した。

一方、環境汚染物質の曝露以外に、P450 発現レベルや活性に影響する因子として、P450 やその調節因子の遺伝多型、ステロイドホルモンなどの生理活性物質濃度の変化、臨床的な薬剤投与があげられる。特に、妊娠期間において、抱合酵素などの異物代謝能が変

化することも報告されている。また、エストロゲンなどのステロイドホルモンは、ステロイドホルモン受容体を介して AhR と相互作用する事が報告されている。そこで、今年度は、まず、妊娠期間において、異物代謝能がどのように変動するのかを、妊娠ラットを用いて、AhR のリガンド投与によって明らかにした。一方で、ステロイドホルモン、特にエストロゲン類が AhR に及ぼす影響について、実験動物や培養細胞を用いて基礎的研究を行った。ヒトにおいて代表的な内因性女性ホルモンである  $17\beta$  エストラジオールが、AhR アゴニストのベンゾピレン曝露による CYP1 ファミリー誘導に及ぼす影響について調べた。外因性女性ホルモンの代表化合物として、ホルモン補充療法に用いられるエクイレニンが AhR 機能に及ぼす影響を調べた。エクイレニンは、コレステロールを経ずに生合成されるため、 $17\beta$  エストラジオールやエストロンと異なり、不飽和型 B 環を持つ事がわかっている。その為、エクイレニンは、平面構造を有し、エストロゲン受容体だけではなく、多環芳香族であるベンゾピレンのように、にも親和性を示す可能性が考えられる。エクイレニンなどの不飽和型 B 環エストロゲンは、CYP1 ファミリーによって 4 位水酸化体に代謝され、DNA への結合性が増加するため、長期ホルモン補充療法は、発癌リスクが懸念されている。しかし、エクイレニンの曝露が、肝臓における前癌物質の代謝的活性化能にどのような影響を与えるのかについては研究が少ない。そこで、今回の研究では、エクイレニンによる AhR 介在性・非介在性の CYP1A サブファミリー転写活性化機構を調べ、エクイレニン曝露が、CYP1A サブファミリーの発現にどのような影響を与えるのかを明らかにした。

## B. 研究方法

(1) AhR アゴニスト曝露によって変動する血液中の遺伝子群のスクリーニング

Wistar ラット、7 週齢のオスにベンゾピレンを 20mg/kg を 3 日間連続で経口投与した。4 日目にと殺し、血液を採集して、RNA を抽出し、血中の mRNA 発現レベルの変動を、cDNA アレイを用いて調べた。

### (2) 妊娠期の異物代謝能の変動

6 週齢の妊娠 3 日目、及び同週齢の非妊娠 Wistar ラットに AhR リガンドの 3 メチルコラントレン (10mg/kg) を 3 日間経口投与し、肝ミクロソームを調整した。常法に従い、肝臓における CYP1A1 依存の代謝活性エトキシレゾルフィン O 脱エチル化 (EROD) 活性を測定した。また、p ニトロフェノールを基質として、第 2 相反応であるグルクロン酸抱合活性を測定した。

### (3) エストロゲン類が AhR 機能に及ぼす影響

3-1) 内因性のエストロゲン類・17β エストラジオールが AhR 機能に及ぼす影響

① 17β エストラジオールが CYP1 ファミリー (CYP1A1, CYP1B1) の誘導に及ぼす影響  
ヒト乳癌由来 MCF-7 細胞、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞にベンゾピレンを曝露し、17β エストラジオールを同時曝露することで、エストラジオールが、ベンゾピレンの CYP1 ファミリー発現誘導にどのような影響を与えるのかについて調べた。

② 17β エストラジオールが CYP1A1 発現誘導を阻害する機序の解明

ステロイドホルモンの CYP1 ファミリー誘導阻害の機序について、Fos-Jun 活性化や、転写共役因子リクルートの競合拮抗などの観点から調べた。培養細胞に Growth Factor を共存させ、CYP1A1 mRNA の発現がどのように変わるのかについて調べた。

3-2) 外因性のエストロゲン類・エクイレニンが AhR 機能に及ぼす影響

① HepG2 細胞におけるエクイレニンの CYP1A1 誘導能

エクイレニンの CYP1 ファミリー誘導能について、HepG2 細胞をエクイレニンに曝露し、リアルタイム PCR を用いて CYP1A1 mRNA 発現の変動を調べた。

② エクイレニンの AhR への結合性

RI 標識した BP との競合実験によって、エクイレニンの AhR への結合性を調べた。

③ AhR 転写活性に及ぼすエクイレニンの影響

エクイレニンが AhR 活性化能を有するかどうかに関しては、AhR の結合配列である XRE (Xenobiotic response element) の下流にレポーター遺伝子を連結し、ヒト肝癌由来細胞 HepG2 を用いて、ルシフェラーゼアッセイによって検討した。

④ リガンド親和性の異なる AhR を有するマウスにおけるエクイレニンの Cyp1A サブファミリー誘導能

AhR 多型によって、ダイオキシン類や多環芳香族類に対して感受性の異なる C57BL (高感受性) 及び DBA2 (低感受性) マウスを用いて、エクイレニン投与による肝臓の CYP1A サブファミリー発現への影響を調べた。

⑤ AhR ノックアウトマウスにおけるエクイレニンの CYP1A サブファミリー誘導能

AhR ノックアウトマウスを用いて、エクイレニン投与による肝臓の CYP1A サブファミリー発現への影響を調べた。

## C. 研究成果

(1) ベンゾピレン曝露によって発現が変動する血液中の mRNA のスクリーニングと同等  
ベンゾピレン投与によって、ラットの血液中には、癌遺伝子や癌抑制因子、Bcl ファミリー、プロテアーゼ、CYP2A1、PKC などの 44 遺伝

子の mRNA レベルの発現が上昇していることが分かった(表 1)。

### (2) 妊娠期の異物代謝能の変動

図に、妊娠期及び非妊娠期に 3 メチルコラントレンに曝露した母ラットの肝臓における異物代謝能を示す。CYP1A1 依存の代謝活性である EROD 活性は、妊娠期では非妊娠期のラットに比べて低い活性を示した。グルクロン酸抱合酵素活性は、P450 と同じく、肝ミクロソーム画分で、妊娠ラットでは、非妊娠ラットに比べて有意に低い活性値を示した(図 1)。

### (3) エストロゲン類が AhR 機能に及ぼす影響

3-1) 17β エストラジオールが AhR 機能に及ぼす影響

① HepG2 細胞では、エストラジール共存下でも、ベンゾピレンによる CYP1A1 誘導の抑制が見られなかった(図 2)。一方、MCF-7 細胞では、エストロゲンの共存によって有意に CYP1A1 mRNA 発現誘導レベルの抑制が認められた(図 2)。しかし、同じ MCF-7 細胞でも、ベンゾピレンによる CYP1B1 の発現誘導には影響が見られなかった(図 3)。

② EGF や IGF-I のような、エストロゲンによって活性化される成長因子の共存によって、CYP1 ファミリーの発現誘導レベルが抑制されることが報告されている。そこで、これらの成長因子をベンゾピレンと共存させて、CYP1A1 の発現に対する影響を調べた(図 4)。しかし、MCF-7 細胞では、これら成長因子の共存によって CYP1A1 mRNA の発現レベルに有意な変動は見られなかった。

3-2) エクイレニンが AhR 機能に及ぼす影響

① HepG2 細胞におけるエクイレニンの CYP1A1 誘導能

リアルタイム PCR によって CYP1A1 mRNA 発現レベルを調べたところ、エクイレニンの曝露

によって、HepG2 細胞では CYP1A1 発現が上昇することが明らかとなった(図 7)。その誘導は濃度依存的であり、30 μM のエクイレニン曝露では、コントロール群の約 1500 倍の mRNA 発現の増加を示した。

### ② エクイレニンの AhR への結合性

エクイレニンがどのような機序で CYP1A1 の発現レベルを増加させるのかを調べる為に、RI 標識したベンゾピレンを用いて競合結合実験を行った。AhR のリガンドであるベンゾピレンに比べるとその結合性は弱い、エクイレニンは直接 AhR に結合することが示された(図 8)。

③ AhR 転写活性に及ぼすエクイレニンの影響  
次に、AhR による転写をエクイレニンが活性化するかどうかをルシフェラーゼアッセイによって調べた。図 9 にベンゾピレンを HepG2 細胞に添加した場合と、エクイレニンを添加した場合とを示す。エクイレニンは 10 μM、30 μM 濃度で、AhR 依存の転写を活性化することが明らかとなった。

④ リガンド親和性の異なる AhR を有するマウスにおけるエクイレニンの Cyp1A サブファミリー誘導能

C57BL と DBA2 マウスの AhR には遺伝的多形が存在する。C57BL の有する AhR に比べて DBA2 マウスでの AhR では、リガンド親和性が低く、CYP1A サブファミリー誘導能に系統差が見られることが分かっている。エクイレニンを C57BL 及び DBA2 マウスに経口投与し、CYP1A サブファミリーの代謝活性の指標となるエトキシレゾルフィン脱エチル化(EROD)活性を肝ミクロソームを用いて測定したところ、その活性誘導に系統差は見られなかった(図 10)。

⑤AhR ノックアウトマウスにおけるエクイレニンの CYP1A サブファミリー誘導能

そこで、次に AhR ノックアウトマウスを用いて、エクイレニン曝露による CYP1A 誘導への影響を調べた(図 11)。AhR を欠損している-/-ホモマウスでも、AhR+/+の wild type や AhR+/-ヘテロマウスと同様、エクイレニン投与で肝ミクロソームにおける EROD 活性が上昇することが明らかとなった。ウェスタンブロッティング科遺跡からは、エクイレニン曝露によって発現が誘導される P450 分子種が CYP1A2 であることが示された。

D. 考察

(1) ベンゾピレン曝露によって変動する血液中の mRNA のスクリーニングと同定

ベンゾピレンによる曝露で、血液中に P450 を含め、発現が上昇する遺伝子群が同定された。AhR 標的遺伝子として報告された Bax などの既知の遺伝子群の他、リンパ球増殖に関与する遺伝子が新規に同定された。

(2) 妊娠期の異物代謝能の変動

EROD 活性や p ニトロフェノールグルクロン酸抱合活性は、いずれも 3 メチルコラントレンなどの AhR リガンドに曝露されることで上昇することが報告されている。しかし、今回の実験では、その誘導度は非妊娠ラットにくらべて、妊娠ラットでは弱いことが明らかとなった。両酵素活性は、いずれも、AhR によって発現を調節されている CYP1A1、UGT1 がその代謝を担っており、妊娠期では、AhR による異物代謝酵素の発現誘導にホルモンなどの影響があることが考えられた。

(3) エストロゲン類が AhR 機能に及ぼす影響

3-1) 17 $\beta$  エストラジオールによる CYP1A1 誘導阻害

エストロゲン受容体は、AhR との相互作用が報告されており、共役因子のリクルートの競合拮抗などによって、その作用を阻害し合うことが示唆されている。今回の結果では、HepG2 細胞では 17 $\beta$  エストラジオールの存在下でも、ベンゾピレンによる CYP1A1 誘導に影響は見られなかった。しかし、エストロゲン受容体が豊富に存在するヒト乳癌由来 MCF-7 細胞では、CYP1A1 はエストロゲン共存下でベンゾピレンによる CYP1A1 誘導度が顕著に抑制された。エストロゲン依存性に活性化される EGF や IGF-I などの成長因子は、CYP1A1 発現レベルを抑制することが報告されているが、今回の実験で、MCF-7 細胞にこれら成長因子とベンゾピレンと同時に曝露しても、CYP1A1 発現量に変化は認められなかった。

一方で、同じく AhR によってその発現が調節されている CYP1B1 は、エストロゲン共存によって mRNA 発現誘導に影響が見られなかった。CYP1B1 のプロモーター領域と CYP1A1 プロモーター領域では、それぞれ AhR 結合配列の XRE (xenobiotic response element) や Sp1 結合配列は存在する。しかし、CYP1A1 プロモーター領域に NF-1 結合サイトが存在するのに比べて、CYP1B1 プロモーター領域では、NF-1 結合領域が存在しないことが報告されている。プロモーター領域の違いによって、エストロゲンによる AhR 機能の抑制的作用が異なっていることが示唆された。

3-2) エクイレニンが CYP1A サブファミリーに及ぼす影響

図 5、6 に、エストロゲン類および AhR のリガンドとなる化合物の構造式を示す。エクイレニンは、雌性ホルモンであるエストロンやエストラジオールとは異なり、2 重結合を含む隣り合った二つの環構造を持つことにより平面構造をとることが示唆される。エストロン、エストラジオールはコレステロールを出発点として、様々な



P450 分子種やステロイド水酸化酵素群によって生合成される。一方で、不飽和型 B 環を持つエクイレニンなどは、コレステロールやスクワレンを経由せずに生合成される。

競合実験やレポーターアッセイから、高濃度域において、エクイレニンは AhR に直接結合し、XRE 転写活性化能を有することが分かった。HepG2 細胞では、リアルタイム RT-PCR によって、CYP1A1 mRNA の発現レベルが上昇することも明らかとなった。

DBA2 は多環芳香族・低感受性、C57BL は多環芳香族・高感受性マウスであるが、エクイレニン曝露によって両系統のマウスの肝臓では、ともに、CYP1A サブファミリー依存の EROD 活性が同程度に上昇した。また、AhR ノックアウトマウスにエクイレニンを投与したところ、EROD 活性が上昇することが明らかとなった。ウェスタンブロットング解析から、AhR ノックアウトマウスにおける EROD 活性上昇は、CYP1A1 発現の増加に依存するのではなく、CYP1A2 の発現レベルが上昇する為であることが明らかとなった。従って、エクイレニンは、高濃度では AhR に直接結合することでその標的遺伝子である CYP1A1 の転写を活性化、一方で、エクイレニンは AhR 非介在性にも CYP1A2 の転写を活性化することが明らかとなった。

不飽和型 B 環エストロゲンはエストロゲン補充療法に用いられており、臨床的には長期投与が想定されている。しかし、エクイレニンが AhR への結合性及び、CYP1A サブファミリーの発現誘導能を有することが今回の実験において示されたことから、発癌リスクの観点から、より詳細な検討が必要であると考えられる。

## 5. 結論

ベンゾピレンを曝露した実験動物の血液をスクリーニングしたところ、mRNA 発現レベルの変動する遺伝子群を同定することが出来た。

実験動物を用いた実験系から、妊娠期の母親の肝臓では、P450 やグルクロン酸抱合酵素などの異物代謝酵素群の誘導が抑制されることが明らかとなった。また、AhR によって発現が調節されている P450 分子種は、内因性及び外因性のエストロゲン類が、その作用に影響を及ぼすことが明らかとなった。

## F. 健康危険情報

妊娠期では、通常の医薬品や環境汚染物質の曝露に際して、そのエリミネーションが遅れる可能性が考えられた。また、エストロゲン類の曝露によって AhR によって調節されている P450 発現量に変化が現れたことから、ステロイド薬剤投与や、生理的ホルモン濃度の変化によっても、生体にとり込まれた薬物や環境汚染物質の代謝・排泄速度が変化する可能性が考えられた。

## G. 研究発表

### (1) 論文発表

Sakamoto QK, Kunise T, Watanabe M, Masuda Y, Iwata H, Tanabe S, Akahori F, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Accumulation patterns of polychlorinated biphenyl congeners and organochlorine pesticides in Steller's sea eagles and White-tailed sea eagles, threatened species, in Hokkaido, Japan. *Environ Toxicol Chem.* (in press)

Chiba I, Sakakibara A, Iwata H, Tanabe S, Kazusaka A, Fujita S. Hepatic microsomal cytochrome P450s and chlorinated hydrocarbons in largha and ribbon seals from Hokkaido, Japan: Differential response of seal species to Ah receptor agonist exposure. *Environ Toxicol Chem.* (in press)

Maruyama Y, Suzuki Y, Kazusaka A, Fujita S. Uptake of the dopaminergic neurotoxin, norsalsolinol, into PC12 cells via dopamine transporter. Archives of toxicology. 2001 75(4):209-13.

Teraoka H, Maruyama Y, Takehana K, Iwanaga T, Hiraga T, Fujita S, Ohta T. Ca(2+) signaling in porcine duodenal glands by muscarinic receptor activation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2001 280(4):G729-37.

Maruyama Y, Suzuki Y, Kazusaka A, Fujita S. Norsalsolinol uptake into secretory vesicles via vesicular monoamine transporter and its secretion by membrane depolarization or purinoceptor stimulation in PC12 cells. J Vet Med Sci. 2001 63(5):493-7.

Chiba I, Sakakibara A, Goto Y, Isono T, Yamamoto Y, Iwata H, Tanabe S, Shimazaki K, Akahori F, Kazusaka A, Fujita S. Negative correlation between plasma thyroid hormone levels and chlorinated hydrocarbon levels accumulated in seal from the coast of Hokkaido, Japan. Environ Toxicol Chem. 2001 20(5):1092-7.

Fujita S, Chiba I, Ishizuka M, Hoshi H, Iwata H, Sakakibara A, Tanabe S, Kazusaka A, Masuda M, Masuda Y, Nakagawa H. P450 in wild animals as biomarker of environmental impact. Biomarkers 2001 6(1):13-25

Yamamoto H, Watanabe T, Mizuno H, Endo K, Fukushima J, Hosokawa T, Kazusaka A, Fujita S. The antioxidant effect of DL-alpha-lipoic acid on copper-induced acute hepatitis in

Long-Evans Cinnamon (LEC) rats. Free Radic Res. 2001 34(1):69-80.

Yamamoto H, Watanabe T, Mizuno H, Endo K, Hosokawa T, Kazusaka A, Gooneratne R, Fujita S. In vivo evidence for accelerated generation of hydroxyl radicals in liver of Long-Evans Cinnamon (LEC) rats with acute hepatitis. Free Radic Biol Med. 2001 30(5):547-54.

Maruyama Y, Teraoka H, Iwata H, Kazusaka A, Fujita S. Inhibitory effects of endogenous dopaminergic neurotoxin, norsalsolinol on dopamine secretion in PC12 rat pheochromocytoma cells. Neurochem Int. 2001 38(7):567-572.

## (2) 学会発表

1) 131回日本獣医学会(平成13年春)

① 北海道の野生動物における化学物質汚染の状況について

② 核内レセプター ppar を介した環境ホルモンによる内分泌系への影響

③ 藤沢市、引地川水系ダイオキシン汚染事件がコイの異物代謝酵素に及ぼした影響

④ 野生エンヤチネズミの有する異物代謝酵素と棲息域の環境汚染との関係

⑤ 妊馬ホルモン、Equilenin による異物代謝酵素の誘導

⑥ 水混合溶媒・アセトンによるラット肝ミクロソーム異物代謝酵素反応系への溶媒効果

2) 第133回日本獣医学会(平成14年春)

① 妊馬ホルモン・Equilenin による異物代謝  
酵素の誘導

② A novel endocrine disrupting systems of  
Di-n-butyl phosphate (DBP) via PPAR  
subfamilies

② マウス海馬におけるビスフェノール A 投与  
の影響

3) 第28回日本トキシコロジー学会学術年会

① Equilenin による異物代謝酵素の誘導

② 内因性ドパミン神経毒 (norsalsolinol) のP  
C12細胞における細胞内動態

③ Induction of CYP1A1 by equine estrogen,  
equilenin

④ Intracellular dynamics of endogeneous  
dopaminergic neurotoxin,  
Norsalsolinol in PC12 cells

4 ) The 9th international congress of  
toxicology, Brisbane, Australia

① Real-time PCR of rat liver cytochrome  
P450 1A1: Modulation by Suda  
III and retinoic acid

② In vivo evidence for accelerated generation  
of hydroxyl radicals in liver of Long-Evans  
cinnamon (LEC) rats with acute  
hepatitis

5) 北海道薬物作用談話会

① ラット肝ミクロソームにおけるジアゼパム代  
謝の系統差

6) 環境ホルモン学会 第4回研究発表会

① Environmental monitoring by using  
cytochrome P450 of wild voles,  
Clethrionomys rufocanus

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

表 1: マイクロアレイ解析結果: ベンゾピレン投与後に発現レベルが上昇する血液中mRNA

種類	遺伝子数
Aspartic Proteases	2
Basic Transcription Factors	1
Bcl Family Proteins	2
Calcium-Binding Proteins	1
Cell Cycle-Regulating Kinases	1
Cell Surface Antigens	1
Complex Lipid Metabolism	2
Energy Metabolism	1
G Protein-Coupled Receptors	2
G Proteins	3
Growth Factor & Chemokine Receptors	2
Growth Factors, Cytokines & Chemokines	2
Hormone Receptors	2
Intracellular Kinase Network Members	1
Intracellular Protein Phosphatases	1
Intracellular Transducers, Effectors & Modulators	1
Neurotransmitter Receptors	1
Nuclear Receptors	1
Oncogenes & Tumor Suppressors	1
Other Intracellular Transducers, Effectors & Modulators	2
Other Membrane Channels & Transporters	1
Other Receptors (by Ligands)	3
Other Trafficking & Targeting Proteins	2
Phospholipases & Phosphoinositol Kinases	1
Serine Proteases	1
Symporters & Antiporters	3
Voltage-Gated Ion Channels	3