

される可能性がある。

C. 2. 実験環境等の汚染状況

下記の試薬・実験器具より、汚染が確認された。

- ・ セプタム：メタノールのブランク分析をした際、9.7 ppb の NP が検出された。そのため、NP の残留していない Agilent 社製 Screw cap septa (5182-0729) を使用することにした。
- ・ β -グルクロニダーゼ試薬 [*E. coli* β -glucuronidase (89 U/ml; Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland)]: OP が 0.1 ppb 以下で検出された。そのため、OP に関する定量限界値を 0.3 ppb 以上として測定を実施した。
- ・ 精製水: NP が 0.2 ppb 程度検出されるものがあった。そのため、NP の測定には、検出限界以下となるものを用いることとした。
- ・ 固相抽出用カートリッジ：メタノールで洗浄した溶液を測定した場合、3.5 ppb 程度の NP が検出された。そこで、洗浄量を増やすことにより、検出限界以下となった。
- ・ 採取器具：一部の血液採取器具より、NP が残留することが報告されている。そこで、実際の採血や保存器具に関して、NP などの含まないものを使用するようにした。

C. 3. 新規分析手法の構築

【LC/MS 法を用いたヒト尿中 NP 及び OP の分析】

カラムスイッチング-LC/MS 法を用

いて、ヒト尿中 NP 及び OP の分析を検討した。本検討に用いた内標準物質を図 1 に示す。また、システム全体図を図 2 に、分析結果のクロマトグラムを図 3 に、各種分析条件及び添加回収実験結果を Table 1-3 に示す。いずれも良好な結果を得ることができた。

【GC/MS 法を用いたヒト尿及び血清中 NP 及び OP の分析】

Stir Bar Sorptive Extraction-加熱脱着 GC/MS 法を用いて、ヒト尿及び血清中の NP 及び OP の分析を行った。本分析結果のクロマトグラムを図 4 に示す。また、尿及び血清における添加回収試験の結果を Table 4 に示す。いずれも良好な結果を得ることができた。

D. 考察

本研究では、NP 及び OP のヒト生体試料などの分析ガイドライン作成に伴う基礎的な検討を実施した。暴露要因の追求やその汚染状況を検討した上で、高感度分析手法が要求されることが分かった。従来の環境モニタリングに利用されている分析手法では、多量の試料があることが前提であり、その後、誘導体化などの煩雑な作業が必要となる。その一方で、生体試料を対象とした分析法では、可能な限り前処理などの手間をかけず、高感度な測定が求められる。そこで、新規分析手法を構築し、生体試料へ応用することが可能であった。この方法を更に追求し、マニュアル化することにより、ガイド

ラインとすることが達成できると思われる。

E. 結論

NP 及び OP などの暴露要因は、食事由来が十分に考えられた。そこで、実際に NP 含有するラップフィルムを用いて、自由に食事に利用した後の尿を分析対象とした。その結果をまとめたものを、Table 5 に示す。ボランティア 10 名 (A-J) の健常人の尿は、1 人 (0.96ppb) を除き、すべて検出限界以下であった。一方、前述の食事を行った後 (Case 2) では、100ppb と高濃度で検出された。この結果は、一時的な暴露であるが、生体内に取り込まれたことを尿を分析することで解明できると考えられる。成人では、フィードバック機構や速やかな代謝機構などにより大きな生体影響は受けないものと思われるが、胎児や小児などでは、内分泌系などへの影響は受けるものと危惧される。結論としては、更に多数の健常人、妊婦、小児などの生体試料をモニタリングする必要性が十分にあり、来年度以降継続して、研究を推進しなければならない。

また、本研究で得られた分析化学的知見を参考に、最新の分析法の発表を考慮して当該化学物質の生体試料の微量分析法ガイドラインを構築する作業を継続する必要がある。

参考文献及び参考資料

1) A. M. Soto, H. Justicia, J. W. Wray,

- C. Sonnenschein, *Environ. Health Perspect.*, 92, 167-173 (1991)
- 2) R. White, S. Jobling, S. A. Hoare, J. P. Sumpter, M. G. Parker, *Endocrinology* 135, 175-182 (1994)
- 3) T. Niwa, Y. Maekawa, M. Fujimoto, K. Kishimoto, Y. Yabusaki, F. Ishibashi, M. Katagiri, *Biolog. Pharm. Bull.*, 25, 235-238 (2002)
- 4) K. Nakazawa, Y. Ohno, *European J. Pharm.*, 430, 175-183 (2001)
- 5) S. Nakajin, S. Shinoda, S. Ohno, H. Nakazawa and T. Makino, *Environ. Toxicol. Pharm.*, 10, 103-110 (2001)
- 6) K. Inoue, Y. Yoshimura, T. Makino, H. Nakazawa, *Analyst* 125, 1959-1961 (2000)
- 7) S. Müller, P. Schmid, C. Schlatter, *Environ. Toxicol. Pharm.*, 6, 27-33 (1998)
- 8) S. Nemoto, S. Takatsuki, K. Sasaki and M. Toyoda, *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, 41, 377. (2000)
- 9) K. Inoue, S. Kondo, Y. Yoshie, K. Kato, Y. Yoshimura, M. Horie, H. Nakazawa, *Food Addit. Contam.* 18, 157-164 (2001)
- 10) K. Inoue, Y. Yoshie, S. Kondo, Y. Yoshimura, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. A* 946, 291-294 (2002)
- 11) R. A. Rudel, J. G. Brody, J. D. Spengler, J. Vallarino, P. W. Geno, G. Sun and A. Yau, *J. Air Waste Manag. Assoc.*, 51, 499-513 (2001)
- 12) K. Inoue, H. Okumura, T. Higuchi,

H. Oka, Y. Yoshimura, H. Nakazawa,
Clin. Chim. Acta 325, 157-163
(2002)

学会発表

第5回内分泌かく乱化学物質学会（環境ホルモン学会）：・ヒト尿中のノニルフェノール及びオクチルフェノールの分析 (Determination of 4-Nonylphenols and 4-Octylphenol in Human Urine by LC/MS) 井之上浩一、川口研、岡田文雄、吉村吉博、中澤裕之(星薬大)、堀江正一(埼玉衛研)、岡尚男(愛知衛研)、和泉俊一郎、牧野恒久(東海大・医)

発表論文

1) Koichi Inoue, Yoshihiro Yoshimura, Tsunehisa Makino and Hiroyuki Nakazawa “Determination of 4-nonylphenol and 4-octylphenol in human blood samples by high-performance liquid chromatography with multi-electrode electrochemical coulometric-array detection” *The Analyst* 125, 1959-1961 (2000)

2) Koichi Inoue, Sachiko Kondo, Yuriko Yoshie, Kayoko Kato, Yoshihiro Yoshimura, Masakazu Horie and Hiroyuki Nakazawa “Migration of 4-nonylphenol from polyvinyl chloride films for food-wrapping into food simulants and foods.” *Food Additives &*

Contaminants 18, 157-164 (2001)

3) Koichi Inoue, Migaku Kawaguchi, Fumio Okada, Natsuko Takai, Yoshihiro Yoshimura, Masakazu Horie, Shun-ichiro Izumi, Tsunehisa Makino and Hiroyuki Nakazawa “Measurement of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol in human urine by column-switching LC/MS coupled with on-line extraction” *Analytica Chimica Acta*, in press

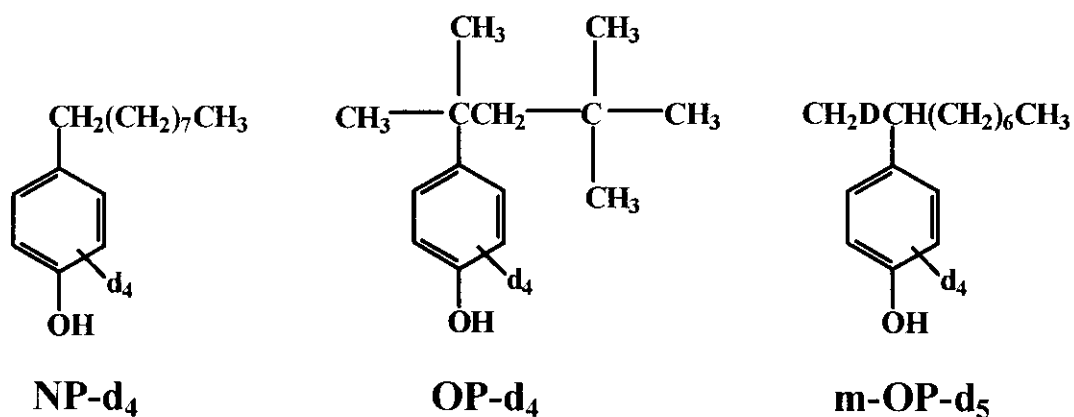


图 1 Structures of stable isotopically labeled internal standards.

NP-d₄: 4-n-nonylphenol · 2,3,5,6-d₄

OP-d₄: 4-tert-Octylphenol · 2,3,5,6-d₄

m-OP-d₅: 4-(1-methyl) octylphenol-d₅

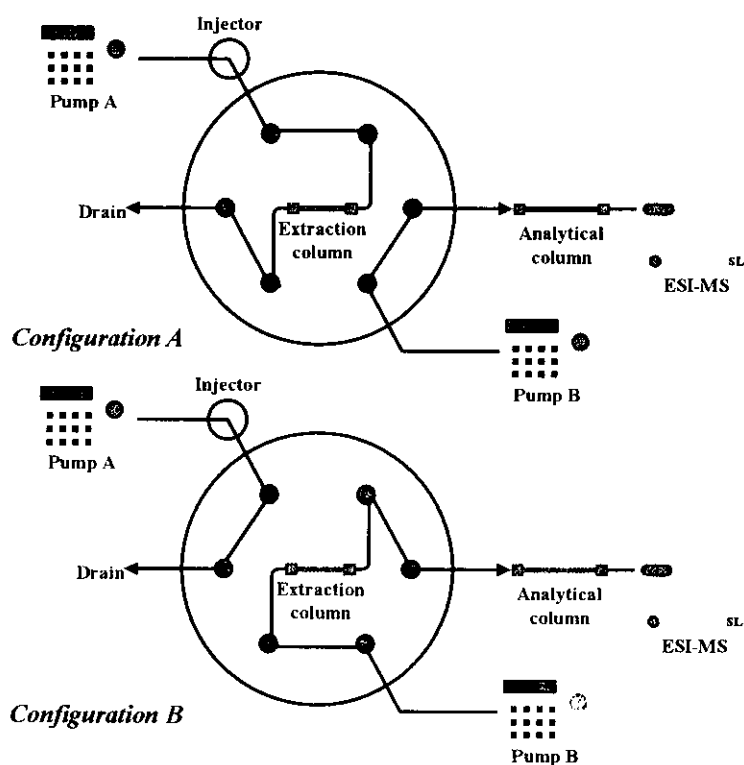


图 2 Schematic representation of the column-switching LC/MS system. LC/ESI-MS was performed using an Agilent 1100 MSD-SL system (Pump B + ESI-MS). Sample preparation system was performed using a Shimadzu LC-10AS pump (Pump A).

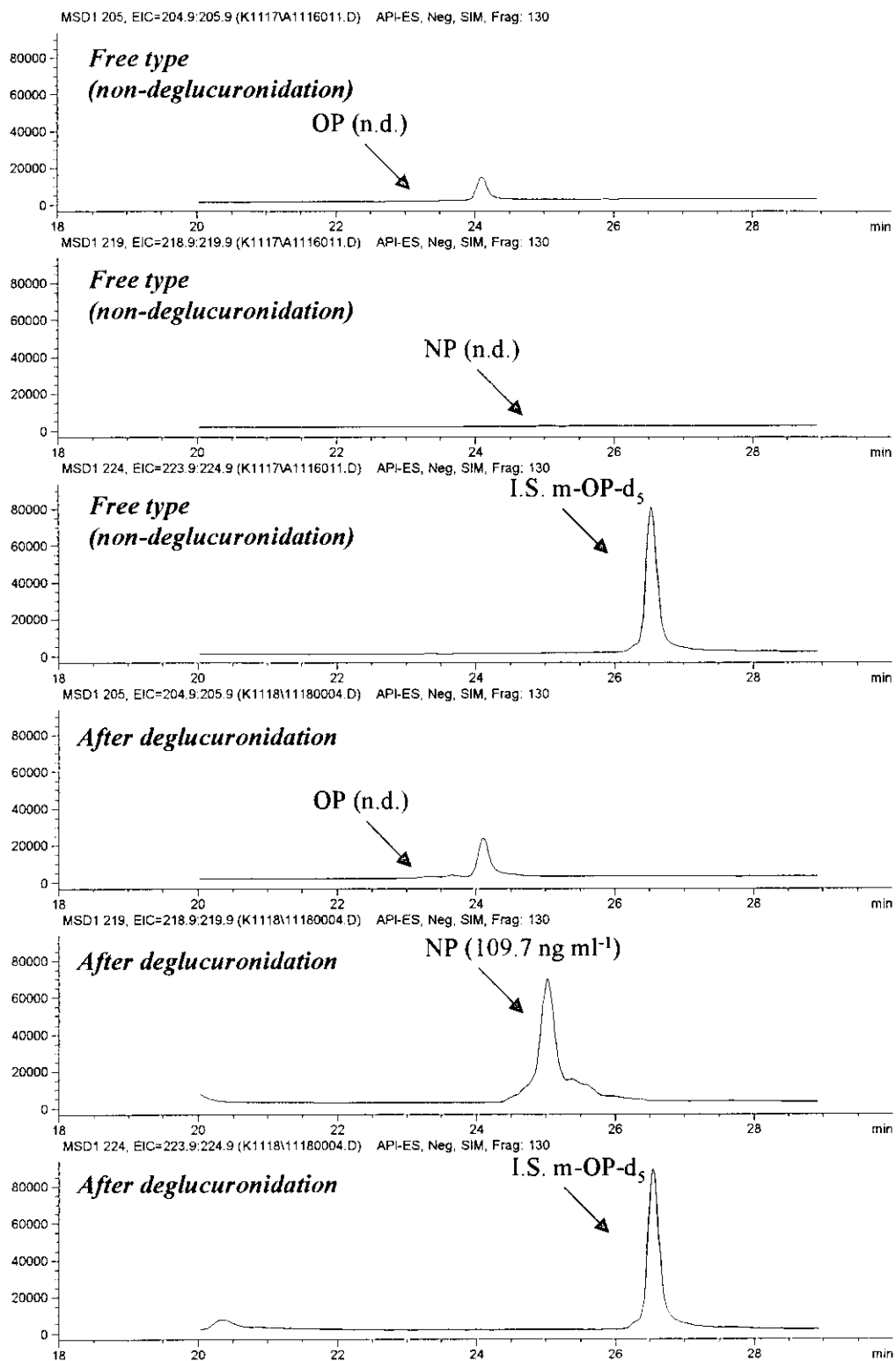


图 3 Chromatograms of OP, NP and internal standard (4-(1-methyl) octylphenol-d₅: m-OP-d₅) in human urine sample

アバンドンス

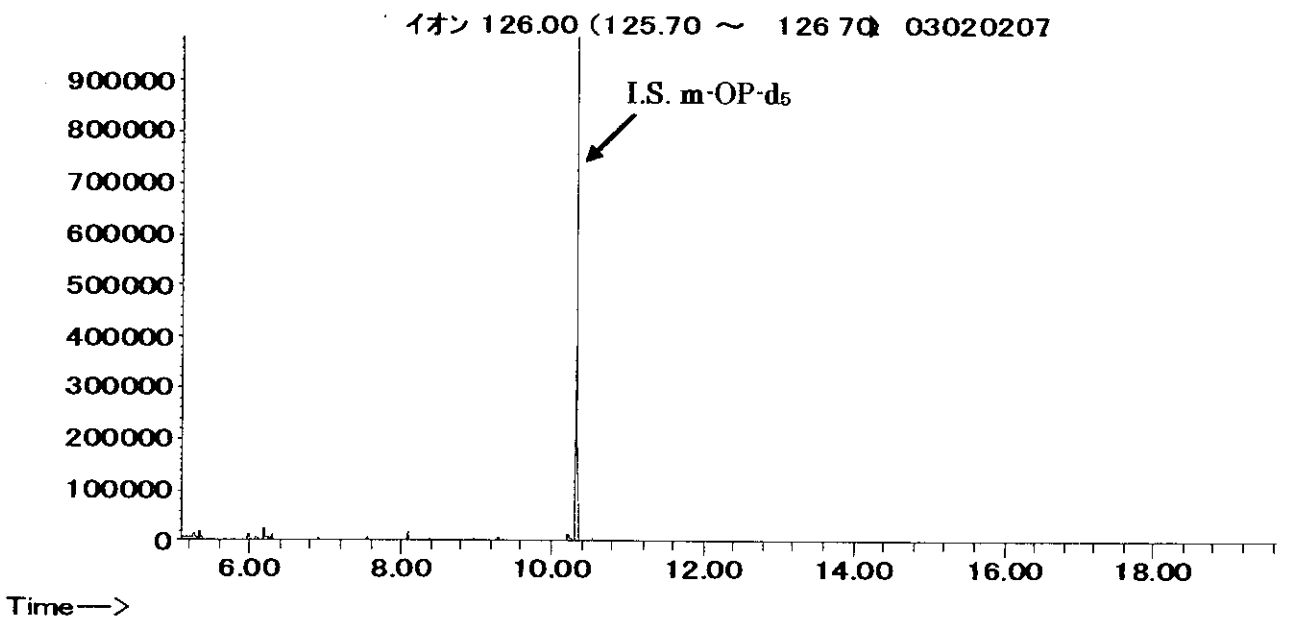
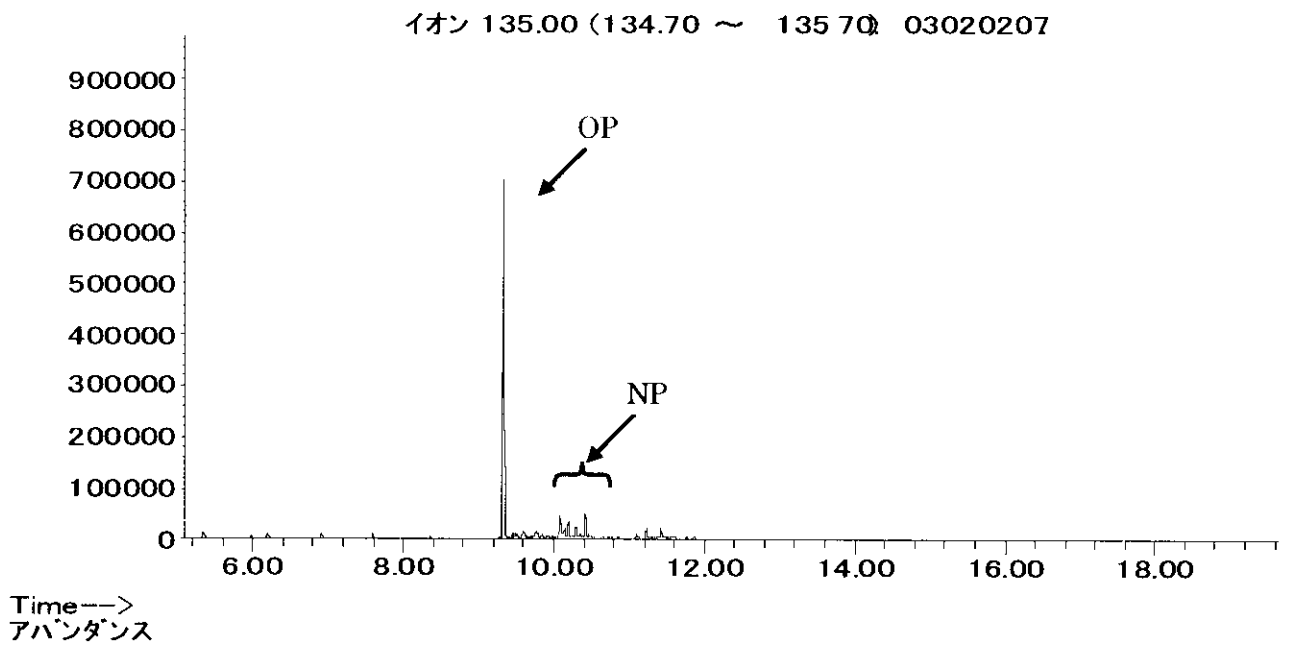


図 4 GC/MS Chromatograms of OP, NP and internal standard (4-(1-methyl) octylphenol-d5: m-OP-d5) in human urine sample

Table 1 Ions monitored (m/z) for the determination of standards and stable isotopically labeled internal standards

Compound		Quantitation ion (m/z)	
4- <i>tert</i> -Octylphenol	OP	[M-H] ⁻	205
4-Nonylphenol	NP	[M-H] ⁻	219
4- <i>tert</i> -Octylphenol – 2,3,5,6-d ₂	OP-d ₄	[M-H] ⁻	209
4- <i>n</i> -Nonylphenol – 2,3,5,6-d ₄	NP-d ₄	[M-H] ⁻	223
4-(1-Methyl) octylphenol-d ₅	m-OP-d ₅	[M-H] ⁻	224

Table 2 Validation data of column-switching LC/MS system

Compound	Retention time (min)	Detection limit (S/N=3) (ng ml ⁻¹)	Quantitation limit in urine (ng ml ⁻¹ urine)	Calibration curve*
				(<i>r</i>) [0.2 - 100 ng ml ⁻¹]
4- <i>tert</i> -Octylpheno (OP)	23.3	0.05	0.3	0.999
4-Nonylphenol (NP)	25.0	0.1	0.3	0.999

*: Peak area ratios with respect to standard and m-OP-d₅ internal standard (retention time :26.5 min) were plotted.

Table 3 Recovery levels of OP and NP levels in human urine sample spike the stable isotopically labeled internal standard (I.S.)

Spike amount (ng ml ⁻¹)	I.S.	NP: Average* (RSD)		OP: Average* (RSD)	
		NP-d ₄	m-OP-d ₅	OP-d ₄	m-OP-d ₅
1.0		51.7 (3.9)	97.0 (4.1)	101.4 (2.4)	96.2 (3.3)
5.0		51.9 (3.4)	85.5 (1.7)	99.1 (3.3)	99.6 (1.1)

*: Background levels in the unspiked urine can be neglected (S/N <3). N = 6.

Table 4 Recoveries of NP and OP levels in spiked human biological samples

Compound	Spike amount (ng ml ⁻¹)	Urine		Plasma	
		Recovery (%)	RSD (%) [*]	Recovery (%)	RSD (%) [*]
NP	0.5	98.5	1.6	98.1	2.5
	10	99.8	2.6	99.2	3.2
OP	0.5	98.1	1.5	95.8	3.0
	10	99.1	3.9	96.5	2.9

^{*}The recoveries and precision were also examined by replicate analysis (n = 6) of human biological samples fortified at the 0.5 and 10 ng ml⁻¹ level.

Table 5 Concentrations of OP and NP in urine samples from volunteers.

Volunteer	Case	Old	Creatinine (mg dl ⁻¹)	OP ^a (ng ml ⁻¹)		NP ^b (ng ml ⁻¹)	
				none	β-glucuronidase	none	β-glucuronidase
A		20	9.14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
B		23	11.7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C		23	10.3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
D		21	30.4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
E		24	10.1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
F		22	2.69	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
G		22	12.7	n.d.	n.d.	n.d.	0.96
H	1	23	5.48	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	2 [*]		13.9	n.d.	n.d.	n.d.	109.7
I	1	28	13.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	2 [*]		9.02	n.d.	n.d.	n.d.	15.9
J	1	26	10.4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	2 [*]		8.99	n.d.	n.d.	n.d.	110.9

^a: n.d. indicates OP concentrations lower than 0.3 ng ml⁻¹

^b: n.d. indicates NP concentrations lower than 0.3 ng ml⁻¹

^{*}: These volunteers had taken a meal of rice or meat wrapped in PVC film.

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）

分担研究報告書

試料分析の信頼性確保と生体暴露量のモニタリングに関する研究

環境中の内分泌かく乱物質の胎盤機能と胎児発生における影響

分担研究者：塩田 邦郎 東京大学教授
研究協力者：横田 博 酪農学園大学助教授

研究要旨

胎児期の内分泌かく乱化学物質の作用を解析するためには、母体・胎盤・胎児における化学物質の代謝解毒反応を詳細に明らかにすることが求められる。そこで我々はラットおよびマウスを用い、化学物質の妊娠期での代謝、および、内分泌かく乱物質による胎盤形成への影響を明らかにする事を目的とした研究をおこなった。その結果、子宮組織が薬物のバリアーとして機能していることが示唆されるとともに、フタル酸エステルが胎盤構成細胞の分化に影響を及ぼす可能性が示された。

A. 研究目的

妊娠期母体の内分泌かく乱物質への暴露による、胎児への不可逆的影響が心配されている。そのため、内分泌かく乱物質の作用を解析する上で、母体・胎盤・胎児における代謝解毒反応を詳細に明らかにすることが求められている。特に、子宮および胎盤は最も重要な胎児への薬物暴露バリアーであるので、それらの器官形成・機能発現への内分泌かく乱物質の影響や、そこでの代謝解毒反応を中心とした研究が重要である。そこで本研究では、子宮、胎盤および胎児における内分泌かく乱物質の代謝を行う酵素について、その発現と機能の解析を行い、母体から胎盤・胎児への内分泌かく乱物質の移行についての知見を得ることを第一の目的とした。第二に、フタル酸エステルである Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) を例にとり、その妊娠母胎への投与が胎盤形成におよぼす影響を明らかにすることを目的に、in vivo, in vitro 両面の解析を行った。

B. 研究方法

B-1 ラット子宮灌流系の確立

ラット子宮の一部を切除し、両端を結紮後、図1のように灌流液に浸した。1-ナフトールまたはビスフェノールAを子宮血管側（奨膜側）および子宮粘膜側から暴露し、経時的に灌流液中の代謝物をHPLCで分析した。

B-2 ラット臓器に発現する UDP-グルクロン酸抱合酵素 (UGT) の検出

ラット肝臓および子宮からマイクロゾームを調整し、UGT分子種特異抗体を用いたウェスタンブロッティング法により、発現する分子種の同定を行った。

B-3 DEHP の胎盤形成および胎児発生への影響の解析

妊娠雌マウス (ICR 系統) の腹腔に、妊娠 6.5 日目および 7.5 日目の二度、体重 1kg 当たり 0, 0.2, 20 および 200 mg の DEHP を尾静脈注射した。その後、妊娠 8.5 日目に胎児を含む子宮脱落膜組織を採取し、組織学的解析に供した。

B-4 DEHP の胎盤細胞分化への作用の解析

0, 0.2, 20 および 200 μ g/ml の濃度の DEHP 存在下で栄養膜幹細胞 (TS 細胞) を培養し、増殖能および形態への影響の有無を検討した。

B-5 倫理面への配慮

本研究に用いられたマウス (東京大学) およびラット (酪農学園大学) の飼育・と殺は、各大学の動物実験実施規則を遵守して行われた。

C. 結果と考察

C-1 ラット子宮におけるビスフェノールAの代謝動態の解析

ラット子宮での灌流実験系の確立に成功した(図1)。この灌流系を用いてビスフェノールAの代謝を調べたところ、ビスフェノールAのグルクロン酸抱合体が生成され、漿膜側に排泄されることが分かった(図2)。また、UGT1A6でグルクロン酸抱合される1-ナフトールも同様の結果が得られた(図2)。この子宮灌流法を用いて、性周期でのビスフェノールAの解毒能の変化を調べたところ、発情前期が休止期に比べおよそ2倍高い活性を示した。なおその場合も、抱合体は母体側に排泄された(図3)。

C-2 ラット子宮での代謝解毒酵素活性の解析

これまで我々は、ビスフェノールAは、消化管と肝臓で大部分がグルクロン酸抱合されることを明らかにしてきた。本年度は主に子宮でグルクロン酸抱合している酵素分子種の検索をおこなった。免疫組織染色の結果、UGTはラット子宮内膜上皮細胞・子宮線および卵管上皮細胞に発現していた。この分子種の一つはUGT1A6であったが、肝臓でビスフェノールAの抱合を担っているUGT2B1は発現していなかった。分子種特異的抗体を用いて、ウエスタンブロッティングを行ったところ、ラット子宮にはUGT1A6の他に、肝臓では発現していない2Bファミリー分子種も発現しており、発情周期によって発現量が異なると予測された(図4)。UGT2B1は子宮内では発現していないので、ビスフェノールAをグルクロン酸抱合する分子種はこの中に存在すると思われる。

C-3 DEHPの胎盤形成および胎児発生への影響の解析

これまで、妊娠雌マウスへの投与実験やTS細胞培養系への添加実験により、ベンツピレンは直接は胎盤細胞の分化にほとんど影響を及ぼさないが、母体細胞でのレチノイン酸合成を増加させることにより、二次的な効果を及ぼす可能性があることを明らかにしてきた。これらの解析法にならい、DEHPの妊娠マウスへの投与実験を行った。その結果、低用量(0.2 mg/kg)投与群の一部で栄養膜巨

細胞の過形成が確認された(図5、表1)が、現時点で他の濃度における栄養膜巨細胞の明確な過形成は見られていない。これは、胎盤形成に影響を及ぼすDEHP濃度に上下の閾値が存在する可能性を示唆し興味深い。胎児の成長(サイズ、反転の有無)には、DEHP投与群と対照群との間で明確な差は見られなかった。

C-4 DEHPの胎盤培養幹細胞への作用の解析

未分化TS細胞へのDEHPの添加実験では、細胞の増殖能や形態に明確な影響は見られていない。

D. 結論

ラット子宮を用いた薬物灌流法の確立に成功し、ビスフェノールAは子宮上皮細胞に存在するUGTによってグルクロン酸抱合(解毒)された後、母体側に排泄される事を突き止めた。すなわち、子宮において薬物暴露に対するバリアーが存在し、胚の存在する子宮内部を守る機構が存在する事が分かった。また、妊娠雌マウスへのDEHP投与実験では、用量依存的な組織学的異常が見出された。これが直接の影響なのか、あるいは、母体細胞を介した間接的な影響なのかどうかを区別し、その作用機序を明らかにするために、分化を誘導したTS細胞培養系に各種濃度のDEHPあるいはその代謝産物であるMEHPを添加し、胎盤細胞の分化に対する作用を検討する予定である。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Inoue, H., Yuki, G., Yokota, H. and Kato, S. Bisphenol A Glucuronidation and Absorption in Rat Intestine. *Drug Metab Dispos* 31: 140-144, 2003.

2. 学会発表

- 1) Tomikawa, J., Yan, J., Ohgane, J., Hattori, J., Makino, T., Tanaka, S. and Shiota, K. Effect of benzo(a)pyrene on placentation. Society for the Study of Reproduction 35th Annual Meeting (平

成 14 年 7 月)

- 2) 松本順也、井上博紀、山舗直子、湯浅亮、横田博「ラット子宮に存在する内分泌攪乱化学物質抱合 UDP-glucuronosyltransferase の役割について」第 5 回環境ホルモン学会（平成 14 年 11 月）
- 3) 井上博紀、福島裕介、工藤聡子、横田博、翁長武紀、加藤精雄「雌ラット肝におけるビスフェノール A 動態の解明」第 5 回環境ホルモン学会（平成 14 年 11 月）
- 4) 佐々木聖史、結城豪、井上博紀、横田博、翁長武紀、加藤精雄「ラット肝および町に置けるビスフェノール A 動態の系統差」第 5 回環境ホルモン学会（平成 14 年 11 月）
- 5) 大江洋正、大道寺智、井上博紀、横田博、成川淳一、翁長武紀、加藤精雄「ラット精巣灌流法を用いた内分泌攪乱化学物質および植物エストロジェンの動態評価」第 5 回環境ホルモン学会（平成 14 年 11 月）

G. 知的財産権の出願・登録状況

該 当 な し

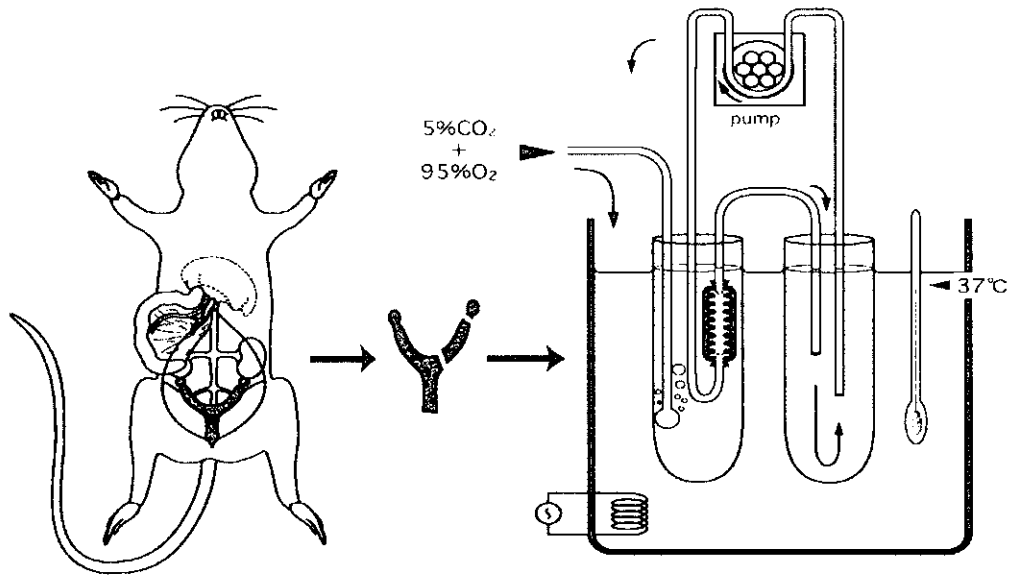


図1 ラット子宮灌流法模式図

子宮の一部を切除し、両端を結紮し、図のように灌流液に浸した。薬物を子宮血管側（漿膜側）および子宮粘膜側から暴露し、経時的に灌流液中の代謝物をHPLCで分析した。

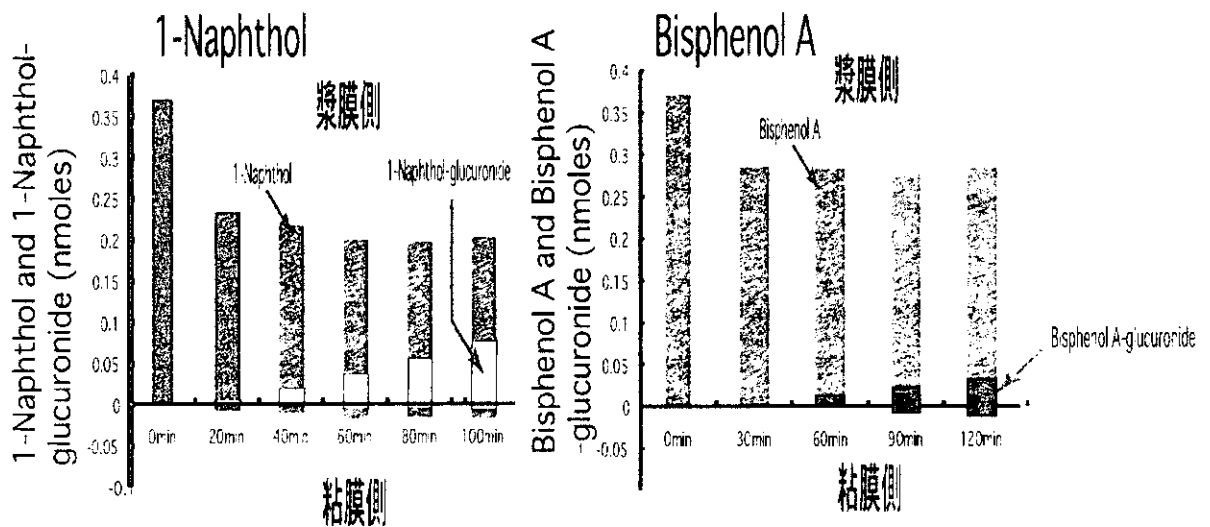


図2 子宮灌流後の1-naphthol およびBisphenol A 代謝物の定量結果

両薬物をどちらから暴露しても、グルクロン酸抱合されたのちに漿膜側に排泄された。

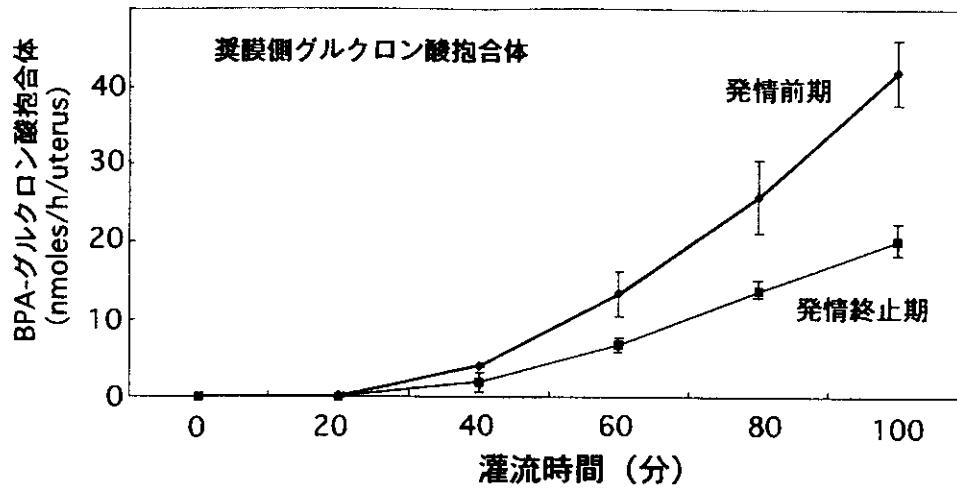
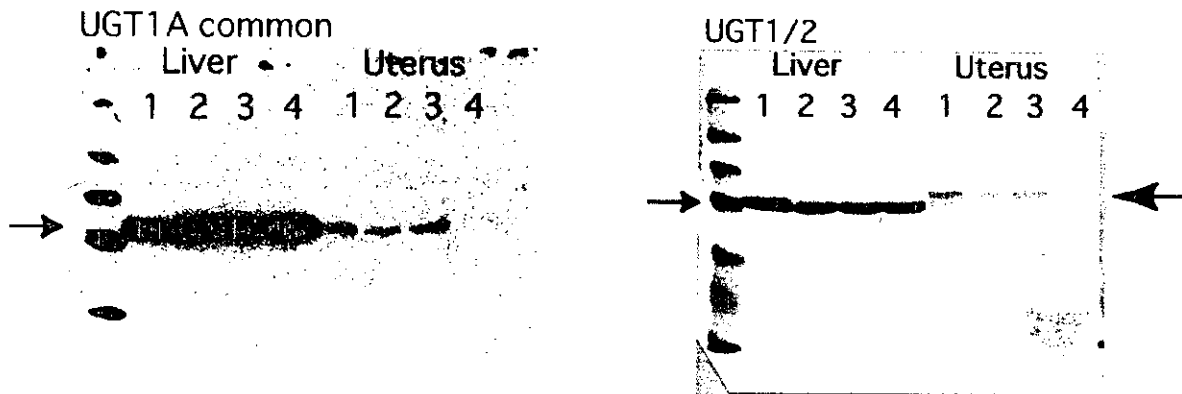


図3 ラット子宮 BPA 灌流による婁膜側グルクロン酸抱合体量
排泄されるグルクロン酸抱合体量は、発情期の方がおよそ2倍高かった。



*Ref ABB(1995) 324,267-272

図4 グルクロン酸抱合酵素 (UGT) のウエスタンブロッティング

ラット肝および子宮マイクロゾームを、UGT1Aファミリーを認識する抗体(左側)およびUGT全てを認識する抗体(右側)を用いて、ウエスタンブロッティングを行った。子宮マイクロゾームには肝にはない2B分子種と思われるバンドが検出された(右側)。UGT2B1は子宮内では発現していないので、Bisphenol Aをグルクロン酸抱合する分子種はこの中に存在すると思われる。発情休止期(Uterus lane4)に比べ発情期(Uterus lane1-3)にはその発現量が高かった。このことは灌流実験の結果(図3)と一致した。

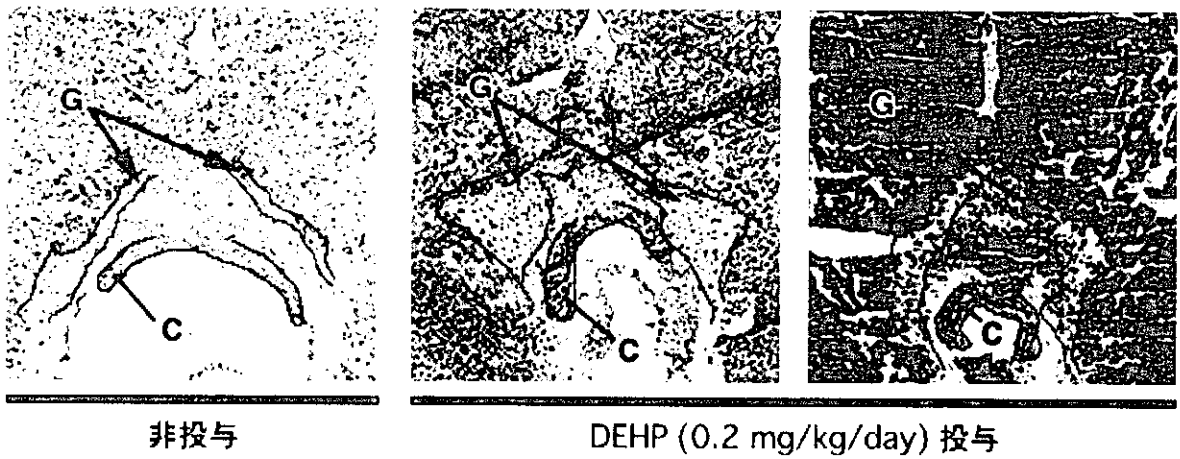


図5 DEHP 投与群に見られた栄養膜巨細胞層の過形成
 C, 絨毛膜 (chorion); G, 栄養膜巨細胞 (trophoblast giant cell) 層

表1 DEHP 投与による栄養膜巨細胞層過形成の頻度

投与量 (mg/kg)	腹あたり胎児数		解析した胎児数	巨細胞の過形成が認められた胎児
0	実験1	記録なし	3	0
	実験2	14	2	0
0.2	実験1	記録なし	3	2
	実験2	18	2	1
20	実験1	記録なし	3	0
	実験2	16	2	0
200	実験1	記録なし	3	0
	実験2	16	2	0

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Inoue, H., Yuki, G., Yokota, H. and Kato	Bisphenol A Glucuronidation and Absorption in Rat Intestine	<i>Drug Metab Dispos</i>	31	140-144	2003

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）

分担研究報告書

「試料分析の信頼性確保と生体暴露量のモニタリングに関する研究」

研究分担項目「内分泌かく乱化学物質に対する感受性に関与する遺伝子の解明」

分担研究者 木村 穰（東海大学医学部）

研究協力者 牧野 恒久（東海大学医学部）

研究協力者 和泉俊一郎（東海大学医学部）

研究要旨

疾患の発症は、一般に環境要因と遺伝要因によって決定されると考えられる。本研究では子宮内膜症をとりあげるが、この疾患においては内分泌かく乱化学物質が環境要因として深く関わっている状況証拠が集積しつつある。

疾患の発症に至る過程には代謝酵素調節を含む種々の細胞表面上あるいは細胞内の分子の状態が重要であると考えられ、本研究では本疾患の疾患感受性遺伝子として Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR), Estrogen Receptor (ESR) あるいはチトクロム、グルクロン酸抱合酵素の遺伝子 (CYP1A1) をとりあげ、それらの遺伝子多型を明らかにすると共に、子宮内膜症感受性のアレル（対立遺伝子）を分子遺伝学的、統計遺伝学的に求めることを最終目的として、試料解析の倫理面整備、DNA 試料解析系の確立を行った。

確立した DNA 解析系をもとに、本年度は患者 2 名を含む合計 10 名の日本人の試料を分析し、日本人特有の遺伝子多型存在の可能性が示唆された。

A. 研究目的

まず、本研究の研究背景について述べる。一般にヒト疾患は遺伝要因と環境要因によって規定されていると考えることができる。単一遺伝性疾患のレッシュナイハン症候群などの場合は遺伝要因が大きく寄与し、また、交通事故による骨折や脳挫傷などは物理的な外力つまり環境要因がその主たる原因である。子宮内膜症の場合、これまでの研究から内因性のエストロゲンで病状が進展すること、また、

その量を低減させる治療が有効であることが判明しており、内分泌かく乱物質は発症や病状を左右すると考えられる。しかし一方で、同一の環境条件下でもその反応性に個人差があることは良く経験されることであり、子宮内膜症の発症と内分泌かく乱物質の関係においても、一定の遺伝的素因がそこにからんでいるものと推測される。

以上より、本研究では子宮内膜症発症と内分泌かく乱物質の関係におい

て遺伝的な背景を明らかにし、発症機構の解明と治療法の開発に役立てることを最終的な目的とした。全ゲノムレベルで追跡する事も将来的には重要であると考え、ここでは疾患感受性候補遺伝子についての関連を明らかにし、データを集積する事を目指した。

選定した遺伝子は Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR), Estrogen Receptor (ESR)あるいはチトクロム、グルクロン酸抱合酵素の遺伝子(CYP1A1)であり、それらの遺伝子多型を明らかにすると共に、子宮内膜症感受性のアレル(対立遺伝子)を分子遺伝学的、統計遺伝学的に求めることを最終目的として、本年度は試料解析の倫理面整備、DNA 試料解析系の確立を目指した。

厚生行政面ではすぐに直接これらの研究が社会に役立つとは考えていないが、将来数百種もある内分泌かく乱物質の規制値や基準値を設定する際に、やはり個々人の感受性の差、つまり個人差を考えていくことはこの種の厚生行政にとっては非常に重要なことと考える。内分泌かく乱物質と深く関与すると疑われる子宮内膜症の遺伝的素因を探ることは、そのモデルケースとして環境要因と遺伝的素因の寄与の程度を検証するために大いに役立つ研究と考えられ、将来の厚生行政にとって重要な基礎研究である。

B. 研究方法

1. 上記 3 遺伝子 (AHR, ESR1, CYP1A1) の遺伝的多型箇所について、ヒトゲノムデータベースおよび多型解析データベース、また文献的な検索を行い、分析すべき DNA 多型の箇所を絞り込んだ。
2. 上記 3 遺伝子の遺伝的多型の解析法を確立するために、a)DNA 抽出方法、b)PCR 法のためのプライマー設定と実験的検討、また、c)PCR 産物の抽出法、d)Sequencing 方法の検討を行った。

まず、血液試料はインフォームドコンセントを取得した試料提供者から定法により血液採取。ただし、ヘパリンは以後の酵素反応に影響があるためクエン酸主体の採血管で平均 10ml の採血を行った。このうち 0.4ml を用い、カートリッジ (Qiagen 社) を使用して DNA を調製した。この方法が現在非常に安定して品質のよいゲノム DNA が得られる方法である。約 100 回分の PCR が行える回収量である。

PCR のプライマーをまず設定し、なるべく PCR 条件がどの遺伝子のどの箇所でも同様に行えるように配慮し、実験的に確かめた。現在 94℃30”、56℃40”、72℃1’ の条件で 30 回のサイクルを繰り返す条件を使用している。

PCR 産物はカートリッジ (Qiagen 社) を用いてプライマー

を除去し、その 100 分の 1 を Sequencing に使用した。Sequencer は ABI 者の機器を使用し、現在のところノイズを下げるために Sequencing 用の primer は PCR で使用したものとは別のものを使用しているが、将来的には同一のものを使用することも可能と思われる。

なお、プライマーの配列は図 1 に示す。

なお、本研究は遺伝子解析を含むため、3 省庁の指針に従い、東海大学医学部の医の倫理委員会での承認を得ると共に、試料提供者には十分な説明を行い、試料提供の同意書を得るよう十分に配慮した。採取する試料は、血液、毛髪、尿、患者腹水（検査に必須のもの）であることから、試料提供者に直接の不利益はほぼ皆無である。

当初、血液だけを暴露量測定材料と考えた「子宮内膜症に関与する遺伝要因の解明」と題する申請については伊医倫 02-037 号の承認を 2002 年 10 月 17 日に得たが、その後、本研究班の班会議において、人体の暴露量測定には尿や毛髪、また子宮内膜症の検査に必須の腹水も有効な試料となる可能性が示されたことから、再度変更申請を行い、伊医倫 02-053 号の承認を 2002 年 11 月 27 日に得た。このことから、本年度の研究用患者試料が得られるまでにはかなりの時間がかかってしまった。

一方この研究については、本大学医学部では情報管理、遺伝カウンセリン

グの体制も十分整えて万全を期している。

C. 研究結果

1. データおよび文献検索による解析箇所の選定。

AHR, *ESRI*, *CYP11A1* の 3 つの遺伝子は子宮内膜症との関連が疑われる遺伝子である。これらの遺伝子の一ヌクレオチド多型箇所 (SNPs) について、ヒトゲノムデータベースおよび多型解析データベース、また文献的な検索を行い、分析すべき DNA 多型の箇所を絞り込んだ。

現在、ヒトゲノムの SNPs についてはデータベースもかなり充実してきているが、逆に "suspected" と表現されている箇所も多く、実験的な証拠が怪しいものも少なくない。われわれが選定した基準は、少なくともこれまでにその SNP について、何人かの解析があって、ひどく偏りのない場所として報告があるものである。

たとえば *ESPI* の場合、実験的に確認されている箇所は 7 箇所あったが、そのうち 3 箇所は 93% から 98% の個人がホモ型である箇所であった。つまりこれらの箇所はあまり偏りが激しいため、相関解析にはあまり適さないということになる。このような検討を重ねた結果、*AHR*, *ESRI*, *CYP11A1* の 3 つの遺伝子において図 2 に示すように、それぞれ 3、4、2 箇所の SNPs 解析箇所を設定した。

2. プライマーおよび DNA 解析方法の

決定。

遺伝的多型の解析法を確立するために、a) DNA 抽出方法、b) PCR 法のためのプライマー設定と実験的検討、また、c) PCR 産物の抽出法、d) Sequencing 方法の検討を行った。詳しくは研究方法に述べているが、血液試料はクエン酸主体の採血管で平均 10ml の採血を行った。このうち 0.4ml を用い、カートリッジ (Qiagen 社) を使用して DNA を調製した。この方法は非常に安定して品質のよいゲノム DNA が得られる方法である。

PCR のプライマーをまず設定し、なるべく PCR 条件がどの遺伝子のどの箇所でも同様に行えるように配慮し、実験的に確かめた。その条件は 94°C 30"、56°C 40"、72°C 1' のサイクルを 30 回繰り返す方法である。ESR1 のイントロンや AHR についてはそれぞれ 3 箇所の多型が Sequence で一挙に解析できるようにプライマーをデザインした。PCR 産物はカートリッジでプライマーを除去し、1/100 量を Sequencing に使用した。

実際の Sequence パターンを図 3、図 4 に示す。これらは ESR1 遺伝子のエキソン 4 をかいせきしたものであるが、図中の矢印を見ると、図 3 は単一のピークになっているのに対し、図 4 の矢印部では 2 つのピークが重なった位置に観察される。図 3、図 4 は実際はカラーであるが、2 つのピークが同じ位置にある場合山の高さが余りに低いとノイズとの区別が容易でなくなる。したがって、一連の操作は

非常に精度が高いことが要求されている。

3. DNA 多型解析

2. で解析した一連のサンプルについてその結果を表 1 にまとめた。2 名の患者と 8 名の健常者であるので当然、相関解析を行うことや、統計遺伝学的解釈をするためには例数が少ない。したがって、これは今の解析システムが十分うまく機能していることを示すものである。

が、これだけのデータでも少し興味ある事実がわかる。ESR1 イントロン 1 の一番プロモーター寄りの SNP や AHR の 2 箇所では 10 例すべてが同じ塩基である。欧米人のデータと比較すると AHR の表の右側の G は欧米人でも同様に多く、左の C の部分は十分なデータがないが、ESR1 の右側の T は欧米人では約 50% に見出されている。このことは欧米人と日本人の SNP の分布が異なることを示唆している。

D. 考察

一般には現在のところ、内分泌かく乱化学物質が関わる疾患については、その外的要因としての内分泌かく乱化学物質そのものの解析に重点が置かれているため、まだ各疾患の発症にどのような遺伝的要因、あるいは疾患感受性遺伝子が関わっているかについてはほとんど注目されていないといってよい。したがって、その意味で本研究は独創的であり、先端的な研究であると考えられる。本研究のように特定の遺伝子を想定して遺伝子解析をす

る方法はある一面では関連性が出ない可能性もあるが、それぞれはそれなりの科学的根拠を持って抽出された遺伝子候補であることから、重要な知見をもたらすことは間違いなく、いずれはすべてが必要とされる、無駄のないデータとなっていく事が期待される。

ただ、今年度解析している3つの遺伝子以外にも多くの遺伝子が内分泌かく乱物質の代謝や感受性に関与している可能性もあり、メカニズムに迫るにはもう一段の工夫が必要となってくるであろう。

今後サンプル数を増やしていくことが重要となってくるが、今回の少数例でも一部のSNPに欧米人と日本人の分布差が出てきたことは、注目に値する。これは今後の解析で、やはり患者群、対照群ともに同じ日本人の集団を解析する必要性があることを示唆していると思われる。

厚生行政面の観点からは、最初に述べたとおり、これらの研究がすぐにあるいは直接的に社会に役立つとは考えていないが、最近ヒトゲノムが解析され、ポストゲノム研究が叫ばれる昨今、この種の研究を進めていくことは重要であり、もし種々の内分泌かく乱物質に共通の感受性要因あるいは感受性遺伝子が見つければ、非常に重要な知見となろう。

また、今回の結果からも、日本人集団の遺伝子の一塩基多型（SNPs）が欧米のものとは異なる点があり、この意味でも、日本人特有の健常者集団を

対象群として集め、今後比較検討することの重要性が再認識されたと考える。

E. 結論

今年度の主な成果は以下の4点と考える。

1. 子宮内膜症の患者や健常者の試料を暴露量の測定とDNA解析に用いるために倫理面の整備を行い、万全のものとした。
2. 子宮内膜症の疾患感受性候補遺伝子としてアрилヒドロカーボン受容体、エストロゲン受容体、チトクロム・グルクロン酸抱合酵素等の各遺伝子を対象として、多型部分を増幅するPCR系とそれに続く塩基配列決定のシステムを確立することができた。
3. 上記3遺伝子の遺伝的多型検討可能箇所は現在のところ9箇所中6箇所であった（患者群2名、対照群8名）。3箇所には今のところ多型が見出されていない。
4. 例数はまだ少ないが、日本人に特有の遺伝子型の分布も検出されている。このことは欧米のデータをそのまま日本人の集団に適用して議論することの危険性を示している。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表（関連するものを1つ挙