

られるパターンで健常者のパターンから著しく離れている), 及び C (健常者のパターンと変わらない) があり, その境界領域に, A と C の中間で油症タイプの B, さらに健常者と判別しかたい境界領域の BC の計 4 パターンに, 福岡県以外では A, B, C の 3 パターンに分類されている。これらのパターンは油症の原因物質である PCDF やコプラナー PCB によって引き起こされた PCB の異常代謝の結果であることかすてに明らかとなっている。一方, PCQ は PCDF と同様, PCB の加熱過程で生し, 油症原因油に混入した物質であるか, 動物を用いた毒性実験の結果から, 油症の直接の原因物質ではないと考えられている。しかし, 油症原因油に比較的高濃度に存在し, かつ, 体外排泄が困難で, 患者体内に長期に亘って残留することかわかったため, 1976 年に油症診断基準に加えられた。そこでの PCQ 濃度は“0.1ppb 以上”が異常に高い濃度, 0.02ppb (検出限界) 以下を通常見られる濃度, 0.09~0.03ppb かその両者の境界領域濃度と説明されている。近年, PCB の性状と PCB 濃度の関係についての検証はしばらく報告されておらず, 前回我々の関連報告¹⁾から, 約 10 年以上経過している。そこで, 現時点での状況について改めて検証した。

B 研究方法

1 血液試料 2002 年或いは 2003 年の油症一斉検診で, PCQ 及び PCB を

測定した県内在住の受診者血液 39 名, 及び, 県外在住受診者血液 26 名, 計 65 名の血液を対象とした。

2 PCB 及び PCQ 分析

2-1 PCB 分析

抽出・精製及び GC の分析条件 福岡医学雑誌(2003)に記載した方法²⁾で実施した。

2-2 PCQ 分析

抽出・精製 血液約 2.0g を正確に秤量し, 1.5N 水酸化カリウム/エタノールを 4mL 加えて, 90°C で 1 時間還流させた。冷後, ヘキサン 2mL で 2 回抽出し, ヘキサン層を別の試験管に分取後, 2mL の蒸留水で水洗した。ヘキサン層を無水硫酸ナトリウムカラムに通して脱水したのち, ヘキサン層を約 1mL 以下に濃縮後, 熱水処理及び 130°C で 3 時間活性化したフロリシル (Flordin 社製) 0.5g をパスツールピペットに充填し作製したミニカラムに負荷した。ついて, 5%エチルエーテル/ヘキサン 7mL で溶出させ, 集めた溶出液は, 窒素ガス気流下で濃縮乾固して, ヘキサン 2mL に再溶解した。これを, 10%発煙硫酸約 1mL 加えて攪拌し, 遠心分離し, 硫酸層を捨てた。この操作を硫酸相が色か着くかないまで繰り返し行った。ヘキサン層を任意深く, 5mL の反応管 (肉厚のアンブル) に移し, 窒素ガス気流下で濃縮乾固し, さらに 30 分間以上, 減圧乾燥器に入れ, 完全に乾燥させた。その後, 5 塩化アンチモン 0.5mL を加え, 反応管を封し, 200°C で 3.0 時間保持し

て完全塩素化した 冷後、開封し、クロホルム 2mL を加えて溶解させた
クロホルム層は 20%塩酸 (2.5mL, 2 mL x 2) で 3 回洗い、蒸留水 2mL, 5% 酒石酸 2mL, 5%炭酸水素ナトリウム 2mL, 蒸留水 2mL で順次洗浄した。これを、無水硫酸ナトリウムミニカラムに通して、さらに窒素ガス気流下で濃縮乾固した。ヘキサン 1mL に溶解させた後、1%含水アルミナ 0.25g を充填したミニカラムに負荷し、5%シクロロメタン/ヘキサン 7mL で溶出させた。これを濃縮乾固し、ヘキサン 0.1mL に溶解し、ECD-GC 測定用検液とした。

GC の分析条件 測定機器 ECD 付き
ガスクロマトグラフ (HP5890,

Hewlett-Packard 社製), カラム Quadrex MP65HT, 25mX0.25mm i.d., 膜厚 0.1 μ m
カラム温度 80°C(5min)→30°C/min→320°C,
注入口温度 300°C, 検出器温度 350°C,
キャリアーガス ヘリウム, 25psi, メイクアップガス
窒素 50mL/min, 注入量 4 μ L

C 結果と考察

1 PCQ 分析法について

今回、用いた PCQ 分析法は、飯田らから開発したキャピラリーカラムを用いる分析法³⁾であり、本方法は福岡県以外で一般に用いられているパノクトカラムによる方法に比へ、妨害ピーク

がクロマトグラム上から除かれることで、測定の信頼性、感度の面などで優れた点を有する方法である。我々はこの方法の中のカラムクロマトグラフィーをミニカラムに置き換えることで、さらに迅速性を高めた。本方法では、2ng/mL~0.04ng/mL までの量-反応曲線は $r=0.99$ の良好な直線性を示す。また、すでに約 10 年以上の使用実績があり、過去、福岡県の分析班 3 機関でのクロスチェックで検証されている。今回、PCQ が検出されない健常者血液 2g に対し、PCQ を 0.4ng 添加した添加回収実験での結果では、回収率 108% であった。

2 油症検診受診者血液中 PCB の性状と PCQ 濃度の関係

図 1 及び図 2 に、今回測定した 64 組の血液中 PCB 性状及び PCQ 濃度の関係についての結果を示した。図 1-A は福岡県で従来から採用しているパターン判定の中で特に判定に寄与することか従来から知られている因子 5/2 値と PCQ 濃度との関係、図 1-B は、福岡県外で採用されている判定因子 CB 比と PCQ 濃度との関係を示す。両者とも相関係数 r はそれぞれ 0.9166, 0.9572 と危険率 1% 以下で有意な相関を示した。しかし、対象を PCQ 濃度 1.00ppb 以下~0.02ppb 以上の 16 組に限定すると、図 2-A 及び図 2-B に示すように、相関係数 r はそれぞれ 0.8398, 0.4096 となった。このことは、PCQ が低濃度である場合は PCB の 5/2 値の方

か有意の相関を示すと考えられた PCB クロマトグラムでの 5 番目のピークは 2,3,4,5,3',4'-HexaCB であり、これは、モノオルソ PCB と称されるタイオキシソ類の一つで、その TCDD 毒性等価係数は (TEF) 0.0005 である。油症患者血液の PCB 性状では、PCDF の影響で生じた「低い 1/2 値」の特徴が時間の経過とともに、消失していく傾向にあるのに対し、「高い 5/2 値」は比較的永く維持されていることが認められてきた。PCQ との関係において、高い相関が得られたのは、ともに体内残留が高いことに起因するものであると考えられる。

一方、今回の調査から、油症原因油を摂取したことが明らかな場合であっても、健常者の PCB パターンと差異が見られない血液が観察された。すなわち、認定患者血液の中から、PCQ は 0.1ppb 以上かつ PCB の性状が C パターンである血液が 2 件観察された。それら患者血液のタイオキシソ類濃度は、全国油症研究班の 2002 年の調査結果

では、健常者レベルの低い TEQ 濃度 19.9pgTEQ/gLipid, 26.7 pgTEQ/gLipid を示していた。このような、血液が増加するか否かについては、今後、注視する必要がある。

E 参考文献

1)中川礼子・飯田隆雄ほか 血中 PCB パターンが BC タイプを示す症例についての考察, 食衛誌, 29, 385-389, 1988

2)中川礼子・芦塚由紀ほか 血中 PCB パターン判定における従来法と異性体別分析法の同等性について, 福岡医学雑誌, 94, 144-69,2003

3)飯田隆雄・深町和美ほか ポリ塩化クアテルフェニルのキャピラリーガスクロマトグラフィーによる定量, 分析化学, 37, 230-235, 1988

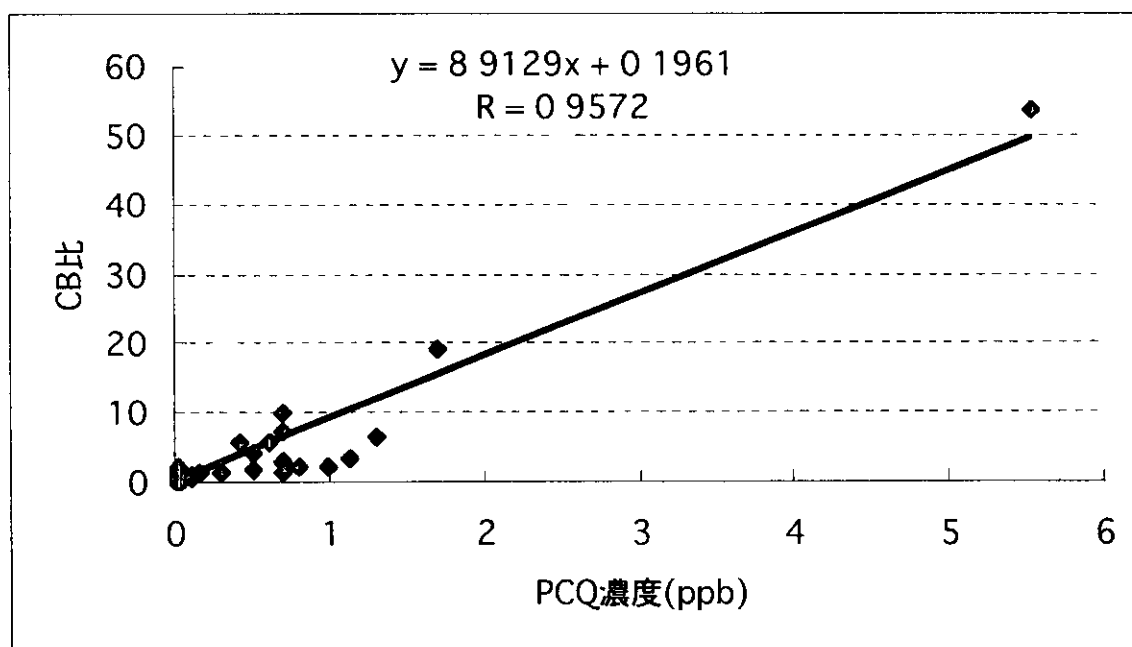
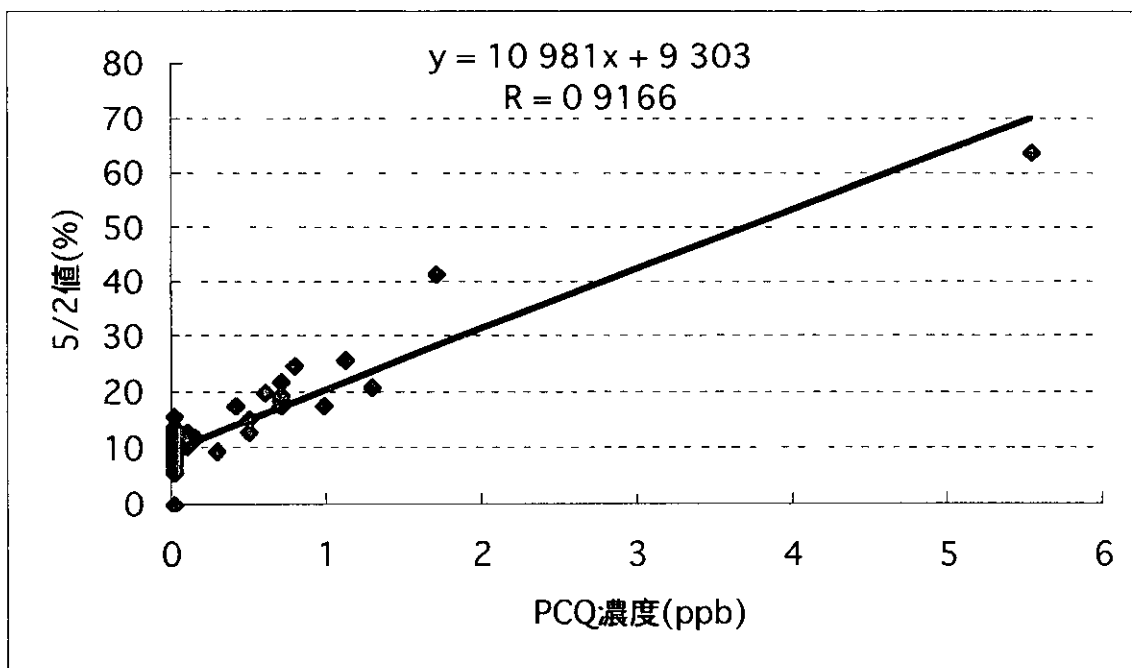


図1 血液64件データを用いた場合の血液中PCBの性状とPCQ濃度の関係
 上段(A) 5/2値とPCQ濃度
 下段(B) CB比とPCQ濃度

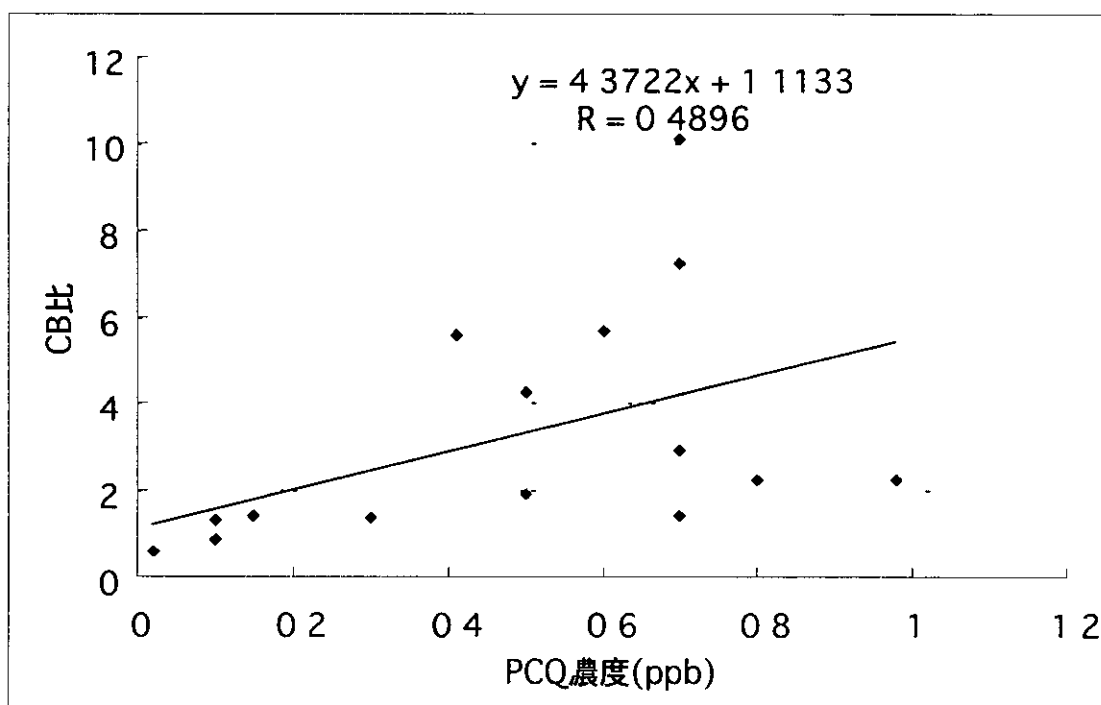
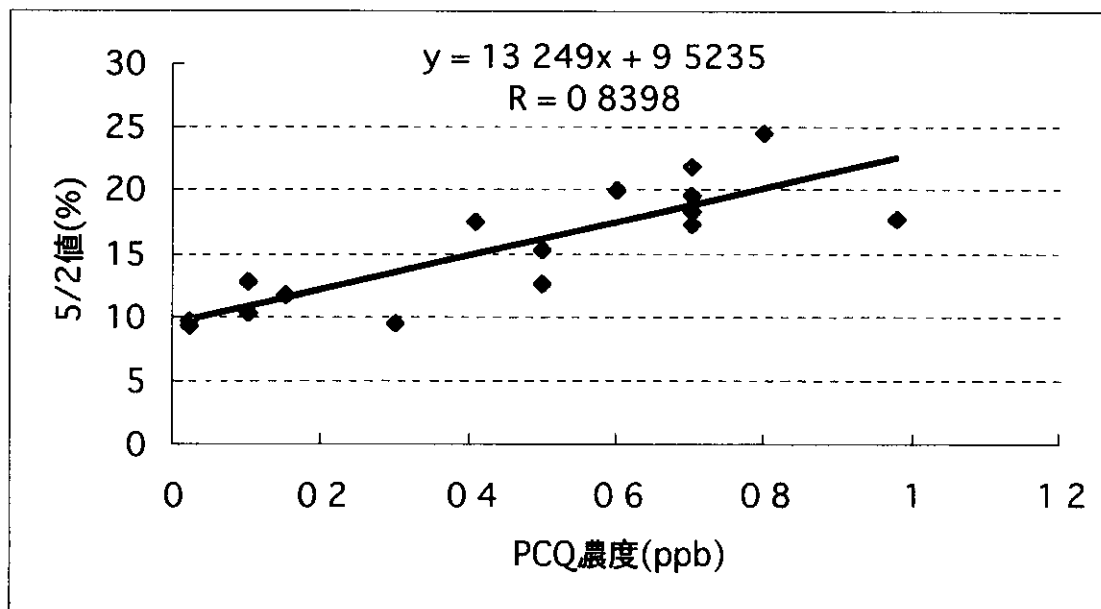


図2 血液64件データを用いた場合の血液中PCBの性状とPCQ濃度の関係
 上段(A) 5/2値とPCQ濃度
 下段(B) CB比とPCQ濃度

分担研究報告書

油症患者血液中の PCB および PCB 代謝物の分析

分担研究者 増田義人 第一薬科大学名誉教授

研究要旨 採取された油症患者および一般人の同じ血液より PCB および PCB 代謝物を同時に分析した。油症患者全血中 12 PCB の合計濃度は平均 28 ppb で、一般人の 2 倍程度であった。PCB118 濃度 (0.08 ppb) は一般人よりも低かったか、PCB156 濃度 (0.28 ppb) は一般人の 8 倍程度であった。4-OH-PCB146, 4-OH-PCB187 および PCP を油症患者の血液よりはしめて検出した。4-OH-PCB146 および 4-OH-PCB187 濃度 (0.2 ppb) は一般人より少し高い程度であったか、PCP は一般人よりも低かった。

A. 研究目的

人体組織および血液中には PCB のほかにホルモン様作用を示す PCB の代謝物、水酸化体(OH-PCB)およびメチルスルホン体 (MeSO₂-PCB) も存在することが明らかになった。血液試料より PCB, OH-PCB, MeSO₂-PCB を同時に分析する方法を確立し、一斉検診時に採取された油症患者の血液より PCB, OH-PCB, MeSO₂-PCB を分析した。

B 研究方法

1999～2003 年の一斉検診時に採取された油症患者血液 約 5 g 又は 1994～1997 年に採取された一般人血液約 10 g に内標準物質として ¹³C 標識 PCB 5 ng、¹³C 標識 OH-PCB 5 ng および MeSO₂-methyl-PCB 25 ng を加え、更にエタノール、2M HCl 各 10 ml を加えて攪拌し、ヘキサン+エーテル(7/3) 10 ml で3回抽出した。有機溶媒層を水洗、乾燥し、蒸発させて、残留脂質量を秤量した。これにヘキサン 10 ml を加えて溶解させ、

0.5M-KOH/エタノール+水(1/1) 5 ml で2回抽出した (OH-PCB 分画)。残ったヘキサン溶液をシリカゲル(1 g)カラムにかけ、はしめヘキサン 30 ml で溶出させ (PCB 分画)、次いでシクロロメタン 30 ml で溶出させた (MeSO₂-PCB 分画)。OH-PCB 分画は 2M-HCl 3 ml で酸性にした後、ヘキサン+エーテル(4/1)で抽出した。有機溶媒層を 1 ml 程度に濃縮して、シアソメタン溶液を加えてメチル化した。この OMe-PCB 分画は硫酸/シリカゲル重層カラムにかけ、シクロロメタンで溶出させた。その溶液を蒸発させ、ヘキサンに溶かし、シリカゲルカラムにかけ、ヘキサン 30 ml で溶出させた。ヘキサン溶液を 0.1 ml 以下に濃縮してガスクロマトグラフ/質量分析計(GC-MS)に注入し、23種の OH-PCB 異性体およびペンタクロロフェノール(PCP)について定量分析した。PCB 分画はそのまま 0.1 ml 以下まで濃縮し、GC-MSで89種の PCB 異性体、ヘキサクロロヘンセン(HCB)および農薬 DDT の代謝物

(DDE)について分析した。MeSO₂-PCB 分画は蒸発させた後、ヘキサン溶液とし、ヘキサン/濃硫酸分配抽出したのち、シリカゲルカラムにかけシクロロメタン+ヘキサン(1:1) 20 ml で溶出した。この溶液を 0.1 ml 以下まで濃縮したのち、GC-MS で 10 種の MeSO₂-PCB 異性体および MeSO₂-DDE について分析した。

C 結果と考察

油症患者血液 36 検体および一般人血液 9 検体の PCB 異性体、HCB、DDE、OH-PCB、PCP の分析結果を表 1 (全血当たり濃度) および表 2 (脂質あたり濃度) に示す。MeSO₂-PCB は検出できなかったため検出限度の値を示している。油症患者には高齢者が多かったため、平均年齢は一般人よりも明らかに高かった。また、血液中の脂質含量は油症患者のほうが一般人より 1.8 倍高かった。12 PCB の合計濃度では油症患者の方が一般人よりも全血当たりで 3.2 倍、脂質当たりで 1.5 倍高かった。その中で、PCB156 は

油症患者の方が一般人よりも更に高く、全血当たりで 8.3 倍、脂質当たりで 5.4 倍高いが、PCB118 では、逆に油症患者の方が一般人よりも低くなっていた。油症患者特有の PCB パターンかはっきりと観察された。OH-PCB および PCP が油症患者血液よりはしめて検出された。油症患者では 2 種類の OH-PCB 濃度は 12 PCB 濃度の 1/7 程度であり、一般人の OH-PCB 濃度より少し高い程度であった。PCP 濃度は、一般人では PCB と同じ程度の濃度であるが、油症患者では PCB の 1/5 程度で、一般人の PCP 濃度よりも低かった。

D 研究発表

1 発表論文

Y Masuda et al Peculiar remaining of some PCB congeners in the patients with Yusho for more than 30 years Organohalogen Compounds 65, 167-170, 2003

Table 1 Concentrations of PCBs, OH-PCBs, DDE, HCB and PCP in the blood of Yusho patients and control persons (ppb in whole blood)

		No of positive	Average	SD	Median	Min	Max	Ratio Yusho/Cont at Median
Age	Yusho	36	66.37	9.86	67.98	40.51	84.52	3.08
	Control	9	38.96	21.18	22.06	20.67	61.99	
Lipid (%)	Yusho	36	0.23	0.07	0.21	0.13	0.36	1.81
	Control	9	0.13	0.07	0.12	0.03	0.28	
<hr/>								
2,3',4',5-pentaCB 118		36	0.08	0.05	0.06	0.03	0.21	0.77
Control		9	0.11	0.06	0.08	0.04	0.20	
<hr/>								
2,2',4',5',5'-hexaCB 153		36	0.66	0.33	0.58	0.17	1.92	2.62
Control		9	0.34	0.23	0.22	0.10	0.76	
<hr/>								
2,2',3,4,4',5'-hexaCB 138		36	0.50	0.35	0.37	0.05	1.97	3.75
Control		9	0.17	0.12	0.10	0.05	0.40	
<hr/>								
2,2',3,4,4',5,6'-heptaCB 182		36	0.10	0.05	0.09	0.03	0.24	1.46
Control		8	0.07	0.05	0.06	0.02	0.16	
<hr/>								
2,3,3',4,4',5-hexaCB 156		36	0.28	0.20	0.22	0.05	1.12	8.35
Control		9	0.03	0.02	0.03	0.01	0.05	
<hr/>								
Total 12 PCBs		36	2.79	1.47	2.46	0.63	8.74	3.19
Control		9	1.20	0.75	0.77	0.42	2.51	
<hr/>								
HCB		36	0.11	0.06	0.10	0.00	0.23	1.09
Control		9	0.10	0.05	0.09	0.04	0.19	
<hr/>								
DDE		36	3.00	1.66	2.66	0.22	6.73	1.84
Control		9	2.34	1.77	1.45	0.39	5.73	
<hr/>								
4-OH-2,2',3,4',5,5'-hexaCB 146		34	0.20	0.13	0.17	0.06	0.78	1.83
Control		7	0.10	0.05	0.09	0.04	0.16	
<hr/>								
4-OH-2,2',3,4',5,5',6-heptaCB 187		35	0.21	0.13	0.18	0.06	0.66	1.51
Control		9	0.14	0.07	0.12	0.05	0.25	
<hr/>								
PCP		33	0.55	0.38	0.44	0.19	2.31	0.64
Control		8	0.98	0.70	0.69	0.34	2.06	
<hr/>								
3-MeSO ₂ -DDE		0	nd (< 0.5)		PCB Polychlorinated biphenyl			
Control		0	nd (< 0.2)		OH-PCB Hydroxy polychlorinated biphenyl			
<hr/>								
4'-MeSO ₂ -2,2',3,4,5'-pentaCB 87		0	nd (< 1)		HCB Hexachlorobenzene			
Control		0	nd (< 0.2)		DDE Dichlorodiphenyl dichloroethane			
					PCP Pentachlorophenol			
					MeSO ₂ - Methylsulfone			

nd not detected

Table 2 Concentrations of PCBs, OH-PCBs, DDE, HCB and PCP in the blood of Yusho patients and control persons (ppb in lipid)

		No of positive	Average	SD	Median	Min	Max	Ratio Yusho/Cont at Median
Age	Yusho	36	66.4	9.9	68.0	40.5	84.5	3.08
	Control	9	39.0	21.2	22.1	20.7	62.0	
Lipid (%)	Yusho	36	0.23	0.07	0.21	0.13	0.36	1.81
	Control	9	0.13	0.07	0.12	0.03	0.28	
2,3',4,4',5-pentaCB 118								
	Yusho	36	37	26	28	11	104	0.35
	Control	9	97	69	80	34	263	
2,2',4,4',5,5'-hexaCB 153								
	Yusho	36	309	168	281	60	921	1.46
	Control	9	289	174	192	89	597	
2,2',3,4,4',5'-hexaCB 138								
	Yusho	36	232	166	187	19	759	2.06
	Control	9	150	95	91	44	268	
2,2',3,4,4',5,6'-heptaCB 182								
	Yusho	36	48	29	43	14	156	1.02
	Control	8	54	39	42	15	116	
2,3,3',4,4',5-hexaCB 156								
	Yusho	36	133	99	100	20	457	5.44
	Control	9	30	26	18	6	81	
Total 12 PCBs								
	Yusho	36	1309	731	1153	415	3806	1.51
	Control	9	1009	560	761	400	2029	
HCB								
	Yusho	36	51	36	46	2	157	0.57
	Control	9	107	90	80	25	279	
DDE								
	Yusho	36	1386	864	1257	79	4468	0.99
	Control	9	1925	1262	1267	327	3894	
4-OH-2,2',3,4',5,5'-hexaCB 146								
	Yusho	35	95	77	72	21	467	0.80
	Control	7	88	53	90	30	186	
4-OH-2,2',3,4',5,5',6'-heptaCB 187								
	Yusho	35	98	73	74	18	358	0.73
	Control	9	131	71	101	29	241	
PCP								
	Yusho	33	264	190	204	74	980	0.32
	Control	8	1263	2000	630	291	6176	
3-MeSO₂-DDE								
	Yusho	0	nd (< 200)					PCB Polychlorinated biphenyl
	Control	0	nd (< 100)					OH-PCB Hydroxy polychlorinated biphenyl
4'-MeSO₂-2,2',3,4,5'-pentaCB 87								
	Yusho	0	nd (< 1000)					HCB Hexachlorobenzene
	Control	0	nd (< 300)					DDE Dichlorodiphenyl dichloroethane
								PCP Pentachlorophenol
								MeSO ₂ Methylsulfone

nd not detected

分担研究報告書

停留精巣と PCB をはじめとする環境化学物質暴露との関連についての症例対照研究

分担研究者 岸 玲子 北海道大学医学部予防医学講座公衆衛生学分野 教授
研究協力者 倉橋 典絵 同上

研究の要旨 近年、欧米で停留精巣の発生率の増加が指摘されており、内分泌攪乱物質との関連が疑われている。そこで、我々は、症例の母および父の内分泌攪乱物質（有機塩素系殺虫剤、PCB、医薬品、食物性エストロゲンなど）への曝露の有無、種類などを調査し、その因果関係を明らかにすることを目的として、症例対象研究を行った。1990年以降に停留精巣の手術を受けた男児91名を症例とし、停留精巣・尿道下裂をもたない男児106名を病院対照とした。その結果、つわり(OR=1.8 95%CI 0.95-3.5)、異常分娩（帝王切開・吸引分娩・鉗子分娩）(OR=2.3 95%CI 1.2-4.4)、妊娠初期の父のカソリン・ティーセル暴露(OR=2.0 95%CI 0.9-4.6)、妊娠初期、妊娠中の父の喫煙(OR=1.9 95%CI 0.98-3.5, OR=2.0 95%CI 1.1-3.7)であった。今回の調査からは、父親の喫煙などの化学物質との関連が示唆された。食物由来の化学物質やエストロゲン曝露との関連について、魚の摂取、植物エストロゲン摂取について解析したか、有意な差はみられなかった。さらに調査を継続し症例数を増やし解析するとともに生体資料を用いた直接的な曝露評価が重要と考えられた。

A 研究目的

近年、欧米で停留精巣の発生率の増加が指摘されており(1)、内分泌攪乱物質との関連が疑われている。停留精巣は、胎児期に腹部にある精巣か、出生時に陰囊まで下降していない疾患で、男児泌尿生殖器奇形で最も頻度が高い。精巣の下降には、テストステロンが関与しており、胎児期における内分泌攪乱物質の曝露との関連が考えられている。停留精巣と化学物質の関連を調べた疫学研究は、Kristensen(2)、Weider(3)らか、農業や造園業による農薬曝露との関連を、Hosie(4)らか、停留精巣患児の脂肪中の有機塩素化合物を調べ、Heptachlore-epoxide(HCE)、Hexachlorobenzene(HCB)との関連を報告している。

今回、我々は、症例の母および父か、患児の出生前、特に生殖器が分化形成する時期に、内分泌攪乱物質（有機塩素系殺虫剤、PCB、医薬品、食物性エストロゲンなど）への曝露の有無、種類などを調査し、その因果関係を明らかにすることを目的として、本調査を行

った。

B 研究方法

1 対象

症例は、1990年以降、札幌市の泌尿器科3施設（大学病院 1、一般病院 2）で停留精巣の手術の既往のある児 91 名を対象とした（回収率 71%）。

病院対照として、札幌市の小児科4施設（大学病院 1、一般病院 4）入院および外来中の停留精巣・尿道下裂をもたない男児とその両親を対象とし、106名から回答を得た（回収率 79%）。

2 方法

質問紙調査法を用い、過去に手術を受けた男児については質問紙を患児の保護者宛に郵送した。

調査票の主な内容は、以下の通りである。

I 児要因

- ① 出生時体重
- ② 在胎期間

③ 先天奇形合併

II 産科要因

① 妊娠経過

② 妊娠時・出産時における問題（妊娠中の出血・切迫流産・帝王切開・異常分娩・妊娠悪阻・子癇前症）

③ 過去の妊娠歴・出産歴

III 母親の要因

① 母親の病歴・薬剤服用歴

② 母親の喫煙・飲酒

③ 母親の食事

IV 父親の要因

① 父親の病歴（不妊治療、泌尿器系疾患）

② 父親の喫煙・飲酒

③ 父親の食事

V 化学物質曝露

① 内分泌攪乱物質の職業性曝露・食物からの摂取

② 農作業・家庭菜園での作業における農薬への曝露等である

3 解析方法

児出生年、母親の児出生時年齢、世帯収入を調整因子として、ロジスティック回帰分析を行った。

（倫理面への配慮）

停留精巣の成因を調査するための医学的研究であること、研究への参加は両親、本人の自由意志であること、もし研究への参加に同意しない場合でも今後の診療上のいかなる不利益を設けないこと、等を主治医から十分に説明し、インフォームトコンセントを得た上で調査に参加していただいた。

C 研究結果

症例と対照の児の出生年の分布に大きな差はみられなかった。症例の合併症と対照の疾患を表1に示す。

表1 症例の合併症と対照の基本疾患

症例の合併症	(%)	対照の基本疾患	(%)
停留精巣のみ	90.1	急性上気道炎 急性腸炎	92.7
心疾患	4.4	心疾患	4.5
鼠径ヘルニア	2.2	筋骨格系疾患	0.9
神経系疾患	1.1	腸管系疾患	0.9
呼吸器系疾患	1.1	染色体異常	0.9
染色体異常	1.1	不明	5.1

1 児要因（表2）

平均在胎週数、平均出生時体重について差はみられなかった。症例で在胎週数37週未満が多い傾向であったが有意差はみられなかった。出生時体重2500g未満も優位な差は認められなかった。第1子にも有意差は認められなかった。

表2 児の特性と要因

	症例 (%)	対照 (%)	Adjusted OR	95%CI
平均在胎週数 (週)	37.8 ± 2.8	38.5 ± 2.6	P=0.07	
平均体重(g)	2970 ± 542	2894 ± 694	P=0.4	
在胎週数 37週未満	19.5	12.0	1.5	0.6-3.6
出生時体重 2500g未満	20.2	13.9	1.4	0.7-3.1
第1子	56.8	61.9	0.7	0.4-3.6

2 母の特性と要因（表3）

母親の出産時年齢35歳以上群で、オノス比が優位に低下した。

母親の肥満、不妊や子宮内膜症によるホルモン療法の既往に有意な差はみられなかった。

表3 母の特性と要因

	症例 (%)	対照 (%)	Adjusted OR	95%CI
児出生時年齢 (才)	28.7 ±4.2	29.3 ±4.6	P=0.3	
母BMI	20.8 ±3.5	20.6 ±2.6	P=0.7	
出生時年齢 35才以上	6.7	15.6	0.3	0.1-1.0
不妊でホルモン療法 の既往	8.0	4.4	1.9	0.6-6.3
子宮内膜症で ホルモン療法 の既往	3.4	3.6	0.9	0.2-4.1

3 妊娠経過と分娩転帰 (表4)

妊娠中のつわりは、症例で高い傾向にあった。妊娠中の臍出血に有意な差はなく、切迫流産、妊娠中毒症（浮腫、高血圧、蛋白尿のいずれかあり）は症例群で比較的多くみられたか、優位な差は認められなかった。帝王切開でリスクの上昇傾向、異常分娩（帝王切開、吸引分娩、鉗子分娩）では有意にリスクの上昇を認めた。異常分娩の要因の一つである骨盤位に差はみられなかった。

表4 妊娠経過と分娩転帰

	症例 (%)	対照 (%)	Adjusted OR	95%CI
つわり	75.8	65.5	1.8	0.95-3.5
臍出血	12.4	13.2	1.0	0.4-2.3
切迫流産	19.3	17.0	1.2	0.6-2.5
妊娠中毒症	15.9	10.7	1.7	0.7-4.0
帝王切開	26.4	13.9	2.0	0.9-4.0
異常分娩	35.2	17.4	2.3	1.2-4.4
骨盤位	17.4	15.8	1.7	0.4-7.9

4 化学物質曝露 (表5)

児の両親が農業従事者と、それ以外に家庭菜園での農薬使用者を加えた農薬曝露には差がみられなかった。一方、職業性の化学物質曝露については、症例で、父親の妊娠初期のカソリン・ディーゼル曝露のオッズ比が高い傾向にあった。カソリン・ディーゼル曝露の職種は、トラックの運転手、運送業、配達業、タクシー運転手、整備工場勤務であった。母親の職業性化学物質曝露では有意な関連はなかった。

喫煙については、父の妊娠初期、妊娠中の喫煙で有意なオッズ比の上昇が認められた。また、同居人の喫煙でもオッズ比の上昇が認められた。母の喫煙に関しては、差はみられなかった。

表5 化学物質曝露

	症例 (%)	対照 (%)	Adjusted OR	95%CI
妊娠初期の父の カソリン ディー ゼル曝露	19.1	10.7	2.0	0.9-4.6
妊娠中の父のカ ソリン ディー ゼル曝露	16.7	10.7	1.7	0.7-4.0
妊娠初期 父の 喫煙	75.3	59.6	1.9	0.98-3.5
妊娠中 父の喫 煙	73.6	59.6	2.0	1.1-3.7
妊娠初期 母の 喫煙	33.0	29.6	1.0	0.6-2.0
妊娠中 母の喫 煙	19.3	19.1	1.0	0.5-2.0
同居人の喫煙	71.6	50.0	2.4	1.3-4.5

5 食事との関連 (表6)

PCB、タイオキノン曝露の可能性として、魚の摂取に関しては、近海魚（さんま、にしん、さば等）を週1-2回以上摂取する割合

か、症例で低かったか有意ではなかった。遠洋魚（まぐろ、さけ、かつお等）に関しては、ほとんど差はなかった。

植物エストロゲン曝露の可能性として、豆腐、納豆、みそ汁、豆乳、椎茸、について解析を行ったか、いずれも、有意な差はみられなかった。

表6 妊娠中の食品摂取

	症例 (%)	対照 (%)	Adjusted OR	95%CI
近海魚（週1-2回以上）	46.5	56.5	0.7	0.4-1.3
遠洋魚（週1-2回以上）	51.2	51.4	1.1	0.6-2.0
豆腐（ほとんど毎日）	5.9	11.2	0.9	0.6-1.2
納豆（ほとんど毎日）	16.3	15.7	1.1	0.9-1.5
みそ汁（毎日）	52.3	57.2	0.9	0.5-3.6
豆乳（週2-3回以上）	5.7	5.4	0.9	0.2-3.6
椎茸（週1-2回以上）	39.0	38.9	1.1	0.6-2.1

6 ロススティンクモデル（表7）

有意なオッズ比の上昇を認めた、「妊娠中の父の喫煙」と異常分娩を同一モデルに投入したところ、それぞれ、独立したリスク要因であった。

表7 ロススティンクモデル

	OR	95%CI
妊娠中 父の喫煙	1.9	1.0-3.7
異常分娩	2.1	1.1-4.3

D 考察

精巣下降は機械的因子とホルモン因子の相

互作用によって生まれる結果と考えられる。詳細な下降メカニズムは不明であるか、第1相の腹腔内下降 **transabdominal phase** と第2相の鼠径陰嚢部下降 **inguinoscrotal phase** の2段階に分かれていると考えられている。機械的因子としては、精巣導体の収縮による牽引説、発達した精巣上体による圧迫説、胎児の発育に伴う相対的下降説、腹圧による押し出し説、などがある。ホルモン因子としては、**Sertoli** 細胞から分泌されるミューラー管発育阻止物質 (**MIS**)、**Leidig** 細胞から分泌されるテストステロンが重要と考えられている。精巣下降の第1相は、アントロゲンの関与は少なく非アントロゲンのホルモンや、胎児の精巣から分泌されるミューラー管発育阻止物質 (**MIS**) が腹腔内精巣下降をコントロールしていると考えられている。第2相は、胎児の **Leidig** 細胞から分泌されるアントロゲン依存性だと考えられている(5)。

母親の妊娠中の内外からのエストロゲン曝露か、精巣下降第1相において関係するといわれる **MIS** の作用を阻害し、また、胎児の **Leidig** 細胞の前駆細胞を抑制することで第2相に関係するといわれるテストステロンの分泌を阻害し、停留精巣の発生に関与すると考えられた。

過去の国外の疫学研究によると、停留精巣のリスク要因の王なものとして、児要因としては、低出生体重児(6)・早産児(7)、妊娠中の要因としては、つわり(8)・帝王切開(9)などが報告されている。

停留精巣は胎児の成長に伴い下降し、出生時に下降していなくても1才までの下降が期待できる。そのため、低出生体重児、早産児では高率に停留精巣がみられる(6,7)。今回の調査では、低出生体重児、早産児にもいずれも優位な差は示さなかった。これは、過去の疫学研究か、出生時に停留精巣の既往のある症例を対象としているのに対し、今回の調査では、手術例に限ったためと考えられる。化学物質蓄積の影響を最も受けやすいとされる第1子についても優位な差はみられなかった。

妊娠中のリスク要因と考えられる妊婦のエストロゲン高値の状態を反映すると言われるつわりについては、有意ではないかオノス比の上昇傾向が見られた。帝王切開、異常分娩でオノス比の上昇を認めたか、帝王切開の要因の一つに骨盤位があるか、胎児が長期間、骨盤位にいることは、精巣下降に必要なテストステロンを産生する精巣への血液循環に、機械的な影響を与えると胎児精巣への血液循環を阻害する、と考えられている。しかし、骨盤位のみでは、有意なリスク要因ではなかった。

今回の調査では、職歴を詳細に聞き、職業性の化学物質との関連を調べた。過去に報告されている農薬との関連は認められなかったか、父親の妊娠初期のカソリン・ティーセル曝露に、有意ではないかやや高いオノス比を認めた。職業の内容は、整備工場、運送業、タクシー・トラックの運転手等であった。自動車を使用した自営業であったり、自動車での帰宅、整備工場などの職場に近い居住地などにより母親にもカソリン・ティーセル曝露の機会が多い可能性があるのかもしれない。また、ティーセル排気粒子には、ヘンソ [a]ピレン や、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD)かふくまれていることから、内分泌攪乱物質との関連も示唆された。

喫煙に関しては、母親の喫煙よりも、父親の喫煙で、有意なオノス比の上昇をみとめた。これは、母親は、妊娠かわかると比較的禁煙をするか、父親は、全く禁煙をしないことが特徴的であり、副流煙が胎児に及ぼす影響が示唆された。

Tsutsumi らは、日本人のタイオキノン類の1日摂取量の53.9%は魚介類よりの摂取であると報告(8)し、Arisawa らは、日本人でも、魚の摂取頻度が高い人ほど、血中のPCB、ダイオキノン濃度が高い、と報告している(9)。今回の調査では、魚の摂取頻度、種類による、オノス比の上昇は認められなかったか、今後は、生体資料を用いて、直接的な曝露評価もさらなる検討課題である、と思われた。

植物エストロゲン曝露の可能性として、豆腐、納豆、みそ汁、豆乳、椎茸について、検討したか、いずれも有意な差は認められなかった。North らは、ヘシタリアンの母親から出生した児に、尿道下裂児が多かったことを報告している(10)。停留精巣も、尿道下裂と同様、ホルモン依存性に起こりうる疾患であるので、植物エストロゲンと停留精巣の関連を追及することも今後の検討課題であると考えられる。

今回の調査では、停留精巣と喫煙など化学物質曝露との関連が示唆された。今後も、さらに調査を継続し、生体資料を用いた直接的な曝露評価も重要である、と考えられた。

E 結論

停留精巣の症例対照研究を行い、父親の喫煙、職業性化学物質曝露、つわり、異常分娩によるオノス比の上昇を認め、関連が示唆された。今後、生体資料を用い、直接的な化学物質の曝露評価も必要である、と考えられた。

参考文献

- (1)Paulozzi JL, et al International Trends in Rates of Hypospadias and Cryptorchidism Environ Health Perspect 1999(107)4 297-302
- (2)Kristensen P, et al Birth defects among offspring of Norwegian Farmers,1967-1991 Epidemiology 1997 Sep,8(5) 537-44
- (3)Weidner IS, et al Cryptorchidism and Hypospadias in Sons of Gardeners and Farmers Environ Health Perspect 1998(12)106 793-796
- (4)Hosie S, et al Is There a Correlation Between Organochlorine Compounds and Undescended Testes? Eur J Pediatr Surg 2000(10)304-309
- (5)生野 猛 他 精巣下降のメカニズム 小児外科 1998 6 568-573
- (6) Berkowitz GS, et al Maternal and Neonatal Risk Factors for Cryptorchidism

Epidemiology 1995(6)2 127-131

(7) Jones ME, et al Prenatal risk factors for cryptorchidism a record linkage study

Paediatr Perinat Epidemiol 1998(12)383-396

(8) McBride ML, et al Maternal and Gestational Factors in Cryptorchidism Int J Epidemiology 1991(20)4 964-970

(9) Mori M, et al Maternal and Other Factors of Cryptorchidism-A Case control study in Japan Kurume med J 1992(39)53-60

(10) Tsutsumi T, et al Update of dairy intake of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs from food in Japan Chemosphere 2001(45)1129-1137

(11) Arisawa K, et al Fish intake, plasma ω -3 polyunsaturated fatty acids, and polychlorinated dibenzo-p-dioxins/polychlorinated dibenzo-furans and co-planar polychlorinated biphenyls in the blood of the Japanese population Int Arch Occup Environ Health 2003(76)205-215

F 研究発表

1 学会発表

倉橋典絵、笠井世津子、柴田隆、柿崎秀宏、野々村克也、佐田文宏、岸玲子 停留精巢のリスク要因に関する症例対照研究 平成16年1月 日本疫学会

分担研究報告書

ダイオキシン曝露ラット胎仔におけるステロイド生合成に関わる因子 およびステロイドホルモンレセプターの発現変動

分担研究者 山田 英之 九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野 教授
研究協力者 石井 祐次 九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野 助教授
石田 卓巳 九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野 助手

研究要旨 本研究では、タイオキシン類による後世代影響について、その機構を明らかにするため検討を行った。タイオキシン類の毒性は、多岐に亘る事か知られているか、中でも妊娠中に 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) に曝露された母獣より生まれる胎仔において、性成熟の遅延や性行動不全、さらに精子数の減少といった異常が現れることが明らかとなっている。この機構を明らかにするため、TCDD 曝露胎仔の精巣および副腎におけるステロイドホルモン生合成因子およびステロイドホルモンレセプターの遺伝子発現について半定量的 reverse transcriptional-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて検討した結果、TCDD 曝露胎仔雄の精巣において、steroidogenic acute regulatory (StAR) タンパク質、CYP11A1、CYP17 および CYP11B1 の各 mRNA 量が有意に減少することが明らかとなった。さらに、ステロイドホルモンレセプターの一つである estrogen receptor (ER)- α mRNA 量も有意に低下することか明らかとなった。本研究結果より、TCDD によるステロイド生合成因子の発現変動が、後世代影響の発現機構である可能性が示唆された。

A. 研究目的

油症の原因物質と考えられている polychlorodibenzofuran 類 (PCDFs) や coplanar polychlorinated biphenyl 類 (coplanar PCBs) などのタイオキシン類は、内分泌異常、免疫毒性、催奇形性、発ガンプロモーション、胸腺や脾臓の萎縮など、生体に対して多岐にわたる障害を引き起こすことか知られている。また、その毒

性の発現については、arylhydrocarbon receptor (AhR) の関与が示唆されているか、根源的な機構は未だ不明であり、その危険度も正確には把握されていない。タイオキシン類による毒性の一つに生殖毒性や後世代的影響が報告されている。胎仔期にタイオキシン類の曝露を受けた場合、性成熟の遅延や性行動不全、雄の精子数減少等の異常が起こることか報告されているか、

これには性ホルモンの変動が関与していると考えられている。一方、タイオキシン類は、cytochrome P450 1A1 (CYP1A1)をはじめとする種々の機能性タンパク質の発現に影響を与えることが知られており¹⁾、これらの変動とダイオキシン類の毒性との関係について興味を持たれるところである。特に、CYPのある分子種は、ステロイドホルモンの生合成に関与することから知られていることから、胎仔期のダイオキシン曝露によりステロイドホルモン作用に関連する因子が変動している可能性が予想される。そこで本年度は、性ホルモンをはじめとするステロイドホルモンの生合成に関わる因子およびステロイドホルモンレセプターに着目し、胎仔期の TCDD 投与によるそれらの遺伝子発現の影響について検討を行った。

B. 方法・結果

性ホルモンである androgen や estrogen は、生体内においてコレステロールより生合成されており、この際、複数の CYP の関与が明らかとなっている²⁾ (Fig 1)。そこで、胎仔期の TCDD 曝露がこれらの遺伝子発現にどのような影響を及ぼすのかについて検討するため、半定量的 reverse transcriptional-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて検討を行った。

1) 胎児肝 CYP1A 誘導に及ぼす効果

性ホルモン等の生合成系や作動系に関する検討の前に、ラット胎仔に対して TCDD が作用するか否かを検討するため、ラット

胎仔肝臓における CYP1A1 の発現変動を半定量的 RT-PCR 法により検討した。妊娠 15 日目の Wistar ラットに、コーンオイルに溶解した 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) を 1 μ g/kg body weight/2 ml corn oil の用量で単回経口投与した。また、コントロールとして、食餌を自由に摂取させ、コーンオイルのみを投与した群 (vehicle 群) を準備した。各群とも投与 5 日後となる妊娠 20 日目に胎仔より肝臓を摘出し、cDNA を調製したのち実験に供した。その結果、TCDD 曝露母獣より摘出した胎仔の肝臓において、CYP1A1 mRNA の顕著な誘導が見られたことから、胎仔にも TCDD の曝露が及んでいることが確認された (Fig 2)。

次に、AhR やステロイドホルモン生合成に関わる因子の発現に及ぼす TCDD の影響について検討するため、前述の方法と同様の投与を行った母獣より胎仔を摘出し、雄もしくは雌に選別したのち、精巣および副腎を摘出した。さらに、これらから cDNA を調製したのち、半定量的 RT-PCR 法にて検討を行った。

2) AhR および AhR nuclear translocator (Arnt) に関する検討

AhR および Arnt に関して検討を行った結果を Fig 3 に示す。Fig 3 (A) は、AhR および Arnt に関して特異的な primer を用いて PCR を行った結果であり、Fig 3 (B) には、各サンプルにおいて内標準として定量した β -actin mRNA の発現量を 100% とした際の各 PCR 産

物の量をグラフにて示している。この結果から、TCDD 曝露ラット胎仔の精巣および副腎において、AhR および Arnt の発現量は変化しないことが明らかとなった。

3) ステロイド生合成因子に関する検討

次に、ステロイド生合成因子に関して検討した結果を Fig 4 に示している。TCDD 曝露ラット雄胎仔の精巣において、ステロイドホルモン生合成の場であるミトコンドリア内へのコレステロールの導入において重要な働きをもつことが知られている steroidogenic acute regulatory (StAR) タンパク質、CYP11A1、CYP17 および CYP11B1 の各 mRNA 量が有意に減少することが明らかとなった。これに対し、TCDD 曝露ラット胎仔の副腎においては、雄雌共に、StAR タンパク質、CYP11A1、CYP17、CYP11B1、CYP11B2 および CYP19 の各 mRNA 量に変化は見られなかった。

4) ステロイドホルモンレセプターに関する検討

最後に、ステロイドホルモンレセプターについて検討した結果を Fig 5 に示す。TCDD 曝露ラット胎仔の精巣において、estrogen receptor (ER)- α mRNA の量が有意に減少することが明らかとなった。また、ER- β mRNA についても、有意な差は見られなかったものの、減少傾向にあることが明らかとなった。これに対し、TCDD 曝露ラット胎仔雄の副腎において、androgen receptor (AR) mRNA の量が増加傾向にあることが認められた。しかし、

TCDD 曝露ラット胎仔雄の副腎における ER mRNA および TCDD 曝露ラット胎仔雌の副腎における ER および AR mRNA 量については、変化は認められなかった。

C. 考察

本研究より、TCDD 曝露ラット胎仔の精巣において、ステロイドホルモン生合成因子である StAR、CYP11A1、CYP17 および CYP11B1 の各 mRNA 量が有意に低下することが明らかとなった。また、ステロイドホルモンレセプターについては、TCDD 曝露胎仔精巣における ER- α の mRNA 量に有意な減少が認められた。これらの遺伝子は、コレステロールから性ホルモン等を生合成し機能を発揮する際に重要であり、これらの発現変動が TCDD によるラットの生殖毒性と関連する可能性が考えられた。今回得られた結果を基に、今後、脳内における CYP 群および種々の臓器における ER についても検討を加えることにより、TCDD による後代的影響の発現機構の解明に繋がるのではないかと期待される。

D 参考文献

- 1) K Sogawa and Y Fujii-Kuriyama, *J Biochem*, **122**, 1075-1079 (1997)
- 2) 日本内分泌学会 編, ステロイドホルモンの生物化学, 53-91 (1980)

E. 研究発表

- 1) フォーラム 2003 衛生薬学・環境トキシコロジー (仙台、2003 年 10 月)
- 2) 第 20 回日本薬学会九州支部大会 (福岡,

2003 年 11 月)

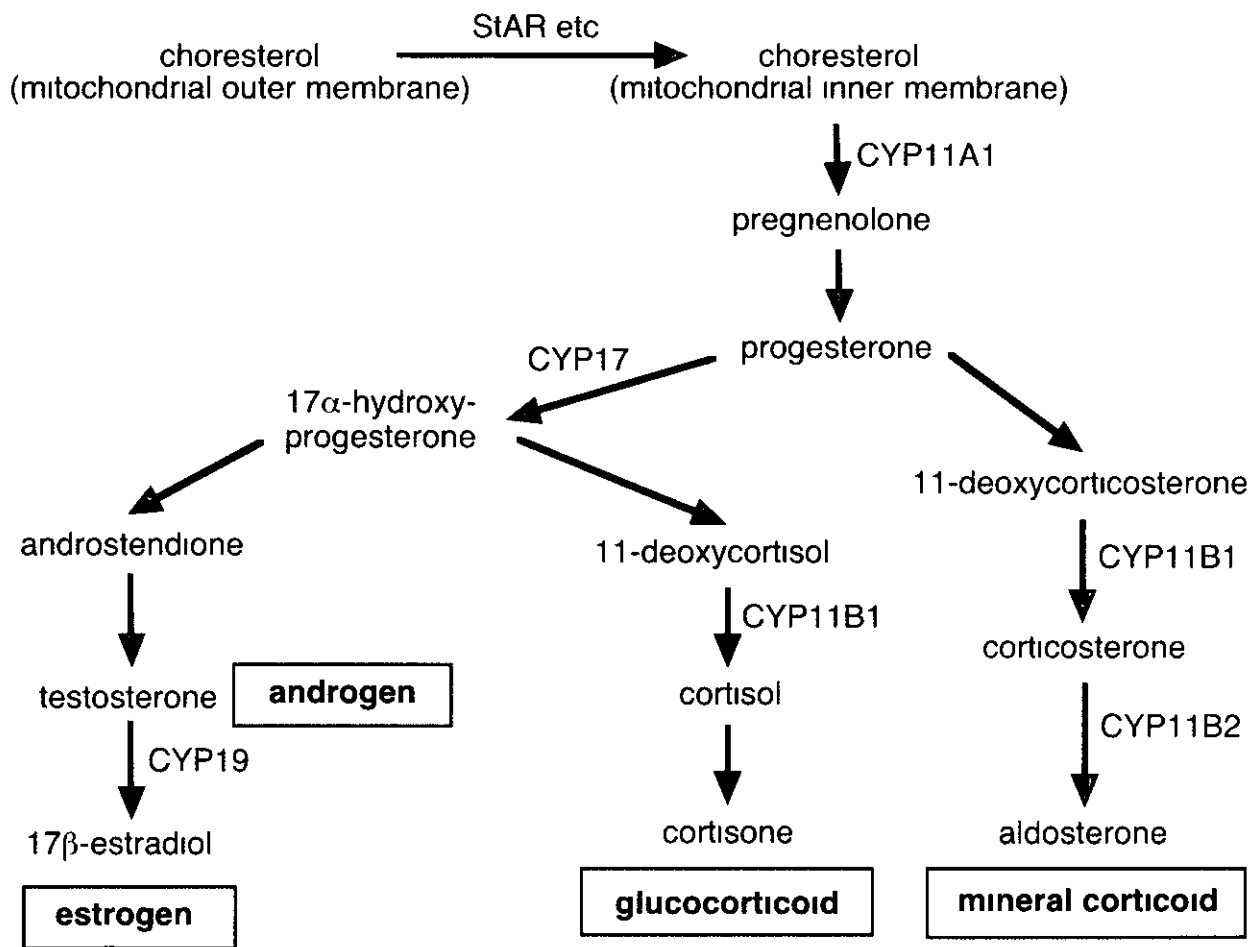


Fig. 1 Pathways of steroidogenesis