

図3 蒸留時間による4NP及びNP-d5の回収率

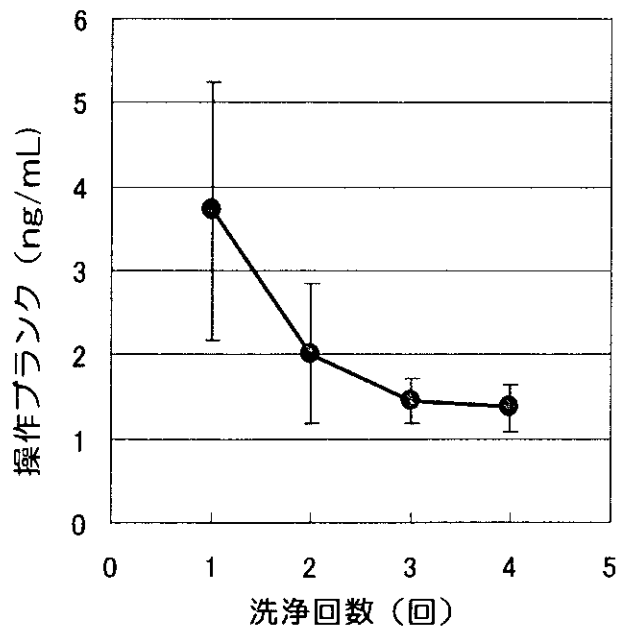


図4 装置洗浄による操作ブランクの挙動

表 1 遠心エバポレータによる 4NP 及び NP-d5 の回収率

遠心時間(min)	(%)			
	4NP		NP-d5	
	A	B	A	B
25	94.2±1.1	96.1±1.1	90.4±1.8	92.7±3.4
50	95.6±3.1	94.4±1.6	93.6±4.5	91.1±4.6

mean±SD (n=3)

A: ヘキサン溶液(4NP, NP-d₅ 50ppb)4mLを濃縮乾固

B: 同溶液4mLに水4mLを入れヘキサン層を濃縮乾固

表 2 4NP の回収率

試料	添加量	回収率(%)	RSD(%)
蒸留水	100ng/100mL	105.3±0.6	0.6
飼料	100ng/2g	71.3±2.5 ^(*)	3.5

mean±SD (n=3)
※:18.7ppbの試料を使用

表3 床敷及び飼料中の4NPの測定

試料	測定値 (ppb)
床じき No.1	65.3±6.9
床じき No.2	32.2±4.8
飼料 No.1	17.4±1.1
飼料 No.2	10.5±2.1
飼料 No.3	18.7±1.0
給水 No.1*	<0.01

* : 神奈川県研動物舎で採取

mean±SD (n=3)

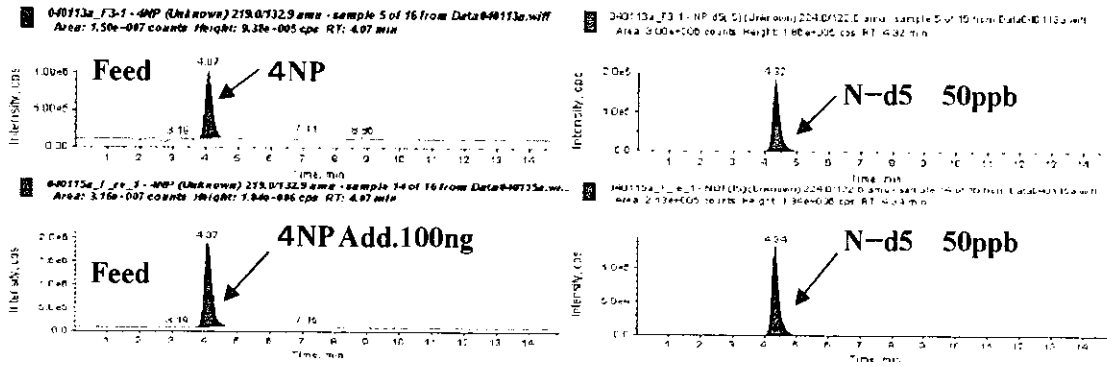


図5 飼料及び4NP添加飼料のクロマトグラム

平成 15 年度 厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）
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

生体試料に関する中間報告

主任研究者	牧野 恒久	東海大学
研究協力者	和泉俊一郎	東海大学
分担研究者	中澤 裕之	星薬科大学
分担研究者	岡 尚男	愛知県衛生研究所
研究協力者	近藤 文雄	愛知県衛生研究所
研究協力者	堀 伸二郎	大阪府立公衆衛生研究所
分担研究者	堀江 正一	埼玉県衛生研究所
研究協力者	月岡 忠	長野県衛生公害研究所
研究協力者	藤巻 照久	神奈川県衛生研究所
研究協力者	平山 クニ	神奈川県衛生研究所

報告要旨

生体試料採取にあたっては、周産期試料と生殖年齢婦人の試料の 2 種を対象とした。周産期試料としては母子関係を重視し、母体側試料と、その母体より出生した新生児側試料を関連づけて採取した。母体側からは、母体血、母乳を、新生児側からは臍帯血を基準試料としたが、各研究機関の要望により、母体側毛髪、臍帯、胎脂等を追加採取し、一部検討した。生殖年齢婦人の試料は腹水、血液を中心として採取した。同時に生体試料提供協力者の身体的、社会的、環境的背景を記録し、疫学的分析の資料とした。

A. 研究目的

次世代への内分泌かく乱化学物質の影響を考える場合、生殖年齢の婦人における暴露状況の把握と母児間の移行の実態の理解は必須である。

まず内分泌かく乱物質の妊婦および胎児・新生児への影響は、単独試料による分析だけでは不十分であり、母子の一連の試料のもとに、母体側暴露状態と、妊娠中の胎児への移行を分析する必要がある。そこで、本研究に使用す

る試料の採取にあたっては、母体側試料と、その母体より出生した新生児の試料を採取し、母子両者の分析結果比較が可能になるよう条件を設けた。

次に、母体側環境、例えば妊娠経過、その間の食生活、嗜好、また、住居付近の生活環境等にも配慮し、疫学的分析の資料とした。

生殖年齢婦人の暴露状況調査としては、内視鏡検査を施行する婦人に十分なインフォームドコンセントの上で同意を

得て腹水と血液を採取し分析することとした。

B. 研究方法

東海大学医学部付属病院産婦人科外来において、研究目的の十分なインフォームドコンセントを行い、承諾の得られた患者より、全例同意書を得た。周産期試料としては、分娩時、母体血 20ml、臍帯血全量を採取し、すぐに遠沈し、血清をマイナス 4℃で保存した。採取にあたっては、採取器具からのコンタミネーションを防止するために、本研究開始時の基礎実験の結果に基づいて施行した。母乳採取は分娩 4 日目と 5 日目に可能な限りの量を採取し、マイナス 4℃にて保存した。また、分析対象の補充を試みるべく、各研究機関からの依頼を受けて、必要に応じて母体毛髪、臍帯、胎脂等の採取を行った。

生殖年齢の婦人については腹腔鏡下に内視鏡の期別分類もおこない、化学物質の濃度と病気の関連についても検討した。

検査法については現在策定中のガイドラインは、策定途上での検査のため、最終ガイドラインと同一とは限らない難点はあるものの、対象物質がその他の関連のものも測定できる場合は検討対象とした。

主な測定物質と測定方法

1. ビスフェノール A
 - 1) GC-MS 法
 - 2) 高感度 HPLC-蛍光定量法
 - 3) LC-MS 変法
2. 有機塩素系化学物質 (PCB、農薬、

ダイオキシン類)

GPC-GC/MS 法

3. プチルスズ化合物

ICP-MS/GC 法

C. 結果

各試料は要望のあった研究機関に発送し、分析が行われたが、現時点では高濃度の暴露を疑わせる症例は存在しなかった。周産期関連の分析結果は表 1~6 に示す。生殖年齢婦人のデータ分析結果は表 7 と図 1~5 に示した。

D. 考察

妊婦が研究に協力的であったことは、テレビ、ラジオ、雑誌等のマスコミの影響と、妊婦自身の関心の高さによるものと考えられた。

生体試料のバラツキの多さが認められたが、このことはある一定数の試料を準備するにあたっては、その 1.5~2 倍数の症例数が必要であることを意味し、今後の目安としたい。

現時点では、内膜症の病気と関連する物質は特に検出されなかった。さらに疫学的検討を追加して報告したい。

E. 結論

生体試料採取の実際を試みた。予測に比べ特に母乳採取と胎脂採取に個人差が大きいたことが判明したが現時点で採取した生体試料において危惧された高濃度暴露を疑わせる値は存在しなかった。さらに例数を蓄積しガイドラインに則った方法で分析して検討したい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

表1 ビスフェノールA、年齢別分析

年齢	症例数	母体血*	臍帯血*	母乳
20～24	2	0.32	0.38	ND
25～29	9	0.19	0.29	ND
30～34	6	0.13	0.18	ND
35～	7	0.12	0.15	ND

* 単位ppb

表2 ビスフェノールA、都市別分析

都市名	症例数	母体血*	臍帯血*	母乳
伊勢原市	6	0.44	0.61	ND
秦野市	6	0.11	0.12	ND
平塚市	4	0.11	0.19	ND
厚木市	3	ND	ND	ND
他	5	0.09	0.09	ND

*単位ppb

表3 有機塩素系化学物質(PCB濃度)

試料	最小値	最大値	平均
母体血	34	222	99
臍帯血	15	126	61
母乳	42	192	95

n=10 単位ng/g

表4 有機塩素系化学物質(母乳中のダイオキシン類)

ダイオキシン類	pg/g fat	pgTEQ/g fat
PCDDs/PCDFs	166.7	14.6
Non-ortho PCB	76.1	3.2
Mono-ortho PCB	13215	3.0
総ダイオキシン類		20.8

n=10

表5 ブチルスズ化合物

症例	試料	MBT	DBT	TBT	total
1	母体毛髪	0.971	0.41	ND	1.38
	臍帯	-	-	-	-
	母体血	ND	ND	ND	ND
	臍帯血	ND	ND	ND	ND
	母乳	0.074	0.06	ND	0.13
2	母体毛髪	0.110	0.01	ND	0.01
	臍帯	ND	ND	ND	ND
	母体血	0.031	ND	ND	0.03
	臍帯血	0.050	ND	ND	0.05
	母乳	ND	ND	ND	ND
3	母体毛髪	0.349	0.03	0.084	0.46
	臍帯	0.023	ND	ND	0.02
	母体血	0.066	ND	ND	0.07
	臍帯血	0.067	0.02	ND	0.09
	母乳	0.073	ND	ND	0.07
4	母体毛髪	0.235	0.02	ND	0.26
	臍帯	0.008	ND	ND	0.01
	母体血	0.022	0.01	ND	0.03
	臍帯血	0.012	ND	ND	0.01
	母乳	-	-	-	-

(ug/g)

表6 ビスフェノールA測定結果

症例	ビスフェノールA測定結果				
	母体血		臍帯血		母乳
1 - 15	ND		ND		ND
16	0.43	0.10	0.61	0.18	
17	0.23	0.29	0.45	0.28	
18	0.63	0.13	0.69	0.26	
19	0.65	0.17	0.76	0.14	
20	0.45	0.10	0.45	0.27	
21	0.43	0.17	0.74	0.24	
22	0.34	0.18	0.49	0.26	
23	0.79	0.32	0.73	0.19	
24	0.21		0.64		

○症例No.1~15: GC-MS法を用いて測定。

○症例No.16~24: 左側の測定結果は高感度HPLC-蛍光定量法を用い、単位はppb。右側の測定結果はLC-MS変法を用い、単位はng/ml。

表7 対象の子宮内膜症進行期分類

	症例数
内膜症所見なし	21例
進行期Ⅰ期	9例
進行期Ⅱ期	1例
進行期Ⅲ期	9例
進行期Ⅳ期	2例

N=42

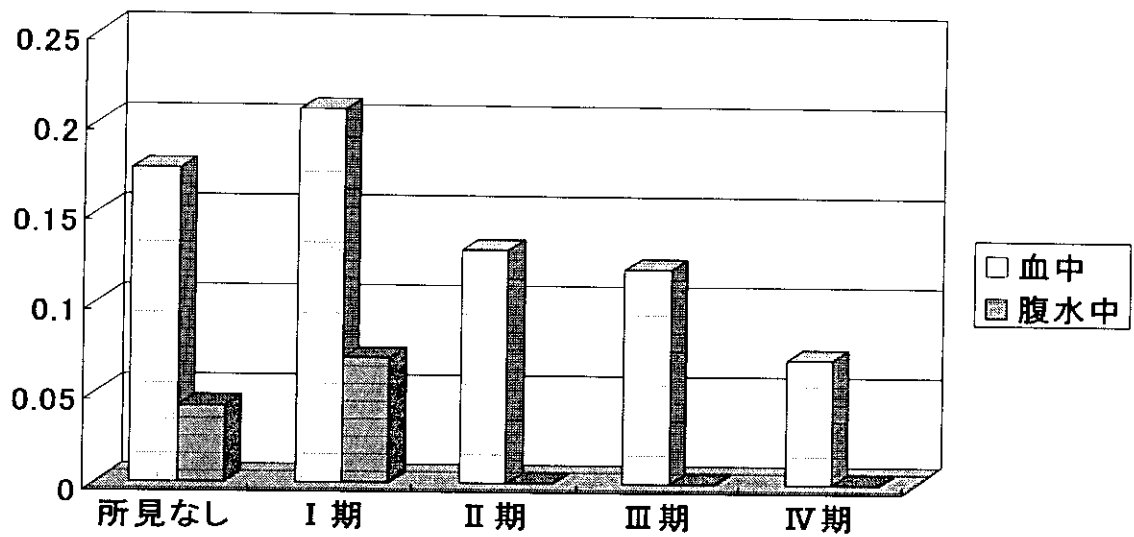


図1 子宮内膜症病期分類とt-ノナクロルデン測定値

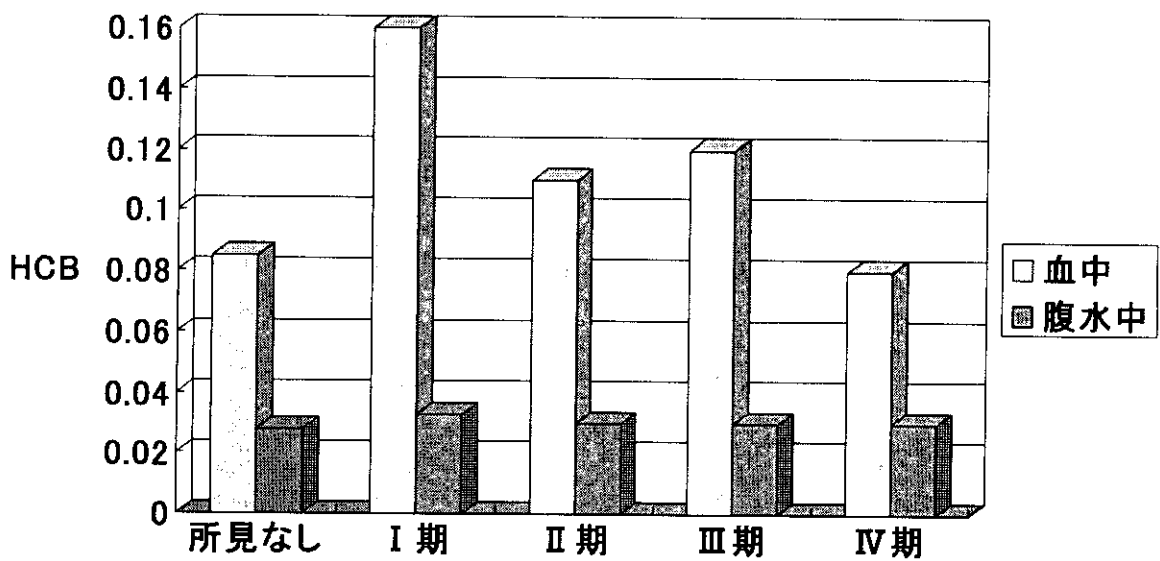


図2 子宮内膜症進行期とHCB測定値

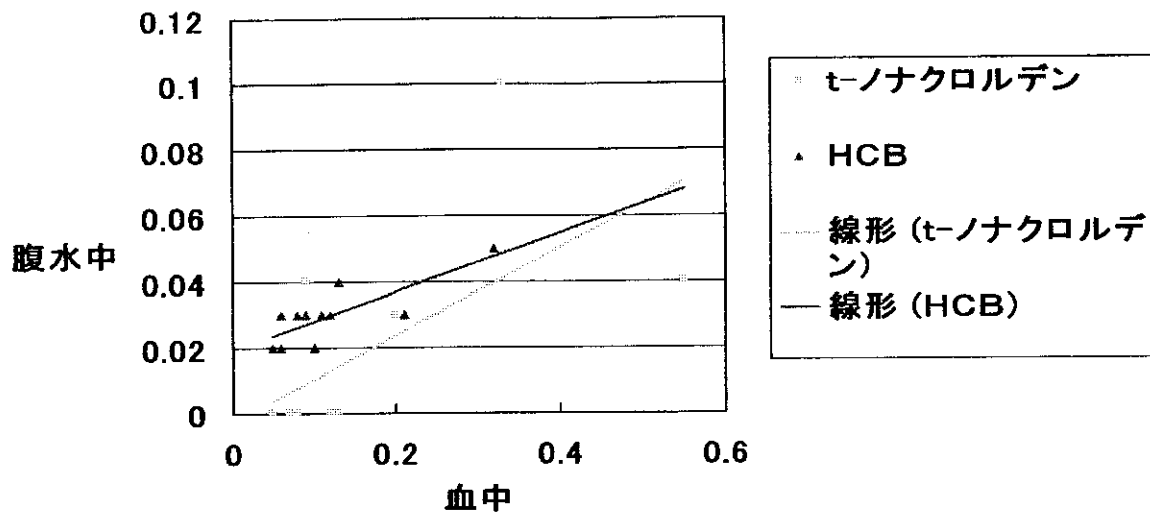


図3 クロルデン関連物質測定値(血中および腹水中)

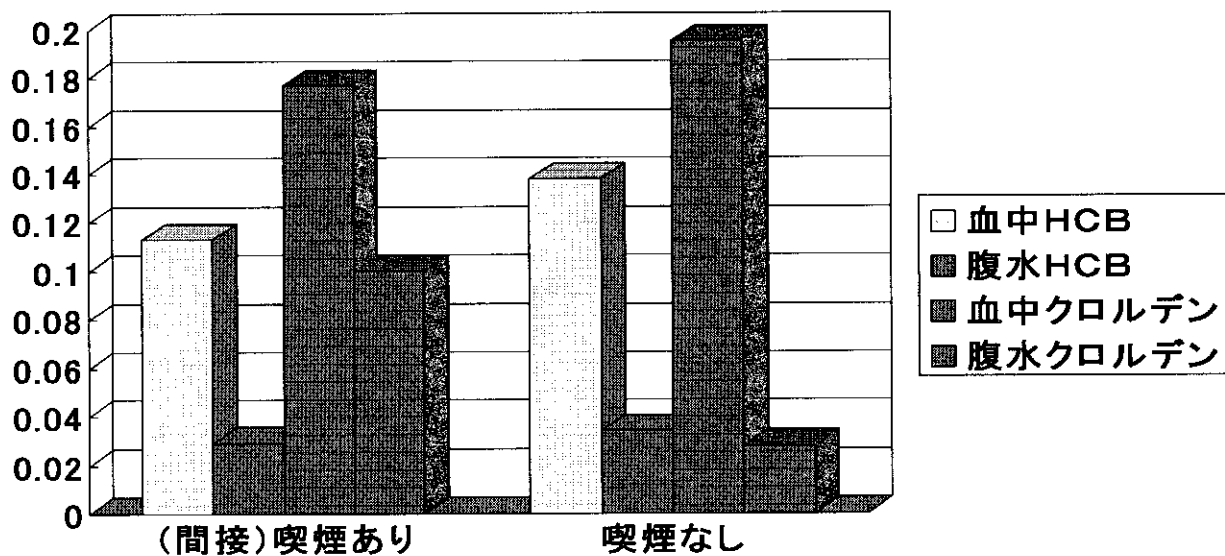


図4 喫煙とクロルデン関連物質

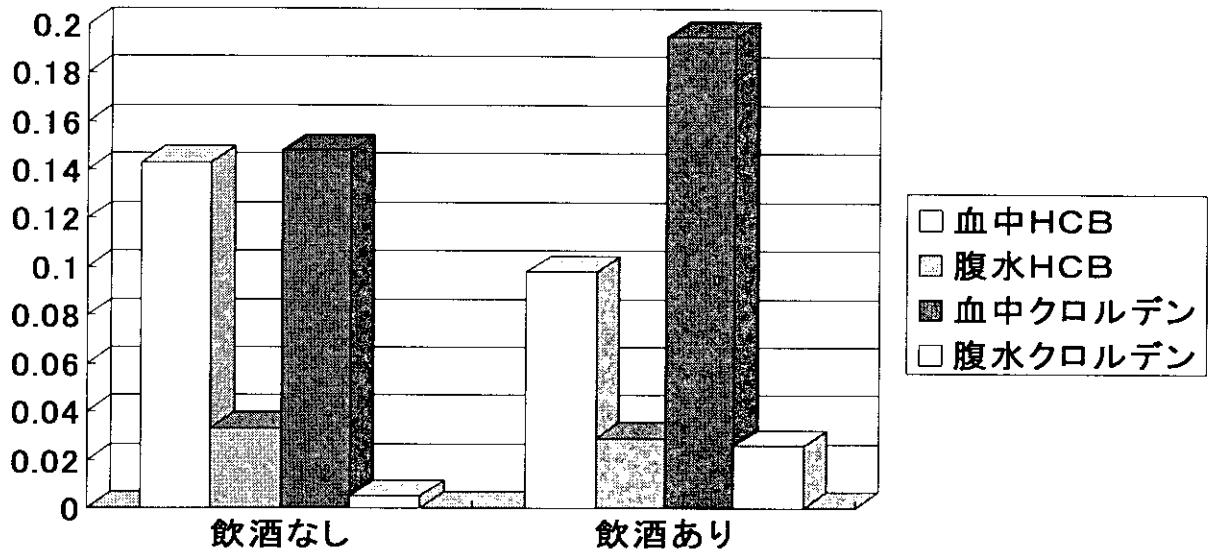


図5 飲酒とクロルデン関連物質

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告書

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評価するに当たって、母体における化学物質の代謝解毒反応、胎盤を介した母体から胎児への移行、および、細胞に対する化学物質の作用機序に関する知見が必要とされる。我々はラットおよびマウスの臓器、細胞を用い、妊娠母体における解毒・代謝機能、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、母体内における化学物質代謝の概要を明らかにし、特に、子宮組織が薬物のバリエーとして機能していることを明らかにした。また、フタル酸エステルがゲノムの DNA メチル化状態を変えることで広範にわたる遺伝子発現に影響を及ぼしている可能性が示された。

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懸念されている。胎児への内分泌かく乱物質の作用を評価する上で、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エーであるので、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。本研究では、母体臓器、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) の代謝産物 Mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP) 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、マウス胎盤の幹細胞を用いた解析を行った。

B. 研究方法

B-1 ラット臓器灌流システム

これまでの研究で確立したラット腸管、胃、

子宮の灌流システムを用い、ビスフェノール A を暴露し、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エ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 MEHP の胎盤細胞分化への作用の解析

0, 0.5, 50, および 500 μM の MEHP 存在下でマウス栄養膜幹細胞 (TS 細胞) を培養し、各種幹細胞マーカー遺伝子、および、分化マーカー遺伝子の発現をノーザンブロッティング法により解析した。

B-4 MEHP の DNA メチル化への作用の解析

1 μM の MEHP 存在下で TS 細胞を培養し、ゲノム DNA を回収した。ゲノム DNA のメチル化状態を Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS) 法により解析した。

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 ラット消化管での代謝解毒酵素活性の解析

これまでの研究により、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、消化管でのビスフェノール A の吸収代謝を知るために、反転腸管と胃灌流実験を行った。胃灌流実験により、小腸大腸には見られなかった素早いビスフェノール A の吸収が観察された。また、胃粘膜上皮細胞における UGT の発現が確認された。

C-2 ラット子宮環境での代謝解毒酵素活性の解析

ラット着床初期の脱落膜細胞と胎盤内上皮細胞に UGT の陽性像が見られた。

ラット子宮内膜上皮細胞の単離・培養に成功し、プレート上で 1-ナフトールを添加したところグルクロン酸抱合活性が検出された。この細胞を用いて発現している UGT を特定し、どのような化学物質をグルクロン酸縫合し解毒する能力があるかを明らかにすることができる。さらに、薬物投与により上皮細胞での UGT の誘導現象を明らかにする。

胎盤での内分泌かく乱物質のバリアー機能解析のために、ラット胎盤を用いた灌流実験システムの確立を試み、胎盤動脈(母親側)に挿入したカニューレからの人工血液の注入に成功した。エバンスブルーを注入した予備実験では、胎盤のバリアー機能が維持されていることが確認された。このシステムを用いることで、ラット胎盤が内分泌かく乱物質のバリアーとしてどの程度機能しているか、もし通過しやすい物質があるとしたらどのような化学構造のものか、などを詳細に検討することが可能である。

C-3 MEHP の胎盤細胞の分化への影響の解析

MEHP 存在下で培養した TS 細胞では、2 つの未分化マーカー遺伝子のうち片方だけに発現の上昇が認められた。一方、分化誘導後は分化マーカー遺伝子の発現が MEHP によっ

て促進されていた(図 1)。これらの MEHP の作用は、従来知られてきた分化の概念では説明できない。MEHP の作用機序の可能性として、細胞のエピジェネティックな状態(DNA メチル化など)を変化させることで分化に影響を及ぼすことが考えられる。

C-4 MEHP による TS 細胞の DNA メチル化への作用の解析

未分化 TS 細胞に MEHP を添加した結果、複数のゲノム領域での DNA メチル化異常がおこる事が明らかになった。またその異常は、メチル化の亢進と阻害の両方があった(図 2)。

D. 結論

これまでの研究の成果により、母体に取り込まれた内分泌かく乱物質の大部分が腸および肝臓で解毒され、さらに子宮でも解毒代謝されることが明らかになった。今後、胃における素早いビスフェノール A の吸収、および、胃粘膜上皮細胞における UGT の発現の役割について検討する必要がある。胎盤灌流システムの確立は、胎児への化学物質の移行に関する知見を得る上で非常に重要である。

TS 細胞に対する MEHP の作用は予想外の結果であった。これは MEHP がゲノム DNA 全体に何らかの修飾をもたらすような作用を有する可能性を示唆していたが、実際にゲノム DNA のメチル化異常が検出されたことの意義は大きい。これまで、内分泌かく乱物質の作用に関するエピジェネティックな側面からの解析はほとんど無く、この結果は、内分泌かく乱作用の研究に一石を投じるものである。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Daidoji T, Inoue H, Kato S, and Yokota H. Glucuronidation and excretion of nonylphenol in perfused rat liver. Drug Metab Dispos. (2003) 31, 993-998.

2. 学会発表

1) 大道寺智・中出圭介・野村幸子・○横田博
ビスフェノール A・DES・ノニルフェノール・
オクチルフェノール・PCBs 水酸化体の代謝動
態とグルクロン酸抱合酵素分子種
第 6 日本環境ホルモン学会（横浜）

2) ○宮庄拓・渡辺剛幸・芝崎道広・横田博海産
魚類の肝臓における薬物代謝酵素
(CYP,UGT,GST) 活性および Co-PCBs 暴露
による影響
第 6 日本環境ホルモン学会（横浜）

3) ○松本順也・井上博紀・山鋪直子・横田博
ビスフェノール A グルクロン酸抱合酵素ラッ
ト子宮上皮細胞内発現と役割
第 6 日本環境ホルモン学会（横浜）

4) ○大道寺智・牛頭圭介・横田博
ラットにおける PCB 水酸化体グルクロン酸抱
合活性の臓器特異性と酵素分子種について
第 6 日本環境ホルモン学会（横浜）

5) ○大道寺智・中出圭介・牛頭圭介・横田博
UDP-glucuronosyltransferase
isoforms(UGT1A6 and UGT2B1)
glucuronidation alkylphenols
第 76 会日本生化学会

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

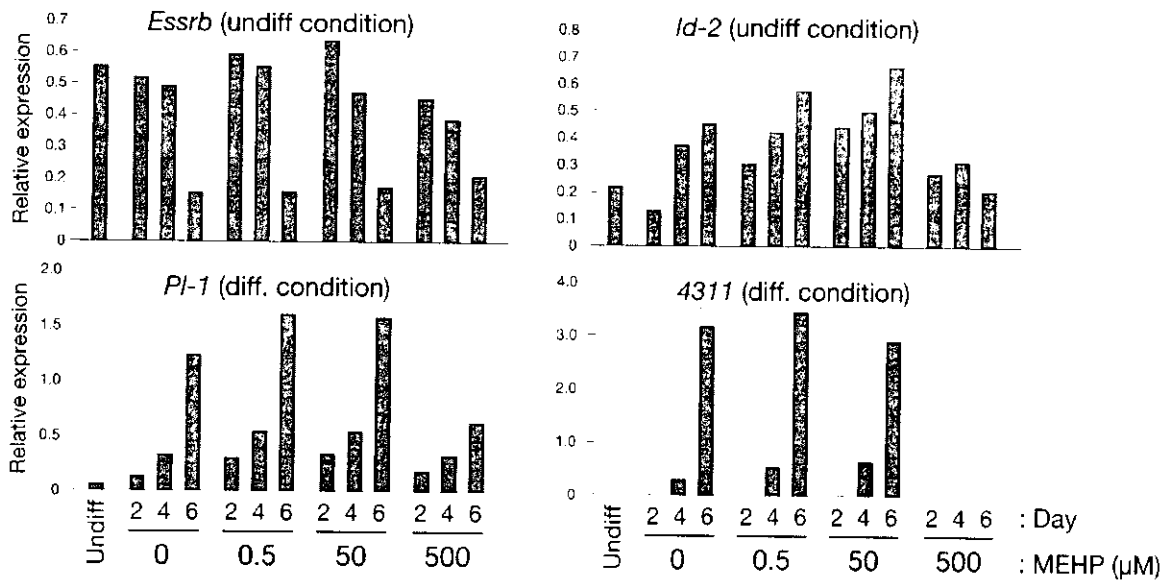


図1 TS細胞における遺伝子発現に対するMEHPの影響

各種濃度のMEHP存在下で培養したTS細胞における、未分化マーカー (*Essrb*, *Id-2*) および分化マーカー (*Pl-1*, *4311*) の発現を解析した。

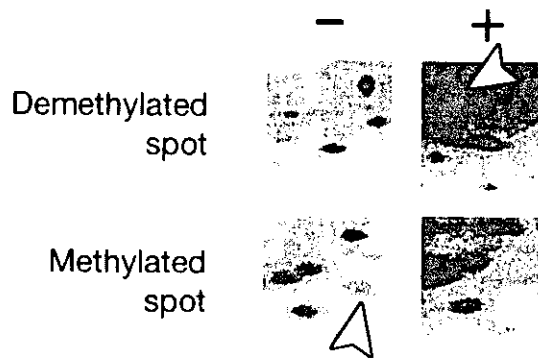


図2 MEHPのDNAメチル化に対する影響

1 μM のMEHP存在下 (+), 非存在下 (-) で培養したTS細胞における, DNAメチル化状態を解析した結果, MEHP添加により脱メチル化される領域 (上段) および, メチル化される領域 (下段) の両方が検出された。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

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 （東海大学医学部基礎医学系）

分担研究者 松坂 恭成 （東海大学医学部基礎医学系）

研究協力者 牧野 恒久 （東海大学医学部専門診療系）

研究協力者 和泉 俊一郎 （東海大学医学部専門診療系）

研究要旨

疾患の発症は、一般に環境要因と遺伝要因の組み合わせによって決定されると考えられている。本研究では、内分泌かく乱化学物質の生体への影響として子宮内膜症を取り上げるが、この疾患については内分泌かく乱化学物質が環境要因として深く関与していることが状況証拠として集積しつつあることは周知の事実となってきた。しかしながら、それでも同一の環境におかれてもやはり本疾患のなりやすさ（疾患感受性）は個人で異なっていると考えられる。

本疾患の発症には、代謝酵素調節を含む種々の細胞表面および細胞内分子が重要であると考え、内分泌かく乱物質の毒性発現に関与する細胞内シグナル伝達経路の構成分子を本疾患の候補遺伝子として選定した。特に、エストロゲン受容体、チトクロム・グルクロン酸抱合酵素、アリルヒドロカーボン受容体の各遺伝子については、遺伝子多型を明らかにすると共に、子宮内膜症に特異的な対立遺伝子を分子遺伝学および統計遺伝学的に解析し、本疾患との関連性を明らかにすることを目的とした。

本年度は、遺伝学的相関解析に用いる遺伝的多型マーカーの有用性を検討するために子宮内膜症患者5名、一般健常者11名の日本人試料を用いて、各一塩基多型（SNP）の対立遺伝子頻度および遺伝子型頻度を解析し、子宮内膜症候補遺伝子内に高度な多型を示す遺伝マーカーの設定を行った。

A. 研究目的

一般にヒト疾患は遺伝要因と環境要因の組み合わせによって規定されると考えられる。現在までに進められてきた疾患の遺伝要因の解析は、単純なメンデル遺伝を示す単一遺伝子

の支配によるものに限定されていた。しかしながら、複数の遺伝的要因が関与する複合性遺伝疾患あるいは、人類集団中において高頻度で見出される通常疾患の原因遺伝子についても、高密度な遺伝的多型マーカーを用いた

遺伝的相関解析を行うことによって、その疾患感受性遺伝子を同定できる可能性が示された。子宮内膜症についても、複数の遺伝的効果が複雑に作用している複合性遺伝疾患であると考えられ、高密度な遺伝的多型マーカーを用いた相関解析によってその遺伝要因を明らかにすることができる可能性がある。この子宮内膜症は、内因性のエストロゲンとの関係が以前から報告されており、内分泌かく乱化学物質が子宮内膜症の発症および病態に何らかの影響を与えることも予想される。

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、その遺伝的背景を明らかにし、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。遺伝的相関解析には、全ゲノム領域を対象として位置的情報のみを手がかりに遺伝的要因を明らかにする方法と、現在までにその遺伝子の機能が解明されており疾患との関連性を考慮して候補遺伝子を選定する、すなわち機能的情報を手がかりに遺伝的要因を明らかにする方法があるが、本研究では後者の方法によって子宮内膜症の遺伝要因に関する情報を蓄積することを目指した。

疾患候補遺伝子として、内分泌かく乱物質の毒性発現に関与する細胞内シグナル伝達経路の構成分子を選定した。今回、対象とした子宮内膜症候補遺伝子は、エストロゲン受容体、チトクロム・グルクロン酸抱合酵素、アリルヒドロカーボン受容体の各遺伝子である。昨年度はこれらの遺伝子について遺伝的多型位置を明らかにし、その遺伝的多型の解析法を確立した。今年度は、候補遺伝子領域を遺

伝的多型の連鎖不平衡によって網羅的に解析するためにさらに遺伝マーカーの設定を継続して行い、子宮内膜症感受性対立遺伝子を同定することを最終目的とした。

B. 研究方法

1. DNA の抽出

インフォームドコンセントの得られたボランティアより末梢血の採取を行った。採血管はヘパリンがその後の酵素反応に影響を与えるためクエン酸主体のものを使用し、10ml を採血した。このうち 0.4ml を用いて、カートリッジ（キアゲン社）による DNA の抽出を行った。得られたゲノム DNA をアガロースゲル電気泳動によりゲノム DNA の定性的判断を行った。さらに、吸光度を測定して DNA 濃度を算出した。

2. DNA 配列情報および一塩基置換 (SNP) の検索

上記 3 遺伝子 (*ESR1*, *CYP11A1*, *AHR*) のゲノム領域内において SNPs の検出を行うために、これらの遺伝子領域を含むゲノム DNA の配列情報が必要となる。ヒトゲノム配列は、GenBankDNA database (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>) より入手した。得られたゲノム配列について、上記 3 遺伝子のエクソン、イントロン、プロモーター領域を明らかにした。SNP のなかには、調節領域に存在する rSNP (regulatory SNP) やコーディング領域に存在する cSNP (coding SNP)、イントロン領域に存在する iSNP (intron SNP)、遺

伝子間の介在領域に存在する gSNP (genomic SNP) がある。これらのうち、直接的に表現型に影響を与える SNPs は、rSNP、cSNP、iSNP であり予めこれらの情報を整理しておくことは、疾患感受性遺伝子のマッピングするうえで大変重要である。

現在までにヒゲノム上で見いだされた SNP についてはデータベースに登録されており、上記3遺伝子領域に存在する SNP についてもこのデータベースを検索することによって SNP の位置を明らかにした (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>)。

3. プライマーの設計

PCR プライマーの設計は、PCR に適した条件を考慮するソフトウェアである「Primer Express」を用いて、SNP を挟み込むようにフォワードプライマーとリバースプライマーの2種類のプライマーを各 SNP ごとに設計した。このソフトウェアは PCR の適した条件の必要事項である T_m 値、GC 含量、プライマー配列の2次構造等を考慮してプライマー配列を選定できるが、反復領域やゲノム上に類似した配列がある場合あるいはプライマー配列内に多型がある場合には PCR 増幅が阻害されるため、できる限り配列情報の検索を行っておくことが重要である (表1参照)。

4 PCR 増幅

ゲノム DNA 10ng を鋳型としてサーマルサイクラー9700 (ABI 社) を用いて PCR 反応を行い、SNP を含むゲノム領域の増幅を行った。増幅断片を 2.0%アガロースゲル電気泳動等に

よって確認した。このとき、予想されるサイズの DNA 断片が検出されなかったり、非特異的 DNA 断片が検出された場合は、PCR 増幅サイクルのうち、アニーリング温度あるいは伸長反応の時間を検討することによって特異的な DNA 増幅の検出を確認した。SNP 検出は、最終段階の塩基配列の決定において偽陽性あるいは偽陰性が検出される場合があるため、PCR 増幅条件を十分に検討することは重要である。

5 塩基配列の決定

増幅 DNA 断片をエクソヌクレアーゼ I および Shrimp アルカリホスファターゼによって精製後、PCR 増幅に用いたプライマーを用いてシーケンシングサイクルを行う。反応後、シーケンシング産物を精製して ABI3100 シーケンサーによって塩基配列の決定を行った。明確な波形データが得られない場合は、入れ子 (nested) プライマーを用いて再度シーケンシングサイクルを行った。

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に十分配慮した。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