

を疑問, 10%以下を不適正としている. このように BSID-II は, 早期の乳児期から運動発達, 精神発達, 行動面を詳細に評価でき, その結果を得点化することのできる有効な検査である. しかし, 日本語での翻訳および標準化はされておらず, それを用いた本邦での報告もない. 我々は, 環境化学物質の次世代への影響を軽度発達障害の発生率との関連から検討する上で, 乳児期の発達状況を詳細に評価でき諸外国での研究結果との比較を行うためにも BSID-II 採用し発達調査を行うこととした.

今年度に行った研究では, ①生後 6 ヶ月で BSID-II を実施し本邦における得点傾向を示すこと, ② BSID-II と同時に本邦において標準化されている日本版デンバー式発達スクリーニング検査 (以下, JDDST) ⁶⁾ の項目についても評価を行い, 2 つの検査の比較を通じて発達診断という観点から BSID-II の妥当性の検討を行うことを目的とした.

B. 方法

対象は札幌市の一般産婦人科病院で出産予定の 23 週~35 週の妊婦に調査を依頼し, 同意を得られた妊婦とその子どもである. 本調査チームが翻訳した BSID-II を用い, 6~7 ヶ月時に児に対し MENTAL, MOTOR の検査を実施する. BRS は, 検査中の子どもの様子について, 検査者が評価するとともに母親からの聞き取りを行う. また, BSID-II と同時に JDDST を実施する. JDDST は BSID-II と同様の検査項目もあるため, BSID-II に含まれていない項目について追加して実施し評価を行う. 検査実施中の様子は母親の同意を得て, ビデオに録画する.

採点方法は, まず検査者が行い, それを元に検査者と他 2 名でビデオを見ながら再度採点の確認を行う.

分析方法は, BSID-II の METAL, MOTOR について, 全対象児, 6 ヶ月用検査を施行した児, 7 ヶ月用検査を施行した児のそれぞれの群について, MENTAL, MOTOR の Index Score より平均点を算出すると共に, classification による分類も行う. BRS

については total 及び各 factor を classification で分類するとともに, BRS と METAL, MOTOR それぞれとの関連性について検討する. BSID-II と JDDST の関連性については, BSID-II から得られた classification による分類と, JDDST から得られた診断結果 (異常, 疑問, 正常, 不能) を基に四分表を作製した. 更に真陽性, 偽陽性, 偽陰性, 真陰性の値から JDDST から見た BSID-II の妥当性を検討した.

(倫理面への配慮)

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. 結果

1. BSID-II における MENTAL, MOTOR の得点結果について

対象児は妊娠・出産時に重度の問題がなく, 在胎週数 37 週以上, 単胎であることとした. その結果, 対象数は 124 名, 男 57 名, 女 67 名であった (以下全対象児群とする). 検査実施時の平均日齢は 189.7 日であった. そのうち, 6 ヶ月の検査項目を実施した児 (5 ヶ月 16 日~6 ヶ月 15 日まで, 以下 6 ヶ月群とする) は 102 名 (男: 47 名, 女: 55 名), 平均日齢 187.0 日であった. 7 ヶ月の検査項目を実施した児 (6 ヶ月 16 日~7 ヶ月 15 日まで, 以下 7 ヶ月群とする) は 22 名 (男: 10 名, 女: 12 名), 平均日齢は 201.9 日であった (Table 1).

全対象児群における Mental Index Score (以下, MDI) は平均 91.0 (SD 5.5), Motor Index Score (以下, PDI) は平均 86.7 (SD 10.5) で,

PDI よりも MDI の方が高いが, 両指標とも標準値 (平均値 100) よりも低い値となっていた. 男児では MDI: 91.2 (SD 5.1), PDI: 85.9 (SD 9.2), 女児では MDI: 90.8 (SD 5.9), PDI: 87.4 (SD 11.4) であり, MDI では男児, PDI では女児の方が統計的有意差はないものの高得点の傾向にあった. 6 ヶ月群では MDI: 91.8 (SD 5.1), PDI: 88.3 (SD 9.8), 7 ヶ月群では

MDI:87.1(SD 5.7), PDI:79.2(SD 10.5)で、6ヶ月群の方が両指標とも有意に得点が高かった($p<0.001$)。6ヶ月群の男児では MDI: 91.6(SD5.4), PDI:87.0(SD9.2), 女児では MDI:91.8(SD4.9), PDI:89.4(SD10.2)で、男女間での違いは認められなかった。7ヶ月群の男児では MDI: 89.0(SD2.5), PDI:80.7(SD7.5), 女児では MDI:85.6(SD7.2), PDI:78.0(SD12.3)で、両指標とも男児の方が高い得点傾向にあったが、統計的有意差は見られなかった (Table 2)。

MDI と PDI との関連では全対象児群($r=0.55$, $p<0.01$), 6ヶ月群($r=0.51$, $p<0.01$) 7ヶ月児($r=0.46$, $p<0.05$)において有意な相関が見られた。検査実施年齢と MDI, PDI のそれぞれの間における関連については、全対象児群の MDI($r=-0.2$, $p<0.05$), PDI($r=-0.22$, $p<0.05$)で有意に負の相関が見られた。7ヶ月群では PDI($r=0.45$, $p<0.05$)で有意に負の相関が見られた。

Classification による分類では、MENTAL では正常以上が 0 名、正常が 112 名(90.3%)、軽度の遅れが 12 名(9.7%)、著しい遅れが 0 名であった。MOTOR では正常以上が 1 名 (0.8%)、正常が 76 名(61.3%)、軽度の遅れが 39 名(31.4%)、著しい遅れが 8 名 (6.5%) であった (Table 3)。

2. BSID-IIにおけるBRS得点結果について

total 及び各 factor を classification で分類した結果、「total」では正常 115 名(92.7%)、疑問 7 名(5.7%)、不適正 2 名(1.6%)であった。factor「検査への適応と取り組み」では正常 113 名(91.1%)、疑問 8 名(6.5%)、不適正 3 名(2.4%)、「感情の調節」は正常 119 名 (96.0%)、疑問 3 名(2.4%)、不適正 2 名(1.6%)、「運動の質」は正常 121 名(97.6%)、疑問 1 名(0.8%)、不適正 2 名(1.6%)であった (Table 4)。

BRS Total classification と MENTAL 及び MOTOR の classification との関連では、BRS の total が不適正または疑問と判定された 9 名全員、MOTOR が軽度の遅れ以下であった。MDI 及び PDI と BRS

total 及び各 factor の percentile との関連について、ピアソンの積率相関係数の検定を行った。その結果、MDI, PDI と BRS total および各 factor において、1% 水準で有意な相関が見られた。

3. BSID-IIと日本版デンバー式発達検査との関連性について

結果 1 で示した対象のうち BSID-II と JDDST の両検査を実施してきた児は 96 名 (男児: 44 名, 女児: 52 名) で、平均日齢は、189.4 日であった。

BSID-II の MDI は平均 91.2 (SD5.7) で、classification では“正常”が 88 名 (91.7%) “軽度の遅れ”が 8 名 (8.3%) であった。PDI は平均 87.1 (SD10.8) で、classification では、“正常以上”が 1 名、(1.0%) “正常”が 60 名 (62.5%)、 “軽度の遅れ”が 29 名 (30.2%)、 “著しい遅れ”が 6 名 (6.3%) であった。JDDST では“正常”が 91 名 (94.8%) “疑問”が 5 名 (5.2%) であった。“疑問”に分類された児は 4 名が粗大運動領域の遅れ、1 名が言語領域の遅れによるものであった。

JDDST からみた BSID-II・MDI の妥当性は 4 分表での分析の結果、真陽性 (JDDST で“疑問”、BSID-II で“遅れ”と判断された児) が 0 名(0%)であった。また、真陰性 (JDDST, BSID-II とともに“正常”と判断された児) は 83 名 (91.2%) であった。JDDST からみた BSID-II・PDI の妥当性は 4 分表での分析の結果、真陽性 (JDDST で“疑問”、BSID-II で“遅れ”と判断された児) が 5 名(100%)であった。また、真陰性 (JDDST, BSID-II とともに“正常”と判断された児) は 61 名 (67.0%) であった (Table 5)。

D. 考 察

1. BSID-IIの本邦における得点傾向について

今回の調査における得点結果は、マニュアル⁴⁾で報告されている平均 100 (SD15) という米国での標準値よりも MENTAL, MOTOR とともに平均点で約 10point 低かった。さらに、男児・女児共に MENTAL

よりも MOTOR で得点が低いという結果であった。この結果は、Walkowiak ら(2001)³⁾の行ったドイツにおける 7 ヶ月児に行った調査結果と同様の傾向が報告されている。また、薬物、重金属などの高濃度暴露の影響がなく、妊娠・出産児にリスクのない健常児を対象に BSID-II を実施しているその他の研究^{7,8,9)}でも、MDI, PDI とともに平均 100 以下であるという報告も散見されている。そのため、BSID-II の標準値に関しては、地域別差異や対象となる健常児の基準に関してさらなる検討が必要であると考えられた。また、先行研究では MDI, PDI の得点差についても報告^{7,8,9)}により異なり、一貫した傾向は見られず、一概に Motor が低得点になるとは言い難い。そのため、このような得点傾向の差異についても育児方法や生活環境などの文化的な影響についても考慮する必要があることが示唆された。

6 ヶ月群と 7 ヶ月群の得点傾向では年齢が高い 7 ヶ月群で得点が低く、その傾向は PDI でより顕著であった。この結果は今回研究対象となった 7 ヶ月群の平均日齢が 202 日と、検査対象日齢である 196～225 日の年齢幅で比較的早期に検査を行っていることが一因と考えられた。そのため、乳児期で発達の変化大きい運動面にその傾向がより大きく影響していることが推測された。

本対象の BRS の classification による結果では、total 及び各 factor とともに対象者の 91～98% が正常という結果であった。Classification と他の課題との関連では、BRS で不適正または疑問となった 7 名全員が PDI で軽度の遅れがあり、行動面に問題のある児は運動面の検査課題の遂行に影響を及ぼしている可能性があると考えられる。また、MDI 及び PDI と各 factor の percentile との関連が認められ、行動面の評価が発達傾向を見る上で重要であることが確認される結果であった。

2. JDDST と BSID-II の関連について

JDDST の発達に関する判定は、MOTOR および

MENTAL のそれぞれの側面においても BSID-II に適切に反映され、JDDST からみて BSID-II は発達の遅れに関する診断において妥当性があることが示唆された。一方、JDDST において“正常”と診断され BSID-II の MOTOR で“遅れ”と診断される不一致が生じていた。MOTOR に関する検査項目は BSID-II が JDDST に比べて項目数が多く、その判定基準も詳細である。従って、本結果は BSID-II がより精度の高い発達検査であるためと考えられるが、一方では対象児間の個人差を“遅れ”と診断していること否定できない。そのため、今後縦断的に対象児の発達状況に関する調査を進めていく事が BSID-II に発達診断の有用性を確認する上でも必要である。

E. 今後の課題

今回は BSID-II を用いて健常 6 ヶ月児に対し、発達評価を試みた。本調査の結果から、米国の標準値よりも低い得点結果となっていた。

また、BSID-II の MOTOR では過剰に“遅れ”と判断する可能性も示唆された。よって、現段階では、発達診断として BSID-II を使用するには問題はあるが、ある集団の発達状況を示す上では使用可能で有益である。更に対象数を増やすと共に、縦断的な調査を進めることにより、本邦での発達評価として更に精度の高い検査として使用可能となっていくと思われる。

F. 引用文献

- 1) Gladen BC, Rogan WJ, Hardy P, et.al. Development after exposure to polychlorinated biphenyls and dichlorodiphenyl dichloroethene transplacentally and through human milk. J Pediatr 1988 Dec;113(6):991-5.
- 2) Koopman-Elseboom C, Weisglas-Kuperus N, de Ridder MA, et.al. Effects of polychlorinated biphenyl/dioxin exposure and feeding type on infants' mental and psychomotor development. Pediatrics 1996 May;97(5):700-6

- 3) Walkowiak J, Wiener JA, Fastabend A, et.al. Environmental exposure to polychlorinated biphenyls and quality of the home environment: effects on psychodevelopment in early childhood. Lancet 2001 Nov 10;358(9293):1602-7.
- 4) Bayley N. Manual for the Bayley Scales of Infant Development Second Edition. New York: The Psychological Corporation:1993.
- 5) Maureen M. Black, Kathleen Matula . Essentials of Bayley Scales of Infant Development II Assessment (Essentials of Psychological Assessment Series): John Wiley & Sons Inc:1999.
- 6) 上田礼子.日本版デンバー式発達スクリーニング検査—JDDST と JPDQ: 医師薬出版株式会社:1980.
- 7) Hamadani JD. Fuchs GJ. Osendarp SJ. Huda SN. Grantham-McGregor SM. Zinc supplementation during pregnancy and effects on mental development and behaviour of infants: a follow-up study. Lancet 2002 Jul 27; 360(9329):290-4.
- 8) Mendelsohn AL. Dreyer BP. Fierman AH. Rosen CM. Legano LA. Kruger HA. Lim SW. Barasch S. Au L. Courtlandt CD. Low-level lead exposure and cognitive development in early childhood. Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics 1999 Dec 20(6):425-31.
- 9) Engle PL. VasDias T. Howard I. Romero-Abal ME. Quan de Serrano J. Bulux J. Solomons NW. Dewey KG. Effects of discontinuing coffee intake on iron deficient Guatemalan toddlers' cognitive development and sleep. Early Human Development 1999 Jan:53(3):251-69.

G. 研究発表

1. 論文発表

- ①ベイリー乳幼児発達検査2による6ヶ月児への発達調査—その1～精神発達、運動発達の結果について～. 作業療法, 23巻 (印刷中)
- ②ベイリー乳幼児発達検査2による6ヶ月児への発達調査—その2～行動面の評価について～. 作業療法, 23巻 (印刷中)
- ③ベイリー乳幼児発達検査2による6ヶ月児への発達調査—その3～デンバーから見た妥当性の検討～. 作業療法, 23巻 (印刷中)

2. 学会発表

1) 第38回日本作業療法学会（平成16年6月）

- ①ベイリー乳幼児発達検査2による6ヶ月児への発達調査—その1～精神発達、運動発達の結果について～
- ②ベイリー乳幼児発達検査2による6ヶ月児への発達調査—その2～行動面の評価について～
- ③ベイリー乳幼児発達検査2による6ヶ月児への発達調査—その3～デンバーから見た妥当性の検討～

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1.各対象群における対象数と平均年齢

		全対象群	6ヶ月群	7ヶ月群
対象数	Total	124 (100.0%)	102 (82.3%)	22(17.7%)
	男	57 (46.0%)	47 (46.1%)*	10(45.5%)*
	女	67 (54.0)	55 (53.9%)*	12(54.5%)*
年齢	Total	189.7(7.2)	187.0(4.1)	201.9(5.4)

*は群内における%
年齢欄の()はSDを示す

Table 2.各対照群におけるMDI, PDIの平均値

		全対象群	6ヶ月群	7ヶ月群
MDI	Total	91.0(5.5)	91.8(5.1)	87.2(5.7)*
	男	91.2(5.1)	91.6(5.4)	89.0(2.3)
	女	90.8(5.9)	91.9(4.9)	85.7(7.2)
PDI	Total	86.7(10.5)	88.3(9.8)	79.2(10.3)*
	男	85.9(9.2)	87.0(9.2)	80.7(7.5)
	女	87.4(11.4)	89.4(10.2)	78.0(12.3)

()はSDを示す

*p<0.001

Table.3 ClassificationによるMenta, Motorの分類

Classification	MENTAL	MOTOR
≤69(著しい遅れ)	0	8(6.5%)
0~84(軽度の遅れ)	12(9.7%)	39(31.4%)
85~114(正常範囲)	112(90.3%)	76(61.3%)
≥115(正常以上)	0	1(0.8%)

Table4. BRS classificationによる結果およびMENTAL,MOTORとの関連について

BSID- II classification		BRS total classification		
		正常(26≤)	疑問(11-25)	不適正(≤10)
MENTAL	正常範囲以上(115≤)	0	0	0
	正常範囲(85-114)	108(87.1)	3(2.4)	1(0.8)
	軽度な遅れ(70-84)	7(5.6)	4(3.2)	1(0.8)
	著しい遅れ(≤69)	0	0	0
MOTOR	正常範囲以上(115≤)	1(0.8)	0	0
	正常範囲(85-114)	76(61.3)	0	0
	軽度な遅れ(70-84)	33(26.6)	4(3.2)	2(1.6)
	著しい遅れ(≤69)	5(4.0)	3(2.4)	0

(N=124)
()はSDを示す

Table 5. JDDSTとBSID- II MENTAL,MOTORの関連性

		BSID- II のMENTALにおけるClassification			
		著しい遅れ (≤69)	軽度な遅れ (70-84)	正常範囲(85- 114)	正常範囲以上 (115≤)
JDDST	疑問	0	0	5	0
		0%		100%	
JDDST	正常	0	8	83	0
		8.8%		91.2%	

		BSID- II のMENTALにおけるClassification			
		著しい遅れ (≤69)	軽度な遅れ (70-84)	正常範囲(85- 114)	正常範囲以上 (115≤)
JDDST	疑問	2	3	0	0
		100%		0%	
JDDST	正常	4	26	60	1
		33.0%		67.0%	

Th1/Th2バランスを客観的に評価する方法の確立

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バランスの評価を行い、各種環境因子との関連を検討することを目的として、血液中のT細胞におけるTh1/Th2バランスを客観的に評価する方法の確立を行った。昨年は、マウスTh1、Th2細胞に特異的に発現する遺伝子を同定し、T細胞集団におけるそれぞれの遺伝子の発現をDNAアレイを用いて測定することによりTh1/Th2バランスを判定する新しい評価法をマウスの系を用いて確立したので、本年度はそれをさらに応用して、ヒトTh1/Th2バランス診断用DNAアレイを作製して、迅速かつ客観的に免疫バランスを評価することを目的とした。

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バランスの評価を行い、各種環境因子との関連を検討することを目的とする。このために、ヒト血液中のT細胞におけるTh1/Th2バランスを客観的に評価する方法の確立を目指して研究を行った。

B. 研究方法

健常人CD4⁺CD62L⁺CD45RA⁺ナイーブT細胞を分取し、5g/ml 固相化抗CD3抗体(PharMingen)処理し、さらに抗CD28抗体を加えTh1/Th2それぞれに条件で誘導した。誘導したTh1およびTh2細胞は細胞内染色を行い、それぞれについて細胞内分泌型のIL-4(PharMingen)とIFN- γ (PharMingen)産生を確認した。

Th1およびTh2細胞から、ISGENを用いたAGPC法によりtotal RNAを抽出して、Th1/Th2特異的に発現している遺伝子をさらに選別・追加するためにHuman cDNAアレイフィルター(TOYOBO Immunology Array Filter)にて比較分析を行い、差があった遺伝子についてRT-PCR法を用いて再度確認した。

ヒトTh1およびTh2に対して、特異的に発現差が

あった遺伝子についてナイロン膜にスポットしフィルターを作成した。

C. 研究結果

昨年、マウスにおいて作成したcDNAアレイフィルターにてTh1/Th2バランスの診断が可能である事が確認できたので、ヒトへ診断応用するためにヒト専用のフィルターを作成した。この時、市販のTOYOBOフィルター(Immunology)を用いて、Th1及びTh2特異的に発現している遺伝子をさらに選別し、RT-PCRによって確認した。その結果、Th1, Th2合わせて19個の特異的に発現している遺伝子を追加することができ、最終的に76の遺伝子を作成フィルターに追加することができた。次に、マウスと同様にヒト末梢血のナイーブT細胞よりTh1およびTh2細胞を誘導し、作成したフィルターを用いて解析したところ、これもTh1/Th2特異的に発現している事をフィルターにて確認できた。以上より、ヒトTh1/Th2バランス診断に応用可能なヒトDNAアレイが作製できた。今後は、Th1特異的といわれる多発性硬化症(Multiple sclerosis: MS)患者末梢血をもちいて解析することで、ヒトにおいてもTh1/Th2バランス診断が可能か否かを検討する。

（倫理面への配慮）

臨床サンプルの採取に関しては、すでに北大医学部および北大遺伝子病制御研究所倫理委員会の承認を得ている。

D. 考 察

マウスとヒト Th1, Th2 特異的遺伝子の中には、発現パターンが全く逆のものが存在した。この事実は、マウス評価系のみを用いて環境化学物質のヒト免疫バランスに対する評価はできない可能性もあることを示唆している。

E. 結 論

今年度の研究でヒト免疫バランスの診断に有用な DNA アレイフィルターが開発された。今後は、多発性硬化症やアトピー性皮膚炎などの免疫バランス異常に起因した疾患患者の末梢血を用いて、本フィルターが免疫バランスの診断に有用か否かを明確にさせる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamamoto, S., Tsuji, T., Matsuzaki, J., Zhange, Y., Togashi, Y., Sakikawa, K., Sawada, K., Takeshima, T., Koike, T., Nishimura, T. Unexpected Role of TNF- α in Graft Versus Host Reaction (GVHR): Donor-Derived TNF- α Suppresses GVHR via Inhibition of IFN- γ -dependent Donor Type 1 Immunity. *Int. Immunol.* 2004 In press.
2. Fujimura, T., Chamoto, K., Tsuji, T., Sato, T., Yokouchi, H., Aiba, S., Tagami, Y., Tanaka, JI, Imamura, M., Togashi, Y., Koda, T., Nishimura, T. Generation of Leukemia-Specific T-Helper Type 1 Cells Applicable To Human Leukemia

Cell-Therapy. *Immunol. Letters*, 2004. in press.

3. Li, J., Koda, T., Yamaguchi, A., Yamamoto, S., Sato, T., Togashi, Y., Nishimura, T. Identification of Th1- and Th2-specific Genes by Microarray Analysis. *Biomedical Res.* 24(6):299-307, Dec., 2003.
4. Sato, T., Saito, R., Jinushi, T., Tsuji, T., Matsuzaki, J., Koda, T., Nishimura, S., Takeshima, H., Nishimura, T. IFN-gamma-induced SOCS-1 regulates STAT6-dependent eotaxin production triggered by IL-4 and TNF-alpha. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Feb 6; 314(2): 468-75.
5. Gyobu, H., Tsuji, T., Suzuki, Y., Ohkuri, T., Chamoto, K., Kuroki, M., Miyoshi, H., Kawarada, Y., Katoh, H., Takeshima, T., Nishimura, T. Generation and targeting of human tumor-specific Tc1 and Th1 cells transduced with a lentivirus containing a chimeric immunoglobulin T cell receptor. *Cancer Res.* 2003 Feb 15;64(2) :1490-1495, 2003.
6. Chamoto, K., Tsuji, T., Funamoto, H., Kosaka, A., Matsuzaki, J., Sato, T., Abe, H., Fujio, K., Yamamoto, K., Kitamura, T., Takeshima, T., Togashi, Y., and Nishimura, T. Potentiation of Tumor Eradication by Adoptive Immunotherapy with T-cell Receptor Gene-Transduced T-Helper Type 1 Cells. *Cancer Res.* 2004 Jan 1; 64(1): 386-390.
7. Chamoto, K., Kosaka, A., Tsuji, T., Matsuzaki, J., Sato, T., Takeshima, T., Iwakabe, K., Togashi, Y., Koda, T. and Nishimura, T., Critical Role of Th1/Tc1 Circuit for the Generation of Tumor-specific CTL during Tumor Eradication in vivo by Th1-cell Therapy, *Cancer Science*, 94(10), 924-928, Oct. 2003.

8. Matsuzaki, J., Tsuji, T., Chamoto, K., Takeshima, T., Sendo, F., Togashi, Y. and Nishimura, T., Successful elimination of memory-type CD8+ T cell subsets by the administration of anti-Gr-1 monoclonal antibody in vivo, *Cellular Immunol.*, 224(2) 98-105, 2003.
 9. Sato, M., Chamoto, K., and Nishimura, T., A novel tumorvaccine cell therapy using bone marrow-derived dendritic cell type 1 and antigen-specific T helper type 1 cells, *Int. Immunol.*, 15(7), 837-843, Jul. 2003.
 10. Sasaki, K., Tsuji, T., Jinushi, T., Matsuzaki, J., Sato, T., Chamoto, K., Togashi, Y., Koda, T., and Nishimura, T., Differential regulation of VLA-2 expression on Th1 and Th2 cells: a novel marker for the classification of Th subsets. *Int Immunol.* 2003 Jun; 15(6): 701-10.
 11. Tsuji, T., Chamoto, K., Funamoto, H., Kosaka, A., Matsuzaki, J., Abe, H., Fujio, K., Yamamoto, K., Kitamura, T., Togashi, Y., Koda, T. and Nishimura, T., An efficient methods to prepare T cell receptor genetransduced cytotoxic T lymphocytes type 1 applicable to tumor gene cell-therapy. *Cancer Science*, 94(4), 389-393, Apr. 30, 2003.
 12. Sekimoto, M., Tsuji, T., Matsuzaki, J., Chamoto, K., Koda, T., Nemoto, K., Degawa, M., Nishimura, S. and Nishimura, T., Functional expression of TrkC gene encoding a high affinity receptor for NT-3 in antigen-specific T helper-type 2(Th2) cells. *Immunology letters*, 88(2003), 221-226, 2003.
2. 学会発表
1. 西村孝司：「癌の Th1 細胞治療における DC/Th 細胞相互作用の重要性」，第 14 回日本樹状細胞研究会・シンポジウム“樹状細胞を用いた細胞免疫療法のシンポ”，福岡市（西鉄グランドホテル），2003 年 6 月 6 日
 2. 西村孝司：「Development of a novel tumor-cell therapy by adoptive transfer with Th1 cells」，第 23 回札幌がんセミナー国際シンポジウム，札幌市（ロイトン），2003 年 7 月 31 日
 3. 西村孝司：「免疫バランス制御における樹状細胞サブセットの重要性」，日本臨床免疫学会，東京，2003 年 10 月 10 日
 4. 西村孝司：「The critical role of DC1/Th1 cell-cell interaction for the initiation of antitumor immunity invivo（生体内抗腫瘍免疫誘導における DC1/Th1 細胞相互作用の重要性）」，the 34th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund “TUMOUR VACCINE”(tentative), 11/11-13 (2003)
 5. 西村孝司：「免疫バランスの制御と疾患」，第 33 回日本免疫学会総会・学術集会，2003 年 12 月 8-10 日
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）
1. 特許取得
癌抗原非特異的な T 細胞の製造方法及び医薬
出願番号：特願 2003-424938 (2003)

標準的 T 細胞の製造方法及び医薬
出願番号：特願 2003-424919 (2003)

改変標的化 T 細胞の製造方法及び医薬
出願番号：特願 2003-425009 (2003)
 2. 実用新案登録
 3. その他

ダイオキシンなど環境化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

胎便中ダイオキシン類測定による胎内曝露評価および新生児異常との関連解析

分担研究者 水上 尚典 北海道大学大学院医学研究科 教授
(生殖・発達医学講座周産期医学分野)

研究要旨

ダイオキシン・コプラナ PCB は、ヒト母乳、分娩時臍帯血、母体血、羊水に検出されることが近年明らかになってきた。早期新生児の胎便中のダイオキシン・コプラナ PCB を測定し、ヒト胎児の曝露状態を明らかにすることと、新生児甲状腺機能との関連を明らかにすることを目的とした。授乳前に新生児から専用容器で胎便を採取した。分娩時臍帯血 (n=5) および哺乳前の新生児期胎便 (n=7) を採取保存し、ガスクロマトグラフィー法により検体中の PCDDs+PCDFs, co-PCBs の濃度測定を実施した。妊娠初期母体血と新生児血液の TSH, FT4 は濾紙血を用いて測定した。新生児 7 人から 5.7-17.5 (中央値 10.9) g の胎便が採取可能であった。これら胎便の脂肪濃度は 15.3-39.9 (30.4) mg/g であった。胎便中の PCDDs+PCDFs, co-PCBs および総ダイオキシン類濃度は、それぞれ 1.4-9.8 (3.8), 0.7-6.2 (3.7), 2.1-16.0 (7.5) pg-TEQ/g-fat であった。このうち 5 人の臍帯血中 PCDDs+PCDFs, co-PCBs および総ダイオキシン類濃度は、0.8-11 (3.3), 1.5-13 (4.3), 2.6-24 (10.5) pg-TEQ/g-fat であった。胎便の総ダイオキシン類濃度は、臍帯血濃度の 61.7-145% を示した。5 組の臍帯血と胎便中総ダイオキシン類濃度の比較では、関連を認めなかった。

胎便中総ダイオキシン類濃度と新生児 FT4 値との間に相関を認めた ($p<0.05$)。母体血 FT4, TSH, 新生児 TSH 値との間に関連を認めなかった。胎便中の脂肪濃度は高いものの、夾雑物が多いためダイオキシン類抽出は容易ではなかった。胎児ダイオキシン曝露と内分泌学的異常、特に新生児甲状腺機能亢進と関連する可能性があると考えられる。

(研究協力者)

山田 秀人 北海道大学大学院医学研究科

A. 研究目的

ダイオキシン類 (PCDDs, PCDFs, coplanar PCBs) は、生体内で aryl hydrocarbon receptor を介した肝毒性、発癌性、催奇性や免疫機能低下などの作用を有する。雌動物に対する影響として、子宮内膜症の発生、子宮内膜細胞の増殖促進、胸腺萎縮

など、また、次世代への影響として外陰部奇形、腔の糸状構造化、腔尿道間の短小化、腔開口遅延、卵巣重量減少、排卵率減少、卵胞形成の抑制などが危惧されている。近年、母体血、臍帯血、臍帯組織、羊水や母乳中にダイオキシン類が検出されることが明らかとなった。しかしながら、胎便中のダイオキシン類濃度については、これまでに報告はない。ダイオキシン類は脂溶性が高いことが知られているが、胎便は胎児が長期間にわたり腸管内に蓄積する細胞

成分や粘液に富む物質で、脂肪成分を多く含む。胎便は、羊水や血液のように循環排泄されないため、環境ホルモンの胎内曝露評価の試料として有用かもしれない。

本研究では、早期新生児の胎便中のダイオキシン・コプラナ PCB を測定し、ヒト胎児の曝露状態を明らかにすること、新生児異常（発育、神経学的所見）や内分泌学的、免疫学的所見との関連を明らかにすることを目的とした。臍帯血中ダイオキシン類濃度との比較や甲状腺機能との関連を調べた。

B. 研究方法

授乳前に新生児から専用容器で胎便を採取し、厚生省医薬局「ダイオキシン類の測定暫定マニュアル」の則った GC/MS 法によって測定した。

母親から文書で同意を取得し、分娩時臍帯血（n=5）および哺乳前の新生児期胎便（n=7）を採取保存した。ガスクロマトグラフィー法により検体中の PCDDs+PCDFs, co-PCBs の濃度測定を実施した。測定結果を脂肪重量換算し、WHO-TEF（1998）による毒性等量（pg-TEQ/g-fat）として表した。妊娠初期母体血と新生児血液の TSH, FT4 は濾紙血を用いて測定した。

（倫理面への配慮）

インフォームドコンセントは、研究実施時点で北海道大学で通例行われている方法に則り、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にな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い、対象者が研究に参加することによって不利益を被ることがないよう配慮する。

C. 結果

新生児 7 人から 5.7-17.5（中央値 10.9）g の胎便が採取可能であった。

1) これら胎便の脂肪濃度は 15.3-39.9（30.4）mg/g であった。胎便中の PCDDs+PCDFs, co-PCBs

および総ダイオキシン類濃度は、それぞれ 1.4-9.8（3.8）、0.7-6.2（3.7）、2.1-16.0（7.5）pg-TEQ/g-fat であった。

2) このうち新生児 5 人から 13.8-19.9（16.5）ml の分娩時臍帯血を採取し、その血液中の脂肪濃度は 2.1-2.9（2.6）mg/g であった。5 人の臍帯血中 PCDDs+PCDFs, co-PCBs および総ダイオキシン類濃度は、0.8-11（3.3）、1.5-13（4.3）、2.6-24（10.5）pg-TEQ/g-fat であった。

3) 胎便と臍帯血が採取された 5 組の比較において、胎便中の総ダイオキシン類濃度は、臍帯血中濃度の 61.7-145%を示した。Wilcoxon 符号付順位検定で有意な差は認められなかった。

4) 胎便中総ダイオキシン類濃度と新生児 FT4 値（n=7）との間に Spearman 順位相関で有意差（p=0.036）が認められ、回帰分析では正の相関（p=0.96, r²=0.46）が観察された。しかし、母体 TSH, 母体 FT4, 新生児 TSH 濃度との関連は認められなかった。

D. 考案

内分泌攪乱物質、特にダイオキシン・コプラナ PCB は、近年ヒト母乳、分娩時臍帯血および母体血中に検出されることが明らかになってきた。しかしながら、胎児曝露の評価という観点からは、血液検体はダイオキシン類の胎盤での母児間クリアランスが不明なことなど問題点も多い。また、脂肪性分が少ない羊水中のダイオキシン類については、20-40ml 程度の羊水量では検出不能であることを我々はすでに経験している。また、胎児曝露を臍帯血、母体血、羊水の 3 種を用いて評価することは極めて煩雑である。

当初、胎便中のダイオキシン・コプラナ PCB の測定は、より胎内での曝露環境を反映し、羊水量変化による濃度バイアス、血液検体での胎盤クリアランスなどの問題点が少ないと思われた。これまで、脂溶性が高いダイオキシン類を早期新生児の胎便を用いて検出し測定した報告は未だなされていない。

今回の研究によって、ダイオキシン・コブラナ PCB が胎便中に検出されることが初めて明らかとなった。胎便の総ダイオキシン類濃度と臍帯血濃度との間に関連を認めなかった。また、測定準備にあたり、胎便から脂肪を抽出する効率が良くないことを経験した。例数が少ないが、胎便中総ダイオキシン類濃度と新生児 FT4 値との間に正の相関が認められたことから、胎内ダイオキシン類曝露は、新生児甲状腺機能亢進と関連する可能性があると考えられる。

E. 結 論

新生児胎便中に臍帯血中レベルと同等のダイオキシン類が検出されることがはじめて明らかとなった。胎便中の脂肪濃度は高いものの、夾雑物が多いためダイオキシン類抽出は容易ではなかった。胎児ダイオキシン曝露と内分泌学的異常、特に新生児甲状腺機能亢進と関連する可能性があると考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamada H, Morikawa M, Furuta I, Kato EH, Shimada S, Iwabuchi K, Minakami H: Intravenous immunoglobulin treatment in women with recurrent abortions: Increased cytokine levels and reduced Th1/Th2 lymphocyte ratio in peripheral blood. *Am J Reprod Immunol* 2003; 49: 84-89.

Morikawa M, Yamada H, Kato EH, Shimada S, Sakuragi N, Fujimoto S, Minakami H: Live birth rate varies with gestational history and etiology in women experiencing recurrent spontaneous abortion. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 109: 21-26.

Yamada H, Kato EH, Morikawa M, Shimada S, Saito H, Watari M, Minakami H, Nishihira J: Decreased serum levels of macrophage migration inhibition factor in miscarriages with normal chromosome karyotype. *Hum Reprod* 2003; 18: 616-620.

Shimada S, Iwabuchi K, Watano K, Shimizu H, Yamada H, Minakami H, Onoe K: Expression of allograft inflammatory factor-1 in mouse uterus and poly (I:C)-induced fetal resorption. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50: 104-112.

Shimada S, Iwabuchi K, Kato EH, Morikawa M, Sakuragi N, Onoe K, Minakami H, Yamada H: No difference in natural-killer-T cell population, but Th2/Tc2 predominance in peripheral blood of recurrent aborters. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50: 334-339.

Morikawa M, Yamada H, Okuyama K, Kato EH, Watari M, Kataoka S, Cho K, Minakami H: Prenatal diagnosis and fetal therapy of congenital cystic adenomatoid malformation of the lung: a report of five cases. *Congenital Anomalies* 2003; 43: 72-78.

Yamada H, Atsumi T, Kato EH, Shimada S, Morikawa M, Minakami H: Prevalence of diverse anti-phospholipid antibodies in women with recurrent abortion. *Fertil Steril* 2003; 80: 1276-1278.

Yamada H, Morikawa M, Kato EH, Shimada S, Kobashi G, Minakami H: Preconceptional natural-killer-cell activity and percentage as predictors of biochemical pregnancy and

spontaneous abortion with normal chromosome karyotype. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50: 351-354.

Yamada H, Kato EH, Morikawa M, Shimada S, Ebina Y, Sakuragi N, Suzuki S, Minakami H: Anti-cardiolipin β 2-glycoprotein I antibody: Is a high titer related to pregnancy complication? *Semin Thromb Hemost* 2003; 29: 639-644.

Yamada H, Sata F, Kato EH, Saijo Y, Kataoka S, Morikawa M, Shimada S, Yamada T, Kishi R, Minakami H: A polymorphism in the CYP17 gene and intrauterine fetal growth restriction. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 49-53.

Kataoka S, Sawai H, Yamada H, Kanazawa N, Koyama K, Nishimura G, Morikawa M, Sakuragi N, Minakami H: Radiographic and genetic diagnosis of sporadic hypochondroplasia early in the neonatal period. *Prenatal Diag* 2004; 24: 45-49.

Yamada H, Morikawa M, Furuta I, Kato EH, Shimada S, Sata F, Kishi R, Minakami H: Circulating cytokines during early pregnancy in women with recurrent spontaneous abortion. *Hokkaido Igaku Zasshi* 2004; 79

Yamada H, Shimada S, Kato EH, Morikawa M, Iwabuchi K, Kishi R, Onoé K, Minakami H: Decrease in a specific killer cell immunoglobulin-like receptor on peripheral natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortion of unexplained etiology. *Am J Reprod Immunol* (2004, in press)

Shimada S, Kato EH, Morikawa M, Iwabuchi K, Nishida R, Kishi R, Onoé K, Minakami H,

Yamada H: No difference in natural-killer or natural-killer-T cell population, but aberrant T helper population in the endometrium of women with repeated miscarriage. *Hum Reprod* (2004, in press)

Kobashi G, Hata A, Ohta K, Yamada H, Kato EH, Minakami H, Fujimoto S, Kondo K: A1166C variant of angiotensin II type 1 receptor gene is associated with severe hypertension in pregnancy independently of T235 variant of angiotensinogen gene. *J Hum Genet* (2004, in press)

Yamada H, Sata F, Saijo Y, Kishi R, Minakami H: Genetic factors of fetal growth restriction and miscarriage. *Semin Thromb Hemost* (2004, in press)

山田秀人, 森川 守, 島田茂樹:
免疫グロブリン大量療法, 今日の生殖医療,
産婦人科治療, 増刊号 88(3), 101-104, 2004

2. 学会発表

Yamada H, Sata F, Kato EH, Saijo Y, Kataoka S, Morikawa M, Shimada S, Kishi R, Minakami H: A polymorphism in the CYP17 gene and fetal growth restriction. 6th World Congress of Perinatal Medicine, (September 13-16, Osaka) 2003

山田秀人:
自己免疫疾患合併妊娠の管理,
北海道産婦人科医会学術研修会, 学術研修講演(札幌, 6月14日) 2003年

山田秀人, 佐田文宏, 西條泰明, 平山恵美, 島田茂樹, 森川 守, 岸 玲子, 水上尚典:
習慣流産と遺伝子多型: GSTM1, CYP17, IL-6,

第18回日本生殖免疫学会，（山口，11月28-29日）

2003年

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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

cytochrome 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、多くの外来異物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分子種が報告されている。P450 はダイオキシン類や PCB、フタル酸エステルなどの外来異物によって発現が誘導される。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。そこで、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本研究の目的とした。今年度は採集したサンプルの中で、化学分析を行う母体血サンプルについて、CYP1 ファミリーの代謝活性の測定および mRNA 発現量の定量を行った。

また、一方で、CYP 遺伝多型による代謝能の違いは薬物や環境化学物質の薬効・毒性を決定する重要なファクターとなっている。P450 には様々な分子種が存在するが、CYP の遺伝多形によって、薬物を中心とした外来異物のクリアランス、毒性発現が異なることが報告されている。そこで、P450 及びその制御機構に存在する遺伝多形について、新規 SNPs 解析方法の開発を試みた。本研究では、異物代謝酵素群及びその調節因子の遺伝的多形を一度に解析するために、新規マイクロアレイを完成した。

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

cytochrome 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、多くの外来異物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

百に及ぶ分子種が報告されている。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 ; NR1I2) 、 CAR (constitutive androstane receptor; NR1I3) 、 PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) が知られている。これらの受容体群は、ダイオキシン類や PCB、フタル酸エステル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。そこで、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本研究の目的とする。

一方、P450 発現レベルや活性に影響する因子として、外来環境汚染物質以外に、P450 やその調節因子の遺伝多形があげられる。そこで、調節因子の遺伝多形と P450 発現レベルとの関係、P450 遺伝多形と活性の関係、これら調節因子や P450 の遺伝多形が生体に及ぼす影響、などについて明らかにする。解析方法として、アレイを作成し、代謝酵素の多形解析方法を簡便に検出できるシステムを構築する。作成したアレイは、環境汚染物質の代謝だけではなく、薬物代謝酵素の遺伝多形解析にも用いることができるため、投薬などの臨床にも応用することができる。

B. 研究方法

1. 全血液画分における CYP1A 依存代謝活性

ダイオキシン類や多環芳香族などの環境化学物質の曝露によって CYP1 ファミリーの発現が上昇することが知られている。特に、血液中には、CYP1B1 の発現が高いとの報告もあり、これら血液中の CYP1 ファミリーが環境化学物質への曝露の指標となる可能性が考えられる。CYP1A1 および CYP1B1 依存の代謝にはエトキシレゾルフィン O 脱エチル化 (EROD)、エトキシクマリン O 脱エチル化があげられる。EROD 活性は代謝物レゾルフィンの蛍光を検出することで測定することができる(励起 550nm、蛍光 590nm)。そこで、全血液画分における EROD 活性について測定した。

また、蛍光よりも感度の良い方法として発光測定があげられる。最近、CYP1A1 および CYP1B1 の新規発光基質が報告された。

Luciferin6'chloroethylether は CYP1A1 および CYP1B1 によってルシフェリンに変換され、その代謝物ルシフェリンをルシフェラーゼで測定することで CYP1A1 および CYP1B1 依存の代謝活性を検出することができる。そこで、この基質についても全血液画分における代謝活性について、測定した。

2. real time RT-PCR による血液 CYP1A1 発現測定

ABI7700 を用いて、SYBR Green による real-time RT-PCR を行い、CYP1A1 mRNA 発現量を測定した。母体血 25 サンプルから ISOGEN によって total RNA を抽出し、oligo dT プライマーを用いて RT 反応を行い cDNA を合成した。cDNA を鋳型として ABI7700 による real-time PCR を行った。

内在性コントロールとして GAPDH を用いた。

3. 薬物代謝酵素の遺伝的多形解析方法の新規開発

薬物代謝酵素に存在する遺伝的多形を簡便に調べる為に、マイクロアレイを用いた方法の開発を試みた。マイクロアレイ法ではサーマルサイクラー以外の特殊な機械を必要とせず、発色によって変異アレルを検出することができ、また、一度に多数の遺伝子について調べることができる。また、PCR 簡略化によって、PCR-RFLP 法よりも簡便に遺伝多形の検出を行うことができる可能性がある。

そこで、P450 などの薬物代謝酵素から、実際に function につながる変異であること、日本人に多型が多い変異であること、を考慮してアレルを選定し、マイクロアレイの作成を行った。

(倫理面への配慮)

動物を用いた全ての実験は北海道大学および同大学大学院獣医学研究科の定める実験ガイド

ラインに従って研究を実施した。動物実験計画の立案は、動物の導入から、飼育、実験操作、終了後の処置までを、科学的にはもとより動物福祉の観点に立って十分な検討を行い、動物実験の範囲を研究目的に必要な最小範囲にとどめるため実験操作の十分な検討を行った。また、遺伝子解析に関する本研究は、北海道大学大学院医学研究科倫理委員会および遺伝子解析審査小委員会に従って実施し、インフォームドコンセントは「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」およびヘルシンキ宣言に基づいて行った。

C. 研究成果

1. 全血液画分における CYP1A 依存代謝活性
反応時間 0 から 90 分間において、全血液を用いた反応系ではまったく EROD 活性を検出できなかった。

また、母体血における CYP 1 A1 および CYP1B1 の新たな発光基質である Luciferin6'chloroethylether 代謝活性は、反応時間を 0-90 分まで変えて測定したところ、反応 90 分においてわずかな活性が検出された（図 1）。しかし、母体血においては再構成系における CYP1A1、CYP1B1（0.5-1pmol）依存の代謝活性や、無処置ラット肝ミクロソームにおける活性の約 2 万-20 万分の 1 程度であった。また、約 20 の血液サンプルの中では、代謝活性が検出できないサンプルもあった。

2. real time RT-PCR による血液 CYP1A1 発現測定

各サンプルの CYP1A1 発現量を図に示す（図 2）。今回 mRNA 量を定量したサンプルのうち、ダイオキシン類の分析を行ったものは 13 サンプルであった。図には示さないが、TEQ 値と CYP1A1 発現量との間に顕著な相関は得られなかった（ $R^2=0.0272$ ）。

3. 薬物代謝酵素の遺伝的多形解析方法の新規開発

P450 は CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2A6、CYP2C19、CYP2D6、その他の薬物代謝酵素や調節因子として、GSTM1、GSTP1、NAT2、AhR、PPAR の 11 遺伝子、の 32 アレルをリストアップした（表 1）。

変異場所の増幅に PCR を用いるため、multiplex PCR による条件設定を行ったところ、GST null や CYP2D6 deletion に関しては遺伝多型の検出が困難だった為、これらのアレルを除いた遺伝子について wild、変異アレルの DNA を合成してスライドグラスにスポットティングし、マイクロアレイを作成した。Primer は PCR 産物が数 100bp 以内になるように設計し、multiplex PCR を 3 回に分けて行った。得られた PCR 産物は、混合してスライドグラス上のオリゴ DNA にハイブリダイズし、ペルオキシダーゼによって発色させ、アレルの判定を行った。変異アレルおよび wild のポジティブコントロールでは、ハイブリダイゼーション・発色によって genotype の判定を行うことができた。そこで、実際に母体血を用いて genotype の解析を行った。

10 人分の母体血液 50ul より各々 genome DNA を抽出し、multiplex PCR を行った。multiplex PCR 時の PCR 産物を電気泳動したところ、primer の組み合わせに特異的なバンドが得られた（図 3）。PCR 産物をアレイに 2 時間ハイブリダイゼーションさせ、wash の後、30 分間発色させた。特別な機器は使用せず、遠心機とサーマルサイクラー、恒温槽のみを実験に用いた。

発色後、各々の genotype を判定した。肉眼でも判定は可能であったが、拡大レンズを用いて確定した（図 4）。スキャナーあるいはデジタルカメラでの撮影でも、より簡便に genotype を判別することができた。

CYP2A6 の wild type と deletion type につい

ては擬陽性が濃く、判定が難しかった。AhR wild と R554K アレルについても、一部、判定の難しいサンプルがあった。その他の遺伝子については、染色状態がよければほぼ簡単にアレルを判定することができた。debrisoquine や bunitrolol、bufuralol、propranolol などの薬物代謝活性は日本人や中国人において白人よりも低く、その低活性の原因が CYP2D6 遺伝的多形に起因することも報告されている。今回のアレイでは、日本人の低活性の原因といわれる CYP2D6*10 については、シグナルの弱いサンプルがあったが、判定は可能であった。また、直接 P450 など薬物代謝とは関連しないが PPAR γ 変異アレルについても、シグナルは弱いが判定可能であった。これまでに、CYP1A1 遺伝多形と肺癌、CYP1B1 遺伝多形と大腸癌発生率との関係が報告されている。CYP1A1 2455A>G、CYP1B1 355G>355T、CYP1B1 432C>G についても今回のアレイで変異アレルを判定することができた。その他、表 1 に挙げた遺伝子 CYP2C19 の 636 番目塩基 G>A と 681G>A、CYP1A2、NAT2、CYP2A6 の 1412T>C、GSTP の A>G などについて、スポットの染色も良く判定が容易であった。

D. 考 察

CYP1 ファミリーの血液サンプルについて、全血では活性の測定が難しかった。Real-time RT-PCR による母体血 CYP1A1 mRNA 発現レベルの定量では、個体差が大きい上に、CYP1A1 mRNA の発現量は非常に低かった。今回のサンプルでは、ダイオキシン類と TEQ 値との相関は得られなかったが、CYP1A1 発現量に大きな個体差が見られることから、今後、サンプル数を増やして検討する必要がある。また、喫煙と CYP1A 発現との相関が報告されている胎盤に関しては現在解析中である。

一方、ヒト CYP の SNPs など遺伝多型解析に

おいて、multiplex PCR 法を用いたマイクロアレイ解析法は、従来の PCR-RFLP 法よりも簡便に多くの変異アレルの遺伝多形検出を行うことができる可能性がある。しかし、マイクロアレイ法による判定では、PCR の正確性やハイブリダイゼーション上の都合から、極端に大きな PCR 産物（数 10kbp など）を用いた実験は難しい。特に、CYP2D6 deletion、GST null などの deletion アレルは、数イントロン、エクソンにまたがる繰り返し配列が原因で起こっていると考えられる為、各アレルに特異的な PCR 産物の作成が難しかった。しかし、今回の遺伝子リストに載せたその他の遺伝子に関しては容易にその変異を検出することができた。

E. 結 論

今回分析したサンプルでは、母体血液中の CYP1A1mRNA 発現レベルとダイオキシン類 TEQ 値との間に顕著な相関は得られなかった。一方、ヒト CYP の SNPs 解析において、multiplex PCR 法を用いたマイクロアレイ解析法は、発色状態がよければ、一部擬陽性シグナルの出る遺伝子を除けば従来の PCR-RFLP 法よりも簡便に遺伝多形の検出を行うことができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Konomu Saito, Hyung-Sub Kim, Noriaki Sakai, Mayumi Ishizuka, Akio Kazusaka, Shoichi Fujita. Polymorphism in diazepam metabolism in Wistar rat (in press)
- 2) Kim HS, Saito K, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Short period exposure to

di-(2-ethylhexyl) phthalate regulates testosterone metabolism in testis of prepubertal rats. Arch Toxicol. 2003 Aug;77(8):446-51.

3) Sakamoto KQ, Nakai K, Aoto T, Yokoyama A, Ushikoshi R, Hirose H, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Cytochrome p450 induction and gonadal status alteration in common carp (*Cyprinus carpio*) associated with the discharge of dioxin contaminated effluent to the Hikiji River, Kanagawa Prefecture, Japan. Chemosphere. 2003 May;51(6):491-500.

4) Ishizuka M, Yonemoto J, Zaha H, Tohyama C, Sone H. Perinatal exposure to low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters sex-dependent expression of hepatic CYP2C11. J Biochem Mol Toxicol. 2003;17(5):278-85.

5) Hiroshi Hoshino, Shoichi Fujita, Yoko Goto, Takeomi Isono, Ishinazaka Tsuyoshi, Sakurai Yasunori. Organochlorine compound accumulation in Steller sea lion *Eumetopias jubatus* migrating along the coast of Hokkaido in northern Japan. Jpn J Toxicol. 2003;6(1):1-10

2. 学会発表

1) 第135回日本獣医学会（平成15年春）

① Nakano et al. マウス肝における CYP1A2 誘導に伴うウロポルフィリン生成の制御機構－鉄による効果－

② Saji et al. ウグイを用いた小樽、石狩、米国港周辺の環境汚染の評価

③ Ibrahim et al. Down-regulations of

expressions of PPAR-alpha and AhR target genes by AhR and PPAR-alpha ligands, respectively

2) 第30回 日本トキシコロジー学会

① Nakano et al. マウス肝における CYP1A2 誘導に伴うウロポルフィリン生成の制御機構－鉄による効果－

② Sasaki et al. 抗菌剤フラゾリドンとその代謝物が肝薬物代謝酵素系に与える影響

3) 環境ホルモン学会 第6回研究発表会

① Joji Tsunada, Mayumi Ishizuka, Akio Kazusaka and Shoichi Fujita. Transient neonatal exposure of brain to testosterone surge initiates amplification of testosterone production in astrocytes.

② Naosuke Saji, Mayumi Ishizuka, Akio Kazusaka, Shoichi Fujita. Biomonitoring of the Harbor Seawater Environment in Hokkaido Coast with Induced Hepatic Cytochrome P450 of Minnow

4) Annual Meeting of Society of Environmental Toxicology and Chemistry in New Zealand

① Hiroshi Hoshino, Shoichi Fujita, Yoko Goto, Takeomi Isono, Tsuyoshi Ishinazaka, Vladimir N. Burkanov, Yasuhiro Sakurai. Organochlorine pollutions in Steller SeaLions *Eumetopias Jubatus* living in the far eastern waters

② Hyung-Sub Kim, Mayumi Ishizuka, Akio Kazusaka, Shoichi Fujita. Short period exposure of di-(2-ethylhexyl) phthalate regulates testosterone and arachidonic acid metabolisms in testis of prepubertal rats

5) バイオアッセイ研究会・環境毒性学会

① 佐治尚介、石塚真由美、数坂昭夫、藤田正一 ウグイを用いた小樽、石狩、美国港周辺の環境汚染の評価

② 星野広志、藤田正一、後藤陽子、磯野岳臣、石名坂豪、Vladimir N. Burkanov、桜井泰憲. Organochlorine pollutions in Steller SeaLions Eumetopias Jubatus living in the far eastern waters（極東海域に棲息するトドにおける有機塩素系化合物汚染）

③ Hyung-Sub Kim, Mayumi Ishizuka, Akio Kazusaka, Shoichi Fujita. Short period exposure of di-(2-ethylhexyl) phthalate regulates testosterone and arachidonic acid metabolisms in testis of prepubertal rats