

表2 PCDDs、PCDFs及びノンオルソプロブナールPCBの回収率の再現性

Congeners	回収率 (%)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
13C-2,3,7,8-TCDD	70.0	72.8	68.4	84.4	76.7	66.0	70.6	74.4	66.1	57.6
13C-1,2,3,7,8-PeCDD	81.7	92.7	85.2	96.2	85.6	72.0	79.0	86.7	80.6	68.2
13C-1,2,3,4,7,8-HxCDD	100.0	114.2	101.1	111.5	95.6	74.2	91.0	108.0	93.1	81.6
13C-1,2,3,6,7,8-HxCDD	89.6	104.1	89.3	100.0	85.2	67.1	84.7	96.4	87.1	73.9
13C-1,2,3,7,8,9-HxCDD	91.9	102.8	93.9	98.3	89.0	73.5	79.9	92.6	82.1	68.6
13C-1,2,3,4,6,7,8-HeCDD	100.6	111.6	93.3	102.8	84.5	74.7	88.9	108.7	88.7	79.4
13C-OCDD	92.2	101.5	91.7	97.6	81.4	73.5	88.6	106.4	80.9	84.5
13C-2,3,7,8-TCDF	88.2	92.4	83.6	101.6	97.9	79.2	89.8	84.3	87.6	76.0
13C-1,2,3,7,8-PeCDF	72.3	78.4	70.6	80.5	73.6	60.9	69.1	66.6	67.0	56.9
13C-2,3,4,7,8-PeCDF	77.7	82.0	82.1	96.2	84.1	72.6	80.0	83.9	81.5	69.2
13C-1,2,3,4,7,8-HxCDF	86.0	96.7	85.0	95.1	85.5	69.3	82.1	90.4	82.8	72.3
13C-1,2,3,6,7,8-HxCDF	81.4	94.6	81.1	92.8	81.1	67.9	78.8	88.7	77.1	69.8
13C-2,3,4,6,7,8-HxCDF	108.2	113.3	100.9	115.5	96.9	80.2	91.2	98.6	92.7	82.3
13C-1,2,3,7,8,9-HxCDF	104.9	112.1	94.6	100.1	85.5	72.8	86.7	85.1	90.1	75.1
13C-1,2,3,4,6,7,8-HeCDF	91.1	97.1	85.6	93.6	80.1	68.2	80.8	84.1	74.6	74.0
13C-1,2,3,4,7,8,9-HeCDF	96.3	102.1	92.2	98.3	83.5	70.9	89.0	102.7	85.8	79.3
13C-OCDF	83.3	96.5	87.4	95.5	77.2	71.1	85.7	101.7	79.5	80.0
13C-3,4,4',5'-TCB(81)	62.2	77.6	70.0	90.6	88.1	64.0	59.1	77.3	62.1	58.2
13C-3,3',4,4'-TCB(77)	64.3	76.3	67.2	89.9	85.0	64.4	63.3	75.8	62.0	57.9
13C-3,3',4,4',5'-PeCB(126)	68.0	79.0	71.1	88.1	78.9	64.6	71.4	75.9	70.5	58.2
13C-3,3',4,4',5,5'-HxCB(11)	85.2	90.7	87.5	93.6	87.3	71.6	76.5	86.3	76.2	67.9

CB: chlorinated biphenyl; CDD: chlorinated dibenzo-p-dioxins; CDF: chlorinated dibenzofurans; Hx: hexa; He: hepta; OCDD: octachlorodibenzo-p-dioxin; OCDF: octachlorodibenzofurans; PCB: polychlorinated biphenyl; PCDD: polychlorinated dibenzo-p-dioxin; PCDF: polychlorinated dibenzofuran; Pe: penta; TCB: tetrachlorobiphenyl; TCDD: tetrachlorodibenzo-p-dioxin; TCDF: tetrachlorodibenzofuran.

表3 油症患者血中のPCDDs、PCDFs及びノンホルゴブラナーPCB濃度 (2001-2003)

Congeners	濃度 (pg/g lipid)																			
	2001 (n = 78)					2002 (n = 279)					2003 (n = 269)					1997 (n = 54)				
	Mean	SD	Minimu	Maximu	Mean	SD	Minimu	Maximu	Mean	SD	Minimu	Maximu	Mean	SD	Minimu	Maximu				
2,3,7,8-TCDD	1.8	1.1	0.5	4.1	1.7	0.8	0.5	4.4	1.7	0.8	0.5	5.6	2.1	1.4	0.3	8.5				
1,2,3,7,8-PeCDD	20.4	11.0	3.3	53.5	11.1	5.9	1.5	46.8	9.7	5.4	0.5	45.2	8.8	4.4	1.1	23.5				
1,2,3,4,7,8-HxCDD	2.4	1.8	1.0	7.7	2.9	1.8	1.0	10.8	2.6	1.6	1.0	8.5	2.9	1.9	0.0	10.1				
1,2,3,6,7,8-HxCDD	56.7	43.4	4.4	230.1	53.0	41.7	6.0	290.7	50.4	42.6	3.8	348.5	30.9	14.6	5.9	75.5				
1,2,3,7,8,9-HxCDD	4.6	2.3	1.0	11.0	5.1	3.8	1.0	41.0	3.9	2.7	1.0	17.9	4.9	2.8	0.0	14.2				
1,2,3,4,6,7,8-HeCDD	26.6	20.7	5.4	143.6	63.4	53.7	10.8	556.3	38.6	22.9	8.5	167.2	33.6	16.7	9.0	85.0				
OCDD	667.7	750.5	137.5	6226.3	877.2	728.2	172.5	9158.6	763.3	438.9	147.6	3706.1	627.6	557.9	123.8	3060.3				
2,3,7,8-TCDF	1.8	2.5	0.5	14.4	1.4	0.9	0.5	6.3	1.2	0.7	0.5	4.9	2.0	1.3	0.4	8.2				
1,2,3,7,8-PeCDF	1.1	0.9	0.5	4.2	0.9	0.8	0.5	6.3	0.8	0.7	0.5	5.6	1.7	1.0	0.0	4.4				
2,3,4,7,8-PeCDF	256.1	315.3	6.7	1770.6	192.0	252.1	3.1	1889.7	176.2	240.2	2.6	1953.5	15.2	8.9	3.5	41.7				
1,2,3,4,7,8-HxCDF	82.7	117.2	2.0	632.3	59.0	99.6	1.0	769.9	52.0	87.2	1.0	737.7	8.1	4.9	2.5	22.4				
1,2,3,6,7,8-HxCDF	29.7	34.4	1.0	176.1	22.4	29.1	1.0	210.0	20.4	27.0	1.0	231.8	7.4	3.5	1.7	16.3				
2,3,4,6,7,8-HxCDF	ND			ND	ND			ND	ND			ND	2.0	1.5	0.0	5.8				
1,2,3,7,8,9-HxCDF	ND			ND	ND			ND	ND			ND	4.0	3.3	0.0	13.7				
1,2,3,4,6,7,8-HeCDF	3.9	2.3	1.0	10.8	3.2	4.0	1.0	39.8	2.8	2.6	1.0	22.8	7.0	2.7	3.2	13.4				
1,2,3,4,7,8,9-HeCDF	ND			ND	ND			ND	ND			ND	ND							
OCDF	2.0	0.0	2.0	2.0	2.0	0.4	2.0	9.1	2.0	0.2	2.0	5.6	4.6	9.1	0.0	52.6				
3,4,4',5'-TCB(81)	5.4	2.3	5.0	20.6	5.6	3.1	5.0	41.0	5.3	1.8	5.0	21.8	20.7	14.2	5.0	101.1				
3,3',4',4'-TCB(77)	7.8	4.7	5.0	28.5	11.0	7.2	5.0	46.1	8.6	6.4	5.0	71.8	20.7	14.2	5.0	101.1				
3,3',4,4',5'-PeCB(126)	84.4	58.5	17.8	319.5	103.1	71.7	5.0	560.9	98.1	65.3	11.2	531.7	110.5	79.9	11.0	432.9				
3,3',4,4',5',5'-HxCB(165)	207.1	166.0	31.0	964.0	200.0	154.5	12.7	1131.4	183.8	139.2	12.7	1115.6	57.1	32.9	10.6	135.6				
Total PCDD	780	766	177	6423	1014	782	212	9802	870	470	181	3924	706	586	40	3219				
Total PCDF	381	461	18	2594	284	375	13	2744	259	352	12	2938	58	45	24	334				
Total PCDD/PCDF	1161	840	308	6493	1299	866	232	9886	1129	602	242	3991	758	599	117	3334				
Total coplanar PCBs	305	168	66	1006	320	186	28	1220	296	168	37	1218	187	115	42	594				
Total	1466	921	373	6822	1618	948	313	10294	1425	703	293	4933	946	665	3621	174				
PCDDs-TEQ	28.9	14.0	5.7	70.2	19.5	10.4	3.3	78.5	17.6	9.9	2.2	82.5	15.2	6.3	2.4	35.3				
PCDFs-TEQ	139.8	171.8	4.1	966.7	104.6	137.9	2.1	1029.4	95.8	131.1	1.8	1074.4	10.1	5.2	2.7	25.8				
PCDDs/PCDFs-TEQ	168.7	180.4	11.7	1036.9	124.1	146.7	5.4	1107.9	113.3	139.7	3.9	1156.9	25.3	11.2	5.1	61.1				
Coplanar PCBs-TEQ	10.5	5.8	2.2	32.6	12.3	7.7	0.6	59.4	11.7	6.9	1.4	56.0	11.6	8.2	1.3	44.6				
Total TEQ	179.3	180.5	13.9	1049.7	136.4	148.3	7.0	1126.1	125.0	141.2	5.5	1176.6	36.9	17.6	8.5	85.4				
Lipid (%)	0.3	0.1	0.2	0.6	0.3	0.1	0.2	0.6	0.4	0.1	0.2	0.6	0.3	0.1	0.2	0.5				
Age (years)	65.3	11.2	33.0	84.0	63.6	12.6	30.0	88.0	65.7	11.7	32.0	89.0	40.6	16.9	18.0	81.0				

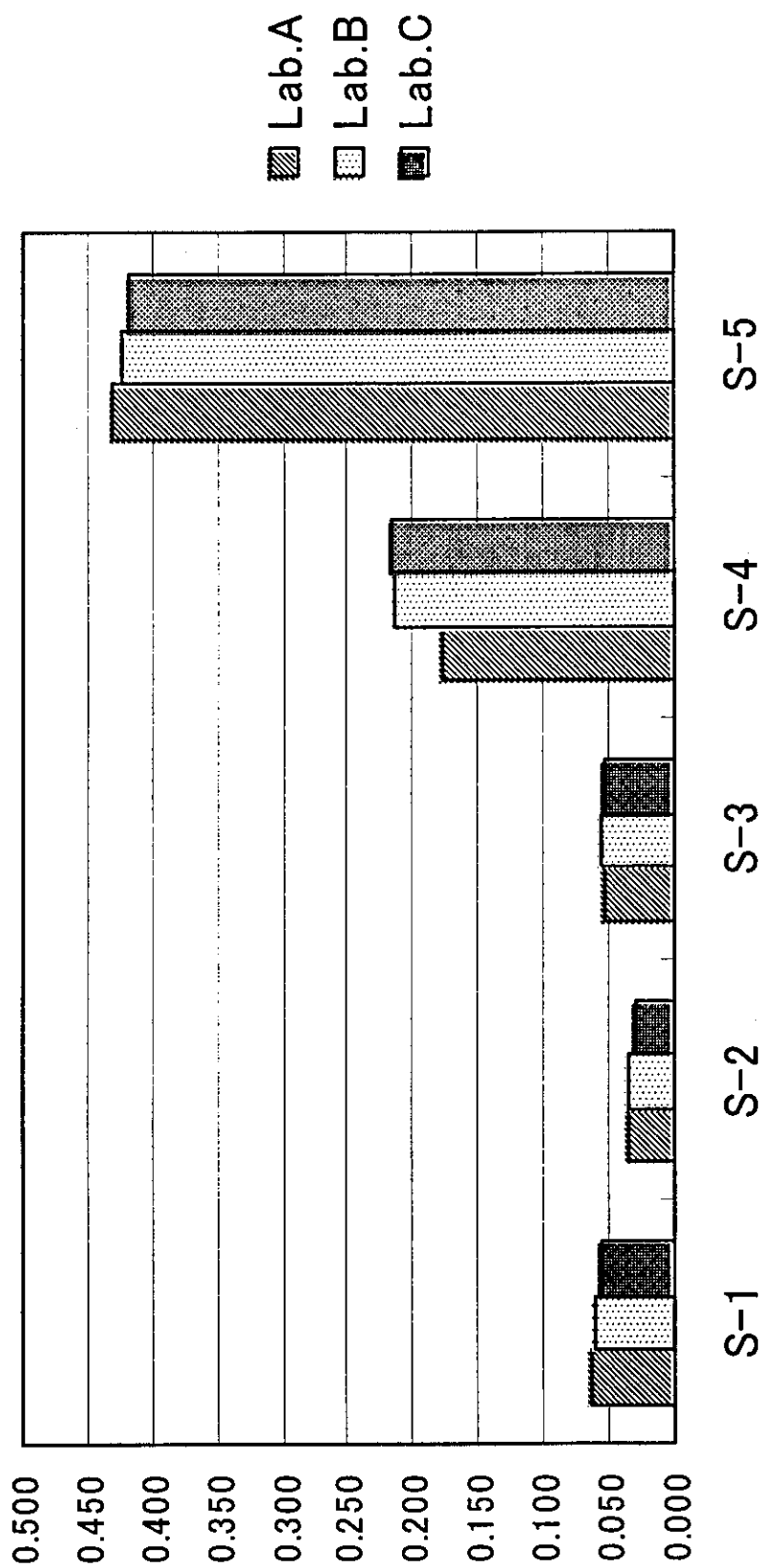
The data from normal controls are cited in the report by Matsueda et al. (7th Symposium on Environmental Chemistry, 4-5 Jun 1998, Kyoto, Japan).

CB: chlorinated biphenyl; CDD: chlorinated dibenzo-p-dioxins; CDF: chlorinated dibenzofurans; Hx: hexa; He: hepta; ND: less than the determination limit; OCDD: octachlorodibenzo-p-dioxin; OCDF: octachlorodibenzofurans; PCB: polychlorinated biphenyl; PCDD: polychlorinated dibenzo-p-dioxin; PCDF: polychlorinated dibenzofuran; Pe: penta; TCB: tetrachlorobiphenyl; SD: standard deviation; TCDD: tetrachlorodibenzo-p-dioxin; TCDF: tetrachlorodibenzofuran; TEQ: toxic equivalent quantity.

図1 検出限界値に対するブランクレベル

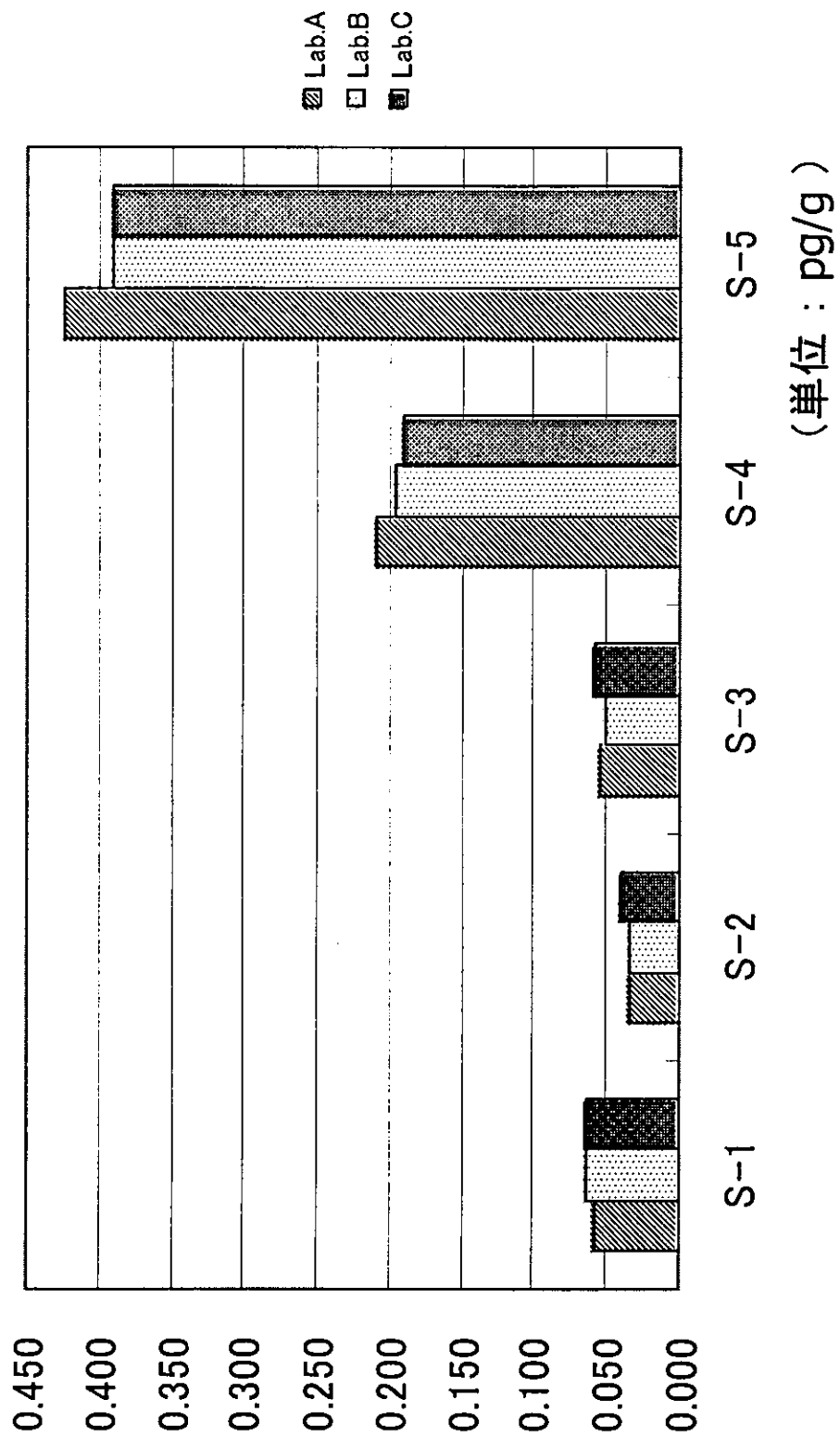


図2 実験室内変動: Total TEQ



(単位 : pg/g)

図3 実験室間変動: Total TEQ



分担研究報告書

ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) 及び高分解能ガスクロマトグラフィー/高分解能質量分析法 (HRGC/HRMS) による油症患者の血中 PCB 同族体分離分析の検討

分担研究者	飯田隆雄	福岡県保健環境研究所	保健科学部長
研究協力者	堀 就英		研究員
	中川礼子		生活化学課長
	片岡恭一郎		情報管理課長
	松枝隆彦		専門研究員
	平川博仙		専門研究員
	飛石和大		主任技師
	芦塚由紀		主任技師
	小野塚大介		主任技師
	戸高 尊	厚生労働省	リサーチレジデント

研究要旨 平成 16 年 9 月の油症診断基準の改定により血中ダイオキシン類濃度が診断基準に加えられた。従来から油症診断基準の重要な所見とされている「血中 PCB 濃度および性状」と血中ダイオキシン類の一部である「モノオルソ PCB」を系統的に分析する方法を検討した。すなわち、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) 及び高分解能ガスクロマトグラフィー/高分解能質量分析法による血中 PCB の迅速かつ精密な同族体分離分析法を検討した。その結果、血中から検出される PCB 同族体のほとんどを迅速・精密に分離分析できることが明らかになった。特に、「血中 PCB 濃度および性状」分析と「モノオルソ PCB」分析で必要となる 9 種類の PCB の迅速・精密に分離分析が可能となった。

A. 研究目的

「血中 PCB 濃度及び性状の異常」は油症診断基準の重要な所見のひとつである。「PCB の性状」とは、PCB のガスクロマトグラムピークパターン (GC パターン) を示しており、その異常は一般人の PCB GC パターンと異なる油症患者に特有の GC パターンをさしている。GC パターン法は、油症患者では血中 PCB GC クロマトグラムパターン

の PCB#118 を主成分とするピークが相対的に低く、PCB#156 を主成分とするピークが相対的に高いことに基づいており、PCB#153 を主成分とするピークを基準として、これに対する比を取ることで、油症患者と一般人の違いを非常に明確にすることができる。われわれは、これまでに、PCB のパックドカラムによる GC パターン法が PCB#118 および PCB#156 の

PCB#153 に対する相対比で置き換えられることを明らかにしてきた¹⁾。すなわち、PCB#118、PCB#156 および PCB#153 の 3 種類の PCB を分離定量することで、PCB 同族体パターン解析をより厳密に行うことができる。一方、我々は、全国の油症患者の血中ダイオキシン類 (PCDD: 7 種、PCDF: 10 種、ノンオルソ PCB: 4 種およびモノオルソ PCB: 8 種) を測定している^{2,3)}。これらの異なる PCB 分析 (モノオルソ PCB 分析と PCB 同族体パターンおよび総濃度分析) を統合的行なうことができれば効率的である。正確に PCB を分析するためには PCB 同族体 (209 成分) の完全な分離分析を必要とするが、完全な PCB 分離分析は最新の技術をもってしても非常に困難である。ダイオキシン類の一部であるモノオルソ PCB 濃度と PCB 同族体パターンおよび総 PCB 濃度の分析を統合的行うためには、少なくとも、モノオルソ PCB の 8 種類とパターン解析に用いる PCB#118、PCB#156 および PCB#153 の 3 種類の PCB が分離定量されなければならない。ここで、PCB#118 および PCB#156 は 8 種類のモノオルソ PCB に含まれているので、結局、モノオルソ 8 種類と PCB#153 の 9 種の PCB を分離定量することによって、「ダイオキシン類としてのモノオルソ PCB」と「PCB パターンおよび PCB 濃度分析」を統合的行なう事が可能となる。ヒト試料に検出される PCB は 70 種類程度に限られているので、一回の高分解能ガスクロマトグラフィー/高分解能質量分析法 (HRGC/HRMS) でダイオキシン類の一部である「モノオ

ルソ PCB」と「PCB 同族体パターンおよび PCB 濃度」の分析を統合的行うことが可能と思われる。また、検診後できるだけ速やかにデータを確定するため、出来るだけ迅速で正確・精密な分析方法が必要である。本研究では血中 PCB の HRGC/HRMS による異性体別分析方法の検討を行った。また試料クリーンアップ操作の効率化、迅速化を目的として多検体の自動連続精製が可能なゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) を導入し、条件検討を行った。さらに、これらの検討結果をもとに、従来別個で行われていた血液中の「総 PCB 濃度および性状」測定と「モノオルソ PCB 濃度」測定を一元化した系統的な分析法の確立を目的とした。本分析法を用いて、平成 16 年度油症一斉検診の血中 PCB 分析を行ったので、この結果についても併せて報告する。

B. 研究方法

1. 試料

平成 16 年度に福岡県内の油症一斉検診を受診した 66 名について PCB 測定を実施した。

2. 試薬

n-ヘキサン、アセトン、ジクロロメタンはダイオキシン分析用 (関東化学 (株) 製) を用いた。n-ノナン、PCDD/DF 及び PCB 標準品は Wellington Laboratories 社製を用いた。

3. 装置及び条件

GPC システムは GL サイエンス (株) 製を用いた。システム構成はオートサンプラー (MIDAS)、デガッシングユニット (DG660B)、送液ポンプ (PU614-F)、UV ディテクター

(UV702)、フラクションコレクター (FC693) 及び汎用レコーダーである。GPC カラムは MSpak GF-310 4D (内径 4.6mm、長さ 150mm、昭和電工 (株) 製) を用いた。移動相はアセトンを、流速は 0.1ml/min とした。

HRGC/HRMS には HP6890 ガスクロマトグラフ (Agilent 社製) /質量分析計 Auto Spec Ultima (Micromass 社製) を用いた。

カラム：HT8 PCB (内径 0.25mm、長さ 60m、関東化学 (株) 製) を用いた。
カラム温度：130℃(1.0min) - 20.0℃/min - 220℃(0min) - 3.0℃/min - 280℃(0min) - 20.0℃/min - 300℃(3.5min)

キャリアーガス (流量)：ヘリウム (1.3ml/min)

注入口温度：280℃

注入量：1μl

インターフェース温度：280℃

イオン源温度：280℃

イオン化エネルギー：40eV

加速電圧：8kV

分解能：10000 以上

4. 分析試料の調製

血液 5g を正確に量り取り、クリーンアップスパイクとして ¹³C₁₂ ラベル標識の 2,3,7,8 位塩素置換体の PCDD/DF17 種類及びノンオルソ PCB 4 種類を各 50pg、さらに PCB の 3 から 10 塩素置換体 21 種類 (IUPAC#28、37、52、70、95、101、123、118、114、105、153、138、157、178、180、170、189、202、194、206、209) 各 500 pg を添加した。これを既報に従い高速溶媒抽出器により抽出し、得られた脂質を硫酸処理した後、硝酸

銀シリカゲルカラム及び活性炭カラムで精製を行った¹⁾²⁾。活性炭カラムの第 1 画分 (10% (v/v) ジクロロメタン/n-ヘキサン画分) を減圧濃縮した後、ガラス製マイクロバイアルに移し、室温常圧下クリーンベンチ内で濃縮乾固した。アセトン 100μl を加えてミキサーで攪拌、この 50μl を GPC 精製に供した。GPC 注入に当たってはサンプルロスが少なく大容量注入の可能な「μl ピックアップ」モードを選択した。精製後の試料にシリンジスパイクとして ¹³C₁₂ ラベル標識の 2,3,3',5,5'-pentaCB (IUPAC#111) 250pg を添加し、全量 50μl として HRGC/HRMS 測定試料とした。

C. 結果

GPC 及び HRGC/HRMS による血中 PCB 分析法の検討

PCB には 1 から 10 塩素化物の 209 種類の異性体が存在する。血液抽出物の活性炭カラム第 1 画分 (以下 PCB 画分) には、強い共平面性を有するいわゆるノンオルソ PCB (4 種) を除く大部分の PCB が含まれるので、本画分を分析することで血中 PCB の性状を調べることができる。但し、この画分には脂肪族炭化水素類が含まれており機器分析上の妨害となるため、通常何らかの精製を追加して行う必要がある。既報¹⁾²⁾では、共平面性化合物に対して強い吸着力を有する活性炭分散シリカゲルを用い、PCB 画分に含まれるモノオルソ体 8 種類を分離し測定している。しかし、本研究ではモノオルソ体に加え非共平面性の PCB までを網羅する必要があるため、新しい精製方法を検

討する必要があった。PCB 画分から妨害物を効果的に除く方法として、液・液分配法（アセトニトリル/ヘキサン分配や DMSO 分配）があるが、操作が煩雑で長い工程を要し回収率が低下するので、必ずしも効率的な方法ではない。一方、分子篩効果による分離法である GPC は既に食品中残留農薬分析等に適用例も多く、環境分析では PCB 分析に用いた報告もある⁴⁾。また、システム構築により多検体を連続して半自動的に精製することが可能であることから、血液試料の効率的かつ効果的な精製法として条件検討を行った。

まず PCB 標準品（3 から 10 塩素化物）を GPC に注入しその溶出挙動を調べた。その結果、移動相の流速を 0.1ml/min に設定した場合、PCB の溶出は注入後 22 分から始まり、25～26 分付近で溶出が最大となって減少に転じ、30 分までには完了することがわかった。PCB の塩素数による溶出パターンの違いはほとんど認められなかった。次に実際の血液試料から得られた活性炭カラム第 1 画分を同条件で注入、溶出させた。その結果、妨害成分（マトリックス成分）の溶出は PCB よりも早く、注入開始から 21 分で始まり、22～23 分で最大となって、24 分には完了することがわかった。すなわち、22 分から 24 分付近でマトリックス成分と PCB の溶出が重なっていた。そこで、注入開始から 23 分までを捨て（ドレイン）、それ以降を測定試料として回収すれば、PCB の回収率に大きな影響を与えない範囲内で大部分のマトリックス成分を分離除去でき、測定が可能になると考えられた。

全設定質量数及び全走査時間におけるロックマスチャンネルに妨害ピークやベースラインの変動は認められず、良好なクロマトグラムが得られた。特に油症診断上重要である 2,3',4,4',5-pentaCB (IUPAC#118、パックドカラム分析におけるピーク No.1 に相当)、2,2',4,4',5,5'-hexaCB (#153、ピーク No.2 に相当) 及び 2,3,3',4,4',5-hexaCB (#156、ピーク No.5 に相当) に相当するピーク形状、その周辺ピークとの分離性及び当該ピークの定量性のいずれも良好であった。また、全操作ブランクも定量値に影響を与えない範囲内であった。全操作回収率は 80～90%（5 塩化物ベース）と良好であった。シグナル/ノイズ比 (S/N 比) = 3 に相当する量を標準品のクロマトグラムから求めた定量限界値は血液中ダイオキシン類分析ガイドラインにおける目標定量下限値 (0.03pg/g) を満足していた。

2. 平成 16 年度油症一斉検診受診者の血中 PCB 分析とパターン解析結果

受診者 66 名の内訳は認定患者 37 名、所見なし (OB) 19 名、初回受診者 (初回) 8 名及び観察者 2 名であった。PCB 分析とパターン解析の結果、認定患者 37 名のうち 10 名は A パターンに、7 名が B パターンに、5 名が BC パターンに、15 名が C パターンに分類された。OB 15 名は全て C パターンとなった。初回 8 名のうち 1 名が B パターンに、残りの 7 名は C パターンに分類された。観察者は 1 名が B パターン、もう 1 名は C パターンに分類された。総 PCB 濃度は A パターン (10 名) で 1.22～6.92ppb (平均 3.79ppb)、B パターン

(9名)では0.74~4.02ppb(平均2.03ppb)、BCパターン(5名)で0.20~1.74ppb(平均1.00ppb)、Cパターン(42名)で0.10~3.77ppb(平均1.43ppb)の範囲であった。一方、対照群の血中PCB濃度は1.32ppbであり、受診者66名のうち血中総PCB濃度の最高値(6.92ppb)は対照群濃度の約5.2倍であった。

D. まとめ

PCB画分のPCBからモノオルソPCBを分離することなく定量妨害成分(マトリックス成分)除去することによりモノオルソPCBとその他のPCBを同時に定量することが可能となった。さらに、このクリーンアップ操作をGPC装置で自動的に行うことにより、血中PCDD、PCDFおよびノンオルソPCB分析と同時に、モノオルソPCB分析とPCBパターン並びに総濃度の分析が行えるようになった。その結果、モノオルソPCBを含むダイオキシン類、PCB濃度およびPCBパターンのすべての油症診定、追跡調査のデータを同時に確定することが出来る。

現在、一般人128件と平成16年度油症一斉検診受診者血液100件のGPCクリーンアップが終わり、HRGC/HRMS測定中である。今後、平成15年度検診受診者343件および平成16年度受診者220件についてもGPCクリーンアップを行い、モノオルソPCBを含めたPCBの個別分析を行っていく予定である。以上のように、血中PCDD/DF及びノンオルソPCBに比

べて大幅に遅れていたモノオルソPCBの測定に見通しがついた。

E. 参考文献

- 1) 中川礼子、芦塚由紀、堀 就英、平川博仙、飛石和大、飯田隆雄：血中PCBパターン判定における従来法と異性体分析法の同等性について、福岡医誌94：144-147、2003。
- 2) 飯田隆雄、戸高 尊、平川博仙、飛石和大、松枝隆彦、堀 就英、中川礼子：油症患者血中ダイオキシン類レベルの追跡調査(2001年)、福岡医誌94：126-135、2003。
- 3) T. Todaka、H. Hirakawa、K. Tobiishi、T. Iida：New protocol of dioxins analysis in human blood. Fukuoka Acta Med. 94：148-157、2003。
- 4) 剣持堅志他：GPC(Gel Permeation Chromatography)の微量化学物質(PCB、PCN等)分析への応用、第11回環境化学討論会要旨集 P164-165 箱根町2002年6月3-5日

分担研究報告書

油症患者血液中の PCB および PCB 水酸化代謝物の分析

分担研究者 増田義人 第一薬科大学名誉教授

研究要旨 酵素誘導作用によりサイロキシンのようなホルモンに異常をもたらす可能性がある OH-PCB の異性体別微量分析を試行した。35 種の OH-PCB 同属体のうち大部分は GC/MS で分離できたが、3 組の OH-PCB については保持時間が非常に近く分離分析できなかった。油症患者全血中 PCB 濃度は平均 2.8 ppb であり、正確に分析できた。4-OH-PCB146, 4-OH-PCB187 および PCP を油症患者の血液よりはじめて検出した。4-OH-PCB146 および 4-OH-PCB187 濃度は一般人と同程度であったが、PCP は一般人より低かった。

A. 研究目的

PCB の代謝物である水酸化 PCB (OH-PCB) が人体に蓄積されており、実験的には微量で酵素誘導作用を示し、Estradiol 濃度に異常を起し、更に Thyroxin の作用を減退させて脳神経の発達に障害を及ぼす事が分かってきた。油症患者に残留していると考えられる OH-PCB を分析するために、血液試料を用いて PCB および OH-PCB を同時に分析できる方法を検討した。

B. 研究方法

35 種の OMe-PCBs、6 種の ¹³C-OMe-PCBs およびそれらの OH-PCB を入手できたので、それらをガスクロマトグラフ・質量分析計 (GC/MS) で定量分析する方法を検討した。GC/MS の分析条件:キヤピラリーカラム DB-5MS 0.25mm x 60m、カラム槽温度 100°(2 min) → 20°/min → 240°(3 min) → 2°/min → 295°(6 min)、キャリアーガス:高純度ヘリウム。
血液試料約 10 g に内標準物質として ¹³C-PCB 5 ng、¹³C-pentachlorophenol

(PCP) 5 ng、¹³C 標識 OH-PCB 10 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、はじめヘキサン 30 ml で溶出させた (PCB 分画)。OH-PCB 分画は 2M-HCl で酸性にした後、ヘキサン + エーテル (4:1)で抽出した。有機溶媒層を濃縮して 1 ml 程度にしてジアゾメタン溶液を加えてメチル化した。この OMe-PCB 分画は硫酸/シリカゲル多重カラムにかけ、ジクロロメタンで溶出させ、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 0.1ml 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、OH-PCB および 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、

hexachlorobenzene (HCB)および DDE (農薬 DDT の代謝物) について分析した。

C. 結果と考察

35 種の OMePCBs および MePCP の GC/MS の保持時間は別表のとおりで、大部分の OMePCB は分離定量分析できるが、中には塩素数が同じで、保持時間が非常に近いものが 3 組あった。これらはこのままでは分離定量できない。

PCB 濃度では油症患者のほう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 パターンがはっきりと観察される。OH-PCB および PCP が油症患者血液よりはじめて検出された。2 種類の OH-PCB 濃度は PCB の 1/6 程度であり、油症患者と一般人では同じ程度の濃度であった。PCP 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 濃度よりも少なかった。

PCB は回収率も割合によく分析できたが、OH-PCB は回収率がよくなかったので、2 種の OH-PCB と PCP のみが定量分析できた。他の OH-PCB を定量分析するには、分析課程の回収率を向上させることと、更に微量の OH-PCB ができる高感度の GC/MS を用いる必要がある。

D. 研究発表 1. 発表論文

Y. Masuda, K. Haraguchi: Hydroxy and methylsulfone metabolites of polychlorinated biphenyls in human

blood and tissues. Organohalogen Compounds 66, 3625-3633. 2004.

表1 分析に使用した OMePCBs とその保持時間

	OMePCBsの化合物名	保持時間 (min)
1	PCPMe	12.23
2	4'OMe2345tetraCB(61)	21.81
3	4'OMe34,3'5'tetraCB(79)	21.93
4	4'OMe245,2'5'pentaCB(101)	22.65
5	4'OMe245,3'5'pentaCB(120)	22.73
6	2'OMe2345,4'pentaCB(114)	23.03
7	3,3'diOMe246,2'4'6'hexaCB(155)	23.95
8	3OMe245,3'4'pentaCB(118)	24.10
9	4'OMe234,3'5'pentaCB(108)	24.18
10	4OMe235,3'4'pentaCB(107)	24.27
11	4'OMe245,2'3'pentaCB(97)	24.31
12	4OMe2356,2'3'hexaCB(134)	24.47
13	3'OMe2346,2'4'6'heptaCB(184)	24.65
14	4OMe235,2'4'5'hexaCB(146)	25.04
15	4'OMe345,3'5'pentaCB(127)	26.26
16	3'OMe234,2'4'5'hexaCB(138)	26.50
17	4'OMe234,2'3'5'hexaCB(130)	26.65
18	4OMe2356,3'4'hexaCB(163)	27.04
19	4OMe2356,2'3'5'heptaCB(178)	27.12
20	3'OMe2346,2'4'5'heptaCB(183)	27.35
21	3'OMe2345,2'4'6'heptaCB(182)	27.40
22	4OMe2356,2'4'5'heptaCB(187)	27.64
23	4'OMe2345,3'5'hexaCB(159)	28.31
24	4OMe235,3'4'5'hexaCB(162)	28.71
25	4OMe2356,2'3'5'6'octaCB(202)	29.36
26	4OMe2356,2'3'5'heptaCB(177)	29.56
27	4'OMe2345,2'3'5'6'octaCB(201)	29.92
28	3'OMe2345,2'4'5'heptaCB(180)	30.53
29	4'OMe2345,2'3'5'heptaCB(172)	30.71
30	4OMe2356,3'4'5'heptaCB(193)	31.37
31	3'OMe23456,2'4'5'octaCB(203)	33.06
32	4'OMe23456,2'3'5'octaCB(198)	33.09
33	4'OMe23456,2'3'6'octaCB(199)	33.35
34	4'OMe2346,2'3'5'6'octaCB(200)	33.94
35	4,4'diOMe2356,2'3'5'6'octaCB(202)	34.83
36	4'OMe23456,2'3'5'6'nonaCB(208)	35.50
37	13CPCPMe	12.23
38	13C4'OMe245triCB(29)	18.27
39	13C4'OMe2345tetraCB(61)	21.79
40	13C4'OMe245,3'5'pentaCB(120)	22.72
41	13C4OMe2356,2'4'5'heptaCB(187)	27.62
42	13C4'OMe2345,3'5'hexaCB(159)	28.29
43	13C4'OMe2345,2'3'5'heptaCB(172)	30.70

分担研究報告書

環境化学物質曝露と尿道下裂の関連についての疫学研究

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 北海道大学医学部予防医学講座公衆衛生学分野

研究の要旨：尿道下裂は、比較的頻度の高い先天異常の一つである。尿道の形成はアンドロゲン依存性であることから、尿道下裂とPCBやダイオキシン類など内分泌攪乱物質との関連が疑われ問題となっている。そこで、現在までに、尿道下裂の有病率の現状と内分泌攪乱物質との関連がどこまで明らかにされているかを、文献的にレビューし、さらに、尿道下裂と内分泌かく乱物質に関わる遺伝子多型との関連について解析した。内外の文献レビューから、登録システムによる尿道下裂の有病率は増加しているが、診断基準が一定の病院ベースで行った研究では有病率が増加していないので、増加の原因の一つは、診断の向上と近年の尿道下裂への関心の高まりがある可能性も指摘された。尿道下裂と、農薬曝露や廃棄物処理施設など内分泌攪乱物質との関連を示唆する研究もあるが、対象者は、複数の地域・環境で、様々な化学物質を、多様な経路（経皮、経口、吸入）により曝露されているので、質問紙調査では化学物質の曝露量評価が困難である。両者の因果関係を適切に評価するためには、今後、信頼性の高い前向き研究で器官形成期の化学物質濃度の測定を実施する必要性があると考えられた。次いで分子生物学的研究から病因を探る目的で症例対照研究を実施した。尿道下裂の母親31例と先天異常を持たない男児を出産した母親64名で遺伝子解析を実施し、出産時年齢、出生児体重、妊娠中喫煙で調整したところ、GSTM1, GSTT1に有意な関連は見られなかったが、CYP1A1野生型と比較して、変異型ヘテロ、変異型ヘテロ+ホモで有意なオッズ比の低下が見られた(各OR=0.2, 95%CI=0.04-0.7 OR=0.3 95%CI=0.1-0.97)。低出生体重児の比率が有意に高かったが妊娠中の母の喫煙には差がなかった。CYP1A1はダイオキシンを代謝するaryl hydrocarbon hydroxylase (AHH)活性に関わっているのみならず、エストロゲン不活性の2-OHエストロゲンの代謝を産生することでエストロゲン代謝に関わるので、尿道下裂では母のエストロゲン代謝面への関与が大きいことが示唆されたが、今後は、前向き研究で器官形成期の化学物質濃度の測定を行った上で、関連遺伝子の多型を調べる必要があると考えられた。

A. 研究目的

尿道下裂は、比較的頻度の高い先天異常の一つである。尿道下裂は、尿管間ヒダの癒合不全であり、そのために、陰

茎・陰囊・会陰腹側に尿道口が開口している状態であり、尿線の異常、不妊、精神発達においても問題となる疾患である(1)。近年、欧米各国より、尿道下裂の

有病率の増加が報告されている(2)。尿道の形成はアンドロゲン依存性であることから、妊娠中の母親が胎児の器官形成期に内分泌攪乱物質に曝露され、性ホルモン環境に変化を生じさせることで、尿道下裂のような男児生殖器異常をひきおこしているのではないかとということが疑われ、問題となっている。そこで現在まで尿道下裂の有病率の現状と内分泌攪乱物質との関連がどこまで明らかにされているかを、文献的にレビューし、さらに尿道下裂と内分泌かく乱物質に関わる遺伝子多型との感受性素因の関連について解析したので報告する。

B. 研究方法

1. 文献レビュー

米国立医学図書館の医学文献データベース PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>)を用いて、hypospadias AND (insecticides OR pesticides OR chlorinated hydrocarbons OR pesticides OR chlorinated hydrocarbons OR pcbs OR bisphenol OR phenol OR phthalate OR styrene OR furan OR organotin OR diethylstilbestrol OR ethinyl estradiol) AND (human) で文献を検索した。その中から、人集団を対象とする疫学研究の原著論文と選択した。さらに必要に応じて、これらの原著論文や、他の総説論文を参考にして、参考論文を選択した。

2. 分子疫学的研究 (症例対照研究)

(1) 対象

症例は、2000-2004年に札幌市と名古

屋市の泌尿器科2施設(大学病院:1、一般病院:1)で尿道下裂手術の既往のある児の母31名を対象とした。

対照として、札幌市の大学病院で出産を終えた、停留精巣・尿道下裂を持たない男児の母64名を対象とした。

(2) 方法

1) 自記式質問紙票を用いて、母親の出産時年齢、妊娠中の喫煙、教育歴、時の出生児体重、合併奇形について調べた。

2) 手術をした泌尿器科医が、尿道下裂の重症度分類を行った。診断基準は、軽症(遠位)は亀頭、冠状溝、陰茎部の開口とし、重症(近位)は陰茎陰嚢部、陰嚢部の開口とした。

3) 両群の母より2mlの末梢血を採取し、DNA抽出を行い、GSTM1, GSTT1はPCR法にて、CYP1A1 MspI多型はPCR-RFLP法にて解析を行った。

(3) 解析方法

母親の児出生時年齢、出生児体重、母親の妊娠中の喫煙を調整因子として、ロジスティック回帰分析を行った。

(倫理面への配慮)

尿道下裂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、インフォームド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

1. 文献レビュー

(1) 尿道下裂の有病率について

国際先天異常監視機構 (International Clearinghouse for birth Defects Monitoring Systems ICDBMS) では、異常が見られた場合にはすみやかに警鐘を鳴らし予防対策を講じるために、世界の先天異常の動向を監視している。ICDBMSによると、尿道下裂の有病率は、米国、ノルウェー、スウェーデン、イギリス、ハンガリー、デンマーク、イタリア、フランス、日本で増加傾向を示すが、オーストリア、カナダ、ニュージーランドでは、一定した傾向はみられないと報告されている (2)。日本の尿道下裂有病率については、全国の病院の1割をカバーしている日本産婦人科医会の先天異常モニタリングシステムによると、1974年の全出生1万人あたり1.4人に対し、1998年には3.5人と増加傾向にあると報告されている (3)。一方、日本には、神奈川県、鳥取県、石川県にのみ地域ベースの先天異常モニタリングシステムがある。それによると、神奈川県では、1981-83年、1984-86年、1989-93年、1994-96年で、それぞれ、全出生1万人に3.9人、4.6人、5.1人、2.9人であり、石川県でも、1983-87年、1988-92年、1993-97年で、それぞれ、男児1万人出生に1.4人、3.8人、3.0人であり、一定傾向は見られなかった。鳥取県では、1974-81年、1982-89年、1990-96年で、全出生1万人に、それぞれ、1.8人、5.3人、6.3人と増加傾向が見られるが、この地域は、それぞれの期間で登録制度を変えていたので単純には比較できない (4)。大阪の病院ベースでの尿道下裂の有病率は、1948-58年に男児1万人出生あたり1.39人であった

が、1981-1990年には12.13人と、約9.7倍に増加しているとの報告もある (5)。このように、地域によって有病率の違いがあることが指摘されるが、これは日本に限ったことではなく、フィンランドでも国内の地域差を報告している (6)。また、各国から報告される尿道下裂増加について、登録や診断のシステム上の問題点もひとつの原因ではないか、と指摘している論文もある (7)。Ahoら (8) は、フィンランドで手術退院カルテからデータを集めた病院ベースのモニタリングでは増加傾向はみられないが、人口ベースのモニタリングでは増加傾向が見られた、と報告している。この結果について、軽症例でも手術を行い、観察期間中に診断基準の変更のない病院ベースの有病率と、人口ベースのモニタリングでみられる増加後の有病率がほぼ同じことから、増加の原因の一つは、診断の向上と近年の尿道下裂への関心の高まりによる可能性がある、と指摘している。また、Vitranenら (9) も、登録システムによる尿道下裂の有病率は増加しているが、病院ベースで行った出生コホートでは有病率は増加していないことを報告している。日本でも、上述したようにICDBMSでは増加傾向が見られたが、北海道で1985-97年に、統一基準で診断された尿道下裂の手術例全例について調査したところ、尿道下裂の有病率の平均は、全出生1万人あたり3.9人であり、増加傾向や有意な変動はみられなかった (10)。

尿道下裂への関心が高まることにより、診断医が今までは見逃していた症例を尿道下裂に含めるようになるという傾向は、軽症型の割合が増加することで

現れると考えられる。重症度別に調べられた報告はほとんどないが、Paulozziら(11)は、1968-93年におけるアメリカでの尿道下裂は重症型が増えており、真に尿道下裂が増加していることを指摘している。北海道の調査では、重症型(proximal)で有意な割合の低下が見られ、軽症型(distal)では有意ではないが、割合の上昇傾向がみられた(10)。北海道では診断基準の統一がなされており、関心度の高まりにより軽症型の有病率が増加している可能性は低いと考えられるが、否定することはできない。アンドロゲンレセプターの発現がペニスの位置によって異なる(12)ので、内分泌攪乱物質が及ぼす影響も異なることが予測され、重症度別に観察することは重要であると考えられる。

(2) 男児生殖器奇形のリスク要因

1) ホルモン製剤

尿道下裂は、アンドロゲン依存性に外性器が形成される時期の異常により発生するために、妊娠中のプロゲステロン・エストロゲン製剤服用による有病率の増加、オッズ比の増加が報告されている(13)。Czeizelら(14)によると、流産防止薬として使用されていたプロゲステロン製剤を妊娠中に服用した母親は、服用していない母親と比較して、尿道下裂児を出生する割合が高かった($p < 0.05$)。日本人では、尿道下裂児の母親が妊娠中プロゲステロン投与を受けた割合が30.5%と高率であったことを報告している(15)。オランダのコホート研究では、母親が妊娠中にDESを服用したと報告した205例のうち4例が、DES非曝露群8729例のうち8例が尿道下裂であり、有病率比は21.3(95%CI=6.5-70.1)

と、子宮内でDESに曝露された男児における尿道下裂のリスク増加が示唆された(16)。

2) 農薬曝露

職業性曝露について、ノルウェーの出生登録・人口登録・農業登録からの症例対照研究によると、尿道下裂は、トラクターでの農薬散布(OR=1.38 95%CI=0.95-1.99)、トラクターでの農薬散布と穀類生産(OR=1.51 95%CI=1.00-2.26)でオッズ比が上昇し、農薬との関連が示唆された(17)。

3) 有機塩素化合物

Longneckerら(18)が、アメリカでコホート内症例対照研究を行い、尿道下裂・停留精巣と妊娠後期における母体血清中の

1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)-ethane(p,p'-DDE)との関連を検討したところ、尿道下裂・停留精巣ともに有意な関連は見られなかった(尿道下裂 OR=1.29 95%CI=0.6-2.4、停留精巣 OR=1.39 95%CI=0.7-2.4)。

Biancaら(19)は、イタリアのシチリア島の、精油所、石油副産物の化学製品工場の多い産業都市Augusta、温室栽培の盛んな農業都市Vittoriaで出生した尿道下裂児と、比較的曝露の少ない商業都市Cataniaで出生した尿道下裂児について症例対照研究を行った。Hydrocarbon曝露の可能性のあるAugustaの有病率は、12.1人/1000男児出生、農薬曝露の可能性のあるVittoriaの有病率は、7.4人/1000男児出生であり、イタリア・シチリア島の有病率から計算された期待有病率を基に比較すると、各々RR=3.8(95%CI=2.16-6.14)、RR=2.3(95%CI=1.48-3.43)であった。ポアソン

分布に基づき全出生を対象とした予測値からの差は、統計学的に有意であった (Augusta:P=0.00003, Vittoria:P=0.04)。なお比較的曝露の少ないCataniaの有病率は1.7人/1000男児出生であった。さらに、父親の職業性曝露についてもオッズ比の上昇がみられ、Augusta (精油所での労働) では OR=5.5 (95%CI=1.22-24.7)、Vittoria (温室での労働) では OR=2.9 (95%CI=1.01-8.55) であり、化学物質、農薬曝露との関連を認めた。

一方、Northら(20)は、コホート研究により、ベジタリアンの母親から出生した男児における尿道下裂のオッズ比の上昇が認められ (OR=2.07 95%CI=1.00-4.32)、外因性エストロゲンは、化学物質由来のみならず食物の摂取による植物エストロゲン (deizein, genestein など) によるものの関与も示唆されている。

4) その他

Dolkら(21)は、ヨーロッパ5カ国21廃棄物埋め立て施設周辺に居住する母親を対象として症例対照研究を行ったところ、処分場から3km以内に居住する母親からの尿道下裂出生リスクは、処分場から3-7kmに居住する母親からのリスクと比較して上昇傾向を認めた (OR=1.96 95%CI=0.98-3.92)。

2. 分子疫学研究

1) 基本的属性 (表1)

低出生体重児で有意なオッズ比の上昇が見られた。母出産時年齢や妊娠中の喫煙は、有意な関連は見られなかった。

表1 基本的属性

	症例 (%)	対照 (%)	Adjusted OR	95%CI
低出生体重	62.5	18.8	7.2	2.6-20.4
出産時年齢≥35	33.3	14.3	3.0	0.97-9.3
妊娠中の喫煙	12.5	12.0	1.1	0.2-4.6

2) 遺伝子多型オッズ比 (表2)

母親の出産時年齢、出生児体重、妊娠中の喫煙で調整して解析したところ、GSTM1, GSTT1 に有意な関連は見られなかったが、CYP1A1 野生型と比較して、変異型ヘテロ、変異型ヘテロ+ホモで有意なオッズ比の上昇が見られた (各 OR=0.2, 95%CI=0.04-0.7 OR=0.3 95%CI=0.1-0.97)。

表2. 母の遺伝子多型オッズ比

	症例 (%)	対照 (%)	Adjusted OR	95%CI
GSTM1 null	58.1	50.8	1.1	0.3-3.6
GSTT1 null	61.3	54.2	1.1	0.3-3.8
CYP1A1 heterozygous	29.0	54.7	0.2	0.04-0.7
CYP1A1 hetero+homozygous	51.6	71.9	0.3	0.1-0.97

D. 考察

1. 文献レビュー

文献レビューを行って考えられる問題点としては、先天奇形など比較的まれな疾患は、症例対照研究が行われやすいが、症例対照研究では、①日本では登録制度がないため、病院の診療録から選出の際の選択バイアスが生じる可能性があること；②胎児期曝露について母親

に妊娠中のことを聞く際の思い出しバイアスが避けられないこと；③対照の協力が得られにくいこと；④対照として協力してくれる参加者の選択バイアスの可能性があること、等であると考えられる。

先天異常など妊娠中に転帰が決まってしまう疾患については、出生後の後ろ向きの曝露評価は困難であり、化学物質などとの直接的な関連を明らかにするには前向き研究が望ましいが、前向きコホート研究は、①長期間にわたる調査に協力してくれる参加者を集めることの困難さ；②その集団を追跡する労力と費用の問題；③出生時に採取した生体試料を保存する場所と費用の問題、など多くの問題がある。

また、内分泌攪乱物質に関する疫学研究では、①対象者の多くは、複数の地域・環境で、様々な物質に由来する化学物質を、多様な経路（経皮、経口、吸入）により曝露されているので、質問紙調査では化学物質の曝露量評価が困難であること；②化学物質を定量する生体試料を採取するのが困難であること；③現在の内分泌攪乱物質の測定には、大量の生体試料が必要であること、が問題であると考えられる。

尿道下裂と内分泌攪乱物質との関連を示唆する報告もあったが、両者の因果関係を適切に評価するためには、今後、信頼性の高い研究デザインを用いた研究の必要性があると考えられた。

2. 分子疫学研究

本研究では、低出生体重児で尿道下裂のリスクが上昇し、CYP1A1 変異型ヘテロまたは、変異型ヘテロ+ホモで有意なリス

ク減少が認められた。

近年、尿道下裂の疫学研究にて、Gattiら(22)はNICUのSGA児における尿道下裂発生率は、一般人口の10倍であった、と報告している。また、一般人口と比べて、尿道下裂児の平均出生体重は低いことや(23)、子宮内発育遅延との関連(24)も指摘されている。本研究は、これらの先行研究を支持し、尿道下裂と胎児発育との関連を示唆するものであった。

CYP1A1はPCBやダイオキシンを代謝するaryl hydrocarbon hydroxylase(AHH)活性に関わっている(25, 26, 27)のみならず、エストロゲン不活性の2-OHエストロゲンの代謝を産生することでエストロゲン代謝に関わっている(28)。先行研究では、CYP1A1変異型が、ホルモン依存性腫瘍である乳がんのリスクを低下する(29, 30, 31)ことや、上昇すること(32, 33, 34)が報告され、また、CYP1A1はプロゲステロン・デヒドロエピアンドロステロンの水酸化に関わっている(35)ことも指摘されている。正常な尿道の発達はホルモンのバランスによることから、尿道下裂の発生において、CYP1A1は、化学物質代謝の作用よりもエストロゲン作用の働きの方が大きいことが示唆された。

E. 結論

尿道下裂と内分泌攪乱物質との関連を示唆する報告もあったが、両者の因果関係を適切に評価するためには、今後、信頼性の高い研究デザインを用いた研究の必要性があることが示唆された。

尿道下裂の発生において、CYP1A1は、化学物質代謝の作用よりもエストロゲン作用の働きの方が大きいことが示唆さ

れた。

参考文献

- (1) Wu WH et al. Developmental anomalies and disabilities associated with hypospadias. *J Urol*. 2002;168:229-232.
- (2) Paulozzi LJ. International trends in rates of hypospadias and cryptorchidism. *Environ Health Perspect* 1999;107:297-302.
- (3) Sumiyoshi Y. et al. Studies on the frequency of congenital malformations in Japan and Asian countries. *Congenit Anom* 2000;40:S76-86.
- (4) 住吉好雄ら. 我が国における先天異常の報告. *産婦人科の世界*. 2000;53:737-748.
- (5) Imaizumi Y. et al. The prevalence at birth of congenital malformations at a maternity hospital in Osaka city, 1948-1990. *Jpn J Human Genet* 1991;36:275-287.
- (6) Aho MO. et al. Geographical differences in the prevalence of hypospadias in Finland. *Environ Res* 2003;92:118-123.
- (7) Toppari J. et al. Trends in the incidence of cryptorchidism and hypospadias, and methodological limitations of registry-based data. *Hum Reprod Update* 2001;7:282-286.
- (8) Aho M. et al. Is the incidence of hypospadias increasing? Analysis of Finnish hospital discharge data 1970-1994. *Environ Health Perspect* 2000;108:463-465.
- (9) Virtanen HE. et al. The birth rate of hypospadias in the Turku area in Finland. *APMIS* 2001;109:96-100.
- (10) Kurahashi N. et al. The estimated prevalence of hypospadias in Hokkaido, Japan. *J Epidemiol* 2004;14:73-77.
- (11) Paulozzi LJ. et al. Hypospadias trends in two US surveillance systems. *Pediatrics* 1997;100:831-834.
- (12) Nadia BK. Et al. Sexually dimorphic expression of estrogen receptors, but not of androgen receptors in human fetal external genitalia. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:692-698.
- (13) Aarskog D. Clinical and cytogenetic studies in hypospadias. *Acta Paediatr Scand Suppl* 1970;Suppl 203:1
- (14) Czeizel A, Huiskes N. A case-control study to evaluate the risk of congenital anomalies as a result of allylestrenol therapy during pregnancy. *Clint her* 1988;10:725-739.
- (15) 榊原尚行ら. 尿道下裂の臨床的、内分泌学的検討. *日本泌尿器科学会雑誌*. 1985;76:716-722.
- (16) Klip H. et al. Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol in utero: a cohort study. *Lancet* 2002;359:1102-1107.
- (17) Kristensen P. et al. Birth defects among offspring of Norwegian farmers, 1967-1991. *Epidemiology* 1997;8:537-544.
- (18) Longnecker MP. Et al. Maternal serum level of 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl

-)ethylene and risk of cryptorchidism, hypospadias, and polythelia among male offspring. *Am J Epidemiol* 2002;155:313-322.
- (19) Bianca S. et al. Elevated incidence of hypospadias in two sicilian towns where exposure to industrial and agricultural pollutants is high. *Reprod Toxicol* 2003;17:539-545.
- (20) North K. et al. A maternal vegetarian diet in pregnancy is associated with hypospadias. *Br J Urol Int* 2000;85:107-113.
- (21) Dolk H. et al. Risk of congenital anomalies near hazardous-waste landfill sites in Europe: the EUROHAZCON study. *Lancet*. 1998;352:423-427.
- (22) Gatti JM. et al. Increased incidence of hypospadias in small-for-gestational age infants in a neonatal intensive-care unit. *BJU. Int.*, 2001;87:548-550.
- (23) Hughes IA. et al. Reduced birth weight in boys with hypospadias: an index of androgen dysfunction? *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed.*, 2002;87:150-151.
- (24) Hussain, N. et al. Hypospadias and early gestation growth restriction in infants. *Pediatrics*, 2002;109:473-478.
- (26) Landi MT. et al. Association between CYP1A1 genotype, mRNA expression and enzymatic activity in humans. *Pharmacogenetics*, 1994;4:242-246.
- (27) Kiyohara C. et al. The relationship between aryl hydrocarbon hydroxylase and polymorphisms of the CYP1A1 gene. *Jpn. J. Cancer Res.*, 1996; 87:18-24.
- (28) Taioli E. et al. A CYP1A1 restriction fragment length polymorphism is associated with breast cancer in African-American women. *Cancer Res.*, 1995;55:3757-3758.
- (29) da Fonte de Amorim, L. et al. CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 polymorphisms and breast cancer risk in Brazilian women. *Cancer Lett.*, 2002;181:179-186.
- (30) Miyoshi Y. et al. Breast cancer risk associated with CYP1A1 genetic polymorphisms in Japanese women. *Breast J* 2002;8:209-215.
- (31) Hefler LA. et al. Estrogen-metabolizing gene polymorphisms in the assessment of breast carcinoma risk and fibroadenoma risk in Caucasian women. *Cancer* 2004;101:264-269.
- (32) Taioli, E. et al. Role of estradiol metabolism and CYP1A1 polymorphisms in breast cancer. *Cancer Detec. Prev.*, 1999;23:232-237.
- (33) Ishibe N. et al. Cigarette smoking, cytochrome P450 1A1 polymorphisms, and breast cancer risk in the Nurses' Health Study. *Cancer Res.*, 1998;58:667-671.
- (34) Huang CS. et al. Breast cancer risk associated with genotype polymorphism of the