

製 Milli-Q (EDS ポリッシャー付き) で精製した水を使用した。

【実験用器具】 ガラス製の実験器具は、すべて 200℃ 以上で加熱後使用した。

#### 【LC/MS 装置及び測定条件】

LC/MS 装置 (機種: Agilent 1100 LC/MSD-SL)

#### LC 条件

・分析用カラム: 関東化学社製 Mightysil RP18 GP (2.1 x 100 mm, 5 μm)

・ガードカラム: 関東化学社製 Mightysil RP18 GP (2 x 5 mm, 5 μm)

・前処理用カラム: TOSOH 社製 TSK-PRECOLUMN BSA-ODS/S (4.6 x 10 mm, 5 μm)

・移動相: アセトニトリル+0.02%酢酸アンモニウム/0.02%酢酸アンモニウム溶液 (70:30 (8 min)→95:5 (10 min) (V/V))

・流速: 0.2 ml/min (分析カラム)、0.5 ml/min (前処理カラム)

・カラム温度: 40℃

・注入量: 30 μl

#### MS 条件

・イオン化法: Electrospray (ESI), Negative

・Nebulizer gas: N<sub>2</sub> (35 psi)

・Drying gas: N<sub>2</sub> (12 l/min, 350℃)

・フラグメンター電圧: 130 V (NP, NP-d<sub>5</sub>)

・モニタリングイオン (m/z): 219 (NP), 224 (NP-d<sub>5</sub>)

#### 2. オンライン前処理-LC/MS 法の測定概要

血清試料に同量のアセトニトリルを加え、遠心分離を行った。その後、上清を取り、暫定濃度になるように内標準物質を添加し、測定用試料とした。抽出精製・濃縮は、オンライン前処理固相カラムを用いて行い、カラムスイッチングにより、分析対象物質を分離部及び検出部 (LC/MS) に導入する。検出には、ESI-MS による SIM モードネガティブで測定を実施した。

#### 測定試料の調製法

測定対象とした血清は神奈川県食肉衛生検査所にてした屠殺した血液を用い、神奈川県衛生研究所で遠心分離 (3000rpm, 10 分間) を行い、使用に供するまで -80℃ にて凍結保存した。測定時には室温解凍し、転倒混和を行った後に、ピペッターで正確に 1 ml を量り取り、試験管に移した。この試験管は、あらかじめ洗浄後に精製水、アセトンを通液したものを使用した。血清が入った試験管に標準溶液を血清中 50

μg/ml となるように添加した。次に、血清と同量のアセトニトリルを加え混和後、遠心分離 (3000rpm, 30min, 4℃) を行った。その後、上清 1 ml をバイアル瓶に正確に量り取り、暫定濃度になるように内標準物質である、NP-d<sub>5</sub> を加え、測定に供した。

#### 標準試料の調製法

各標準品を化学天秤で 100 ml 用メスフラスコに 100 mg 量り取り、標準原液としてアセトニトリルで 1.0 mg/ml とする。その後、0.2~100 μg/ml の濃度範囲になるようにアセトニトリル/水=1/1 (V/V) 溶液を加え調製する。又、内標準物質を暫定濃度になるよう希釈する。

その後、LC/MS-SIM 法により標準試料溶液を測定し、内標準法を用いて各濃度範囲内における検量線を作成し、定量分析を行った。

#### D. 結果

生殖年齢を中心とした婦人群の平均年齢 30.9 歳でサンプル数を図 1 に、疾患内訳を図 2 に示す。さらに居住地域分布を図 3 に示した。

各サンプルについて、前述の方法で各物質の濃度を測定した。それぞれ 0.5ng/ml をカットオフ値とした。血清および腹水から各物質が検出された頻度は図 4、5 のとおりである。血清中においては、BA は 127 例中 2 例 (1.5%)、DEHP は 126 例中 14 例 (11.1%)、NP は 127 例中 34 例 (26.8%) でそれぞれ検出された。腹水中では BA が 97 例中 1 例 (1.0%)、DEHP は 99 例中 25 例 (25.3%)、NP は 101 例中 10 例 (9.9%)、でそれぞれ検出された。また検出された濃度の平均値は図 6 の通りである。DEHP が血清および腹水中で最も高い濃度で検出された。

周産期サンプルの提供者の平均年齢は 31.9 才であった。各種サンプル数を図 7 に、地域分布を図 8 に示した。

各サンプルについて、前述の方法で各物質の濃度を測定し、それぞれ 0.5ng/ml をカットオフ値とした。サンプルごとの各物質の検出頻度を図 9~12 に示す。BA は母体血で 86 例中 1 例 (1.2%)、尿中で 16 例中 1 例 (6.3%)、DEHP は母体血で 79 例中 4 例 (5.1%)、さい帯血で 46 例中 1 例 (2.1%)、また NP は母体血で 78 例中 6 例 (7.7%)、さい帯血で 48 例中 4 例 (8.3%)、尿で 16 例中 12 例 (75%) の検出率であった。最も高頻度に検出されたのは、尿中の NP (75%) であった。また検出濃度を図 12

に示す。DEHP が母体血、およびさい帯血で最も高値を示した。

#### E. 考察

今回、生殖年齢を中心とした婦人の血清、腹水中とも最も高濃度に検出されたのは DEHP であったが、いずれも危険値を超えるほどの濃度には至っていない。またサンプルの提供者の居住地区および疾患と、検出濃度の間には有意な差は認められなかった。化学物質の暴露は提供者の食事、喫煙、飲酒等をふくむ生活習慣によって大きく左右されることが予想される。しかし現時点での検出例数は少なく、今後はモニタリングを続けるにあたっては、検出濃度と提供者の詳しい生活習慣についてもさらにより詳細に検討する必要があると思われる。

周産期サンプルにおいては、各物質とも母乳からの検出はなかった。また最も高頻度に検出されたのは、尿中の NP であった。また DEHP は決して検出率は高くないが、検出されたサンプルでは母体血、さい帯血で最も高い濃度を示した。また DEHP は血液中では比較的高濃度で検出されているが、尿中からの検出はなく、BA や NP とは異なり、モノ体の測定も必要であることが示唆される。このため DEHP については今後、脂肪組織など他の検体における濃度についても検討の必要があると思われる。また今回検出された検体では危険値を超える濃度を示したものは認められなかった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的所有権の取得状況

なし

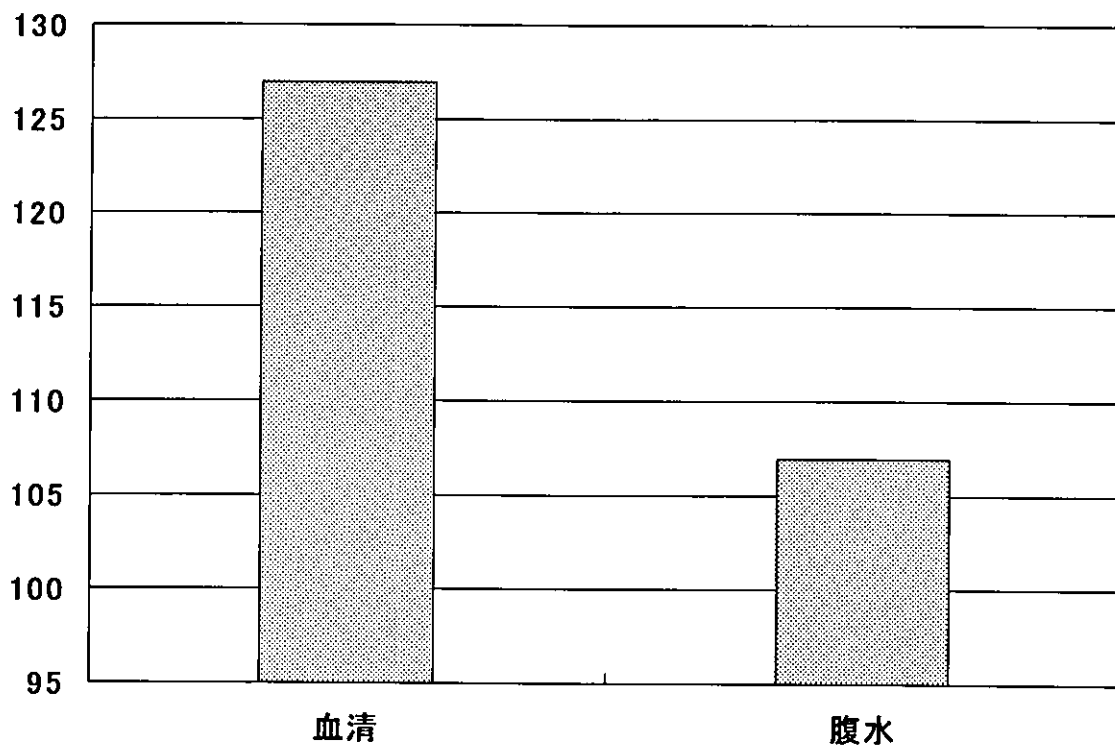
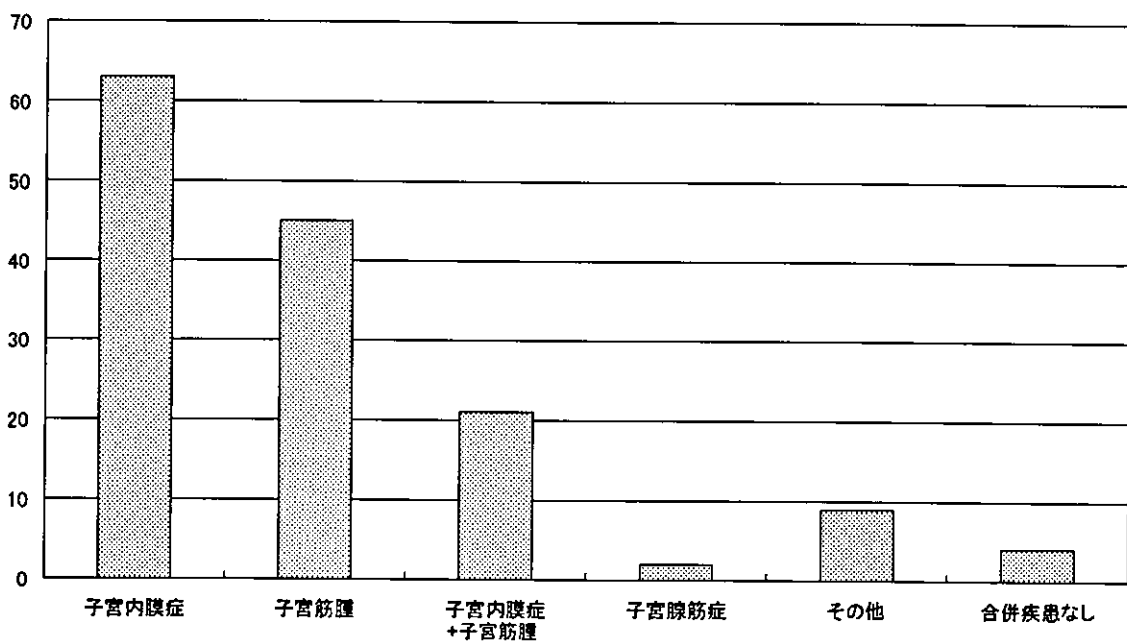


図1 婦人科サンプル群



注:重複あり

図2 合併疾患サンプル群



平塚市	2	1	東京都	2
秦野市	1	3	埼玉県	1
横浜市	1	1	岐阜県	1
海老名市	8		静岡県	3
伊勢市	7			
小田原市	8			
南足柄市	6			
大磯町	4			
藤沢市	3			
相模原市	2			
町田市	2			
座間市	1			
綾瀬市	2			
津久井町	2			
横須賀市	1			
愛川町	1			
茅ヶ崎市	1	3		
厚木市	1	5		
二宮町	1			
開成町	1			

図3 婦人科疾患サンプリング数・地域別 (n=134)

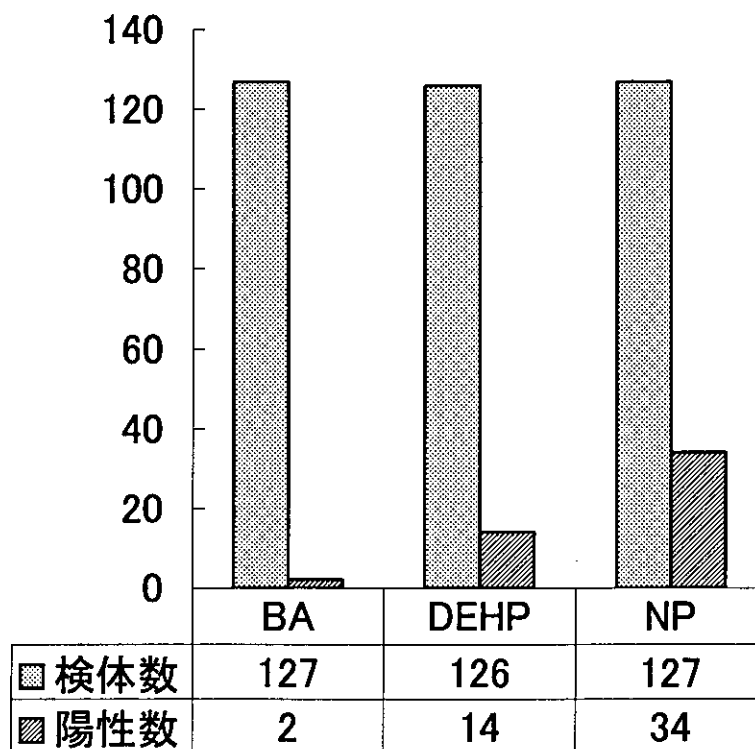


図4 検出頻度 (血清)

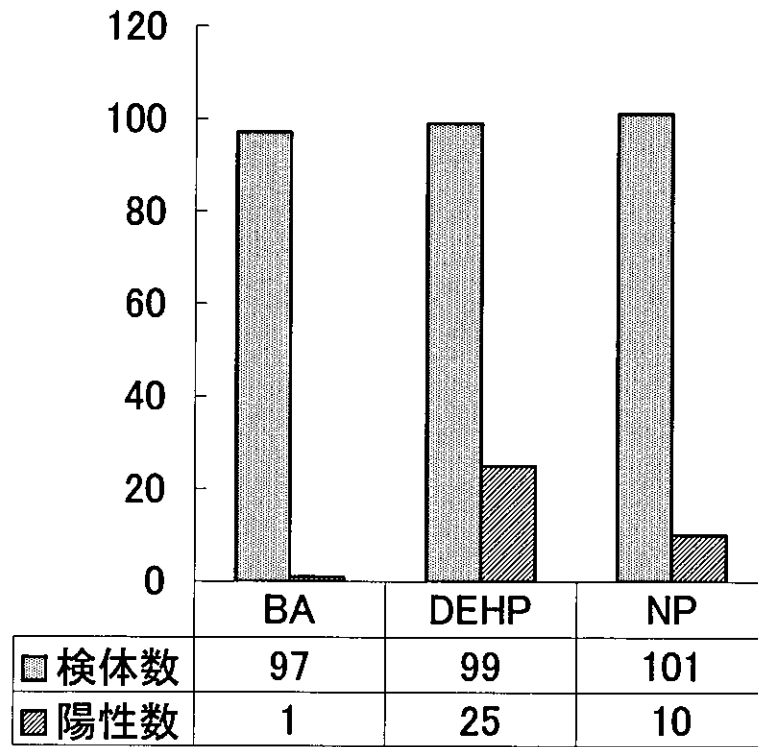


図5 検出頻度 (腹水)

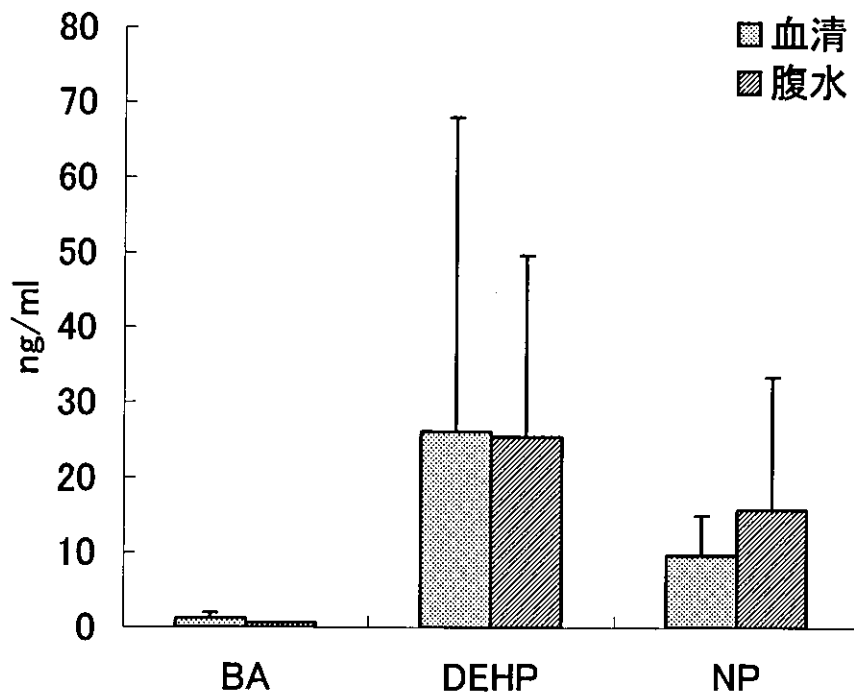


図6 検出濃度

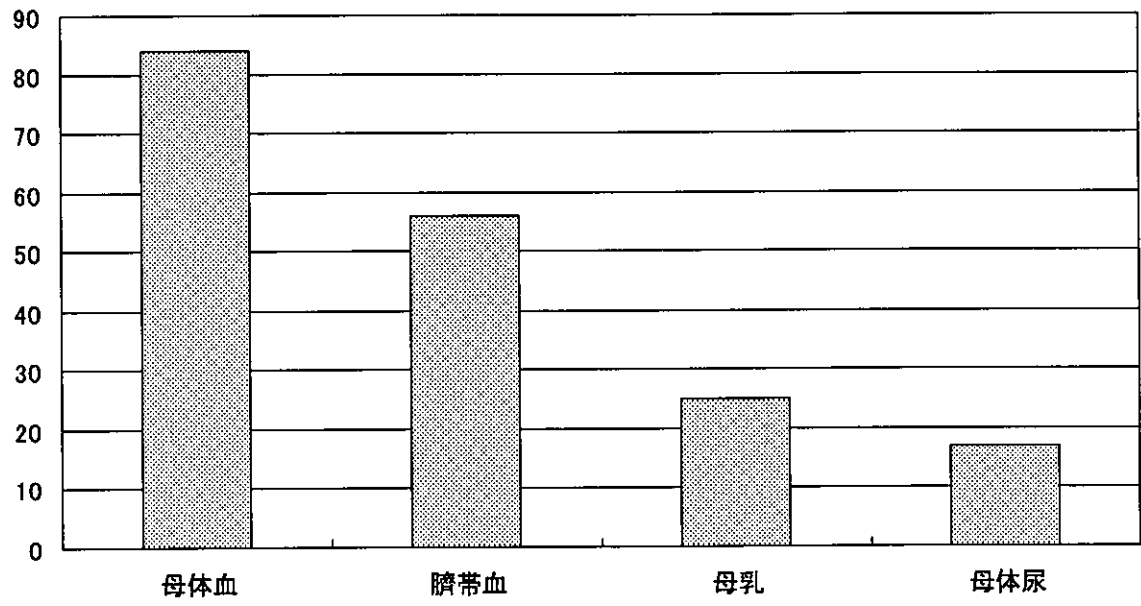
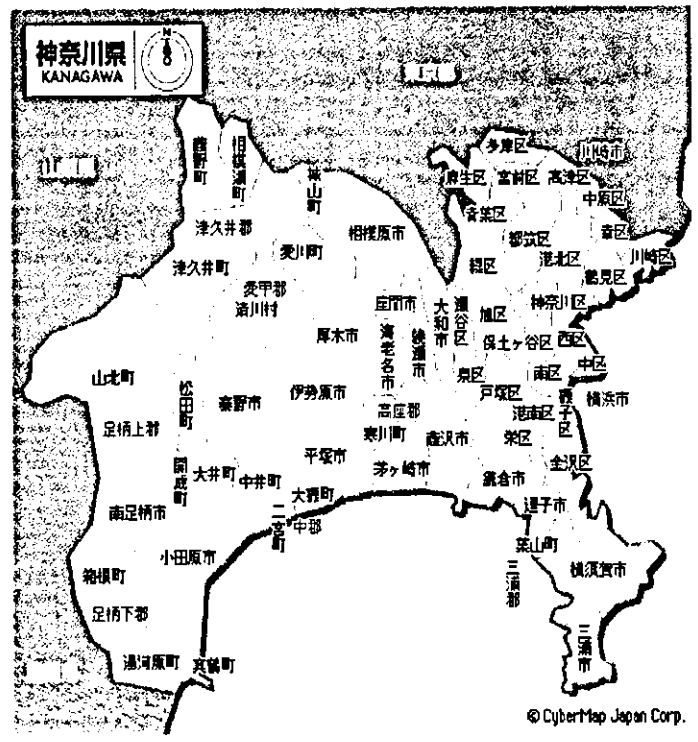


図7 周産期サンプル群



伊勢原市	20	静岡県	8
横浜市	6	東京都	4
平塚市	6	埼玉県	1
秦野市	11	富山県	1
座間市	3	宮崎県	1
小田原市	3	茨城県	1
厚木市	10		
大磯町	2		
茅ヶ崎市	3		
海老名市	1		
大和市	1		
綾瀬市	1		
相模原市	1		
横須賀市	1		
藤沢市	2		
足柄下郡	1		

図8 周産期サンプリング群・地域 (n=84)

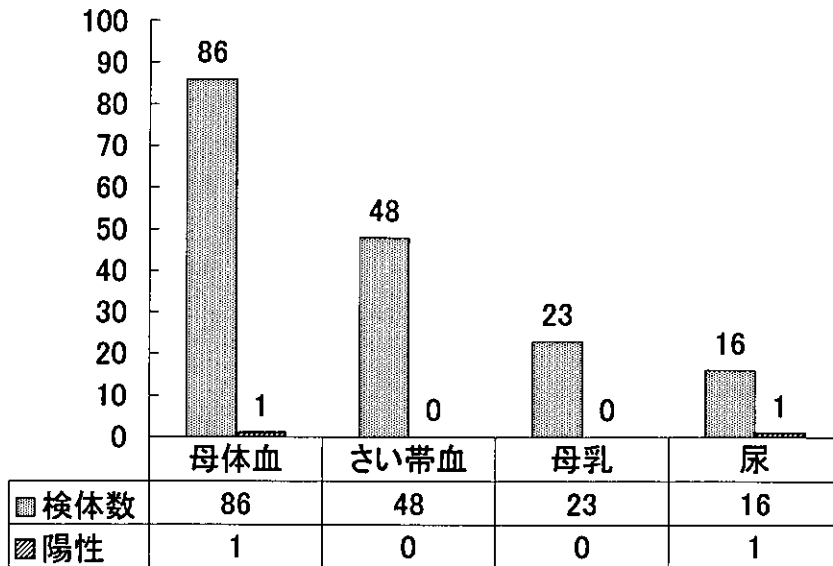


図9 検出頻度 (BA)

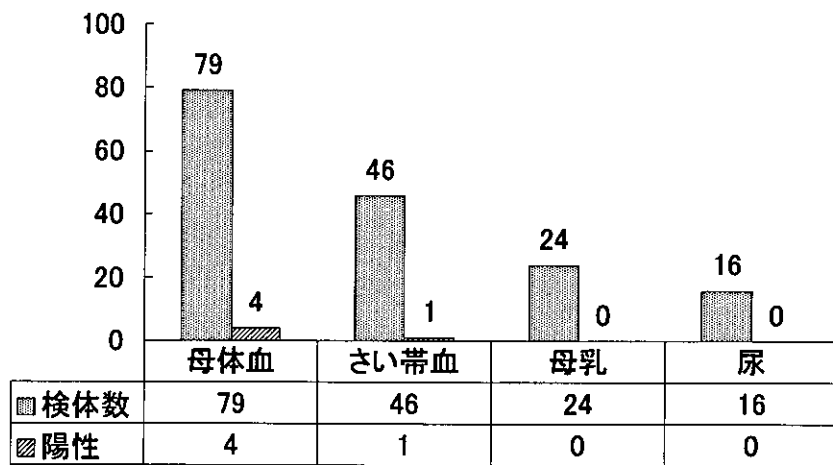


図10 検出頻度 (DEHP)

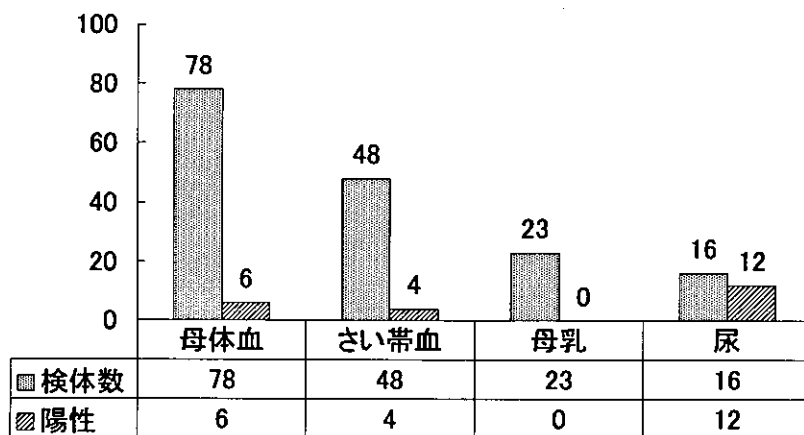


図11 検出頻度 (NP)

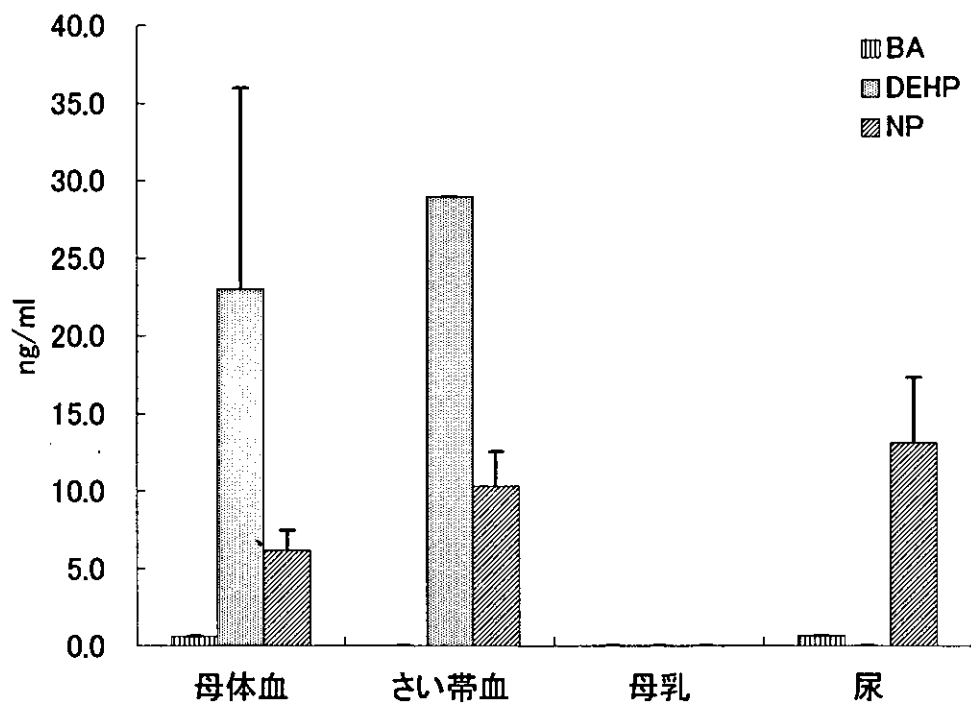


図 12 検出濃度





厚生科学研究費補助金（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  
主任研究者：牧野恒久 東海大学医学部教授

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  
研究協力者：横田 博 酪農学園大学

研究要旨

ラット、モルモ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解析した。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アーとして機能しているが、胎盤ではグルクロン酸抱合されないと胎児側に移行す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を明らかにし、一過性の暴露でもその後の遺伝子発現に長期にわたる影響を及ぼし得ることを示唆する結果を得た。

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アーであるので、それらの器官形成・機能発現への内分泌かく乱物質の影響や、そこでの代謝解毒反応を中心とした研究が重要である。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うと共に、各種臓器の灌流システムを確立して、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)、およびその代謝産物 Mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP) を例にとり、主にマウス胎盤の幹細胞を用いた解析により、それらの妊娠母体への曝露が胎盤形成あるいはその機能におよぼす影響を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

B-1 実験動物、倫理面への配慮

本研究に用いた実験動物は、購入後速やかに、あるいは、専用の動物飼育室内で自由な給餌と給水をあたえて任意の期間飼育した後に、頸椎脱臼あるいは断頭により屠殺した。飼育・屠殺

は、各大学の動物実験実施規則を遵守して行った。

B-2 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に加え、ラット子宮およびモルモット胎盤の灌流システムを確立し用いた。ラット子宮はその一部を切除し、両端を結紮後、灌流液に浸した。1-ナフトールまたはビスフェノール A を子宮血管側（奨膜側）および子宮粘膜側から暴露し、経時的に灌流液中の代謝物を HPLC で分析した。

B-3 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ソームを調整し、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-4 DEHP の胎盤形成および胎児発生への影響の解析

妊娠雌マウス (ICR 系統) の腹腔に、妊娠 6.5 日目および 7.5 日目の 2 度、体重 1 kg 当たり 0、0.2、20 および 200 mg の DEHP を尾静脈注射した。その後、妊娠 8.5 日目に胎児を含む子宮脱落膜組織を採取し、組織学的解析に供した。

B-5 DEHP の胎盤細胞分化への作用の解析

0、0.2、20 および 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の DEHP 存在下でマウス栄養膜幹細胞 (TS 細胞) を培養し、増殖能および形態への影響の有無を検討した。

B-6 MEHP の胎盤細胞分化への作用の解析

0、0.5、50、および 500  $\mu\text{M}$  の MEHP 存在下

でマウス 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ト法により解析した。B-7 MEHP の DNA メチル化への作用の解析

FGF4 存在下で未分化のまま維持された TS 細胞、および、FGF4 非存在下で分化誘導条件におかれた TS 細胞それぞれの培地に、DMSO に溶解した MEHP を加えて(終濃度 1  $\mu$ M MEHP, 0.1% DMSO) 4 日間培養し、ゲノム DNA を回収した。ゲノム DNA のメチル化状態は、Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS) 法により解析した。RLGS 法は、メチル化感受性制限酵素である NotI による切断の有無を指標に DNA メチル化状態を解析する手法で、多くのゲノム領域を網羅的に解析することができる。

### C. 研究結果および考察

#### 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いた。本研究では、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。胃灌流実験には、小腸や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、吸収されたビスフェノール A の大半がグルクロン酸抱合されて粘膜側に戻されることが判明した。胃粘膜上皮細胞における UGT の発現も確認された。

#### C-2 ラット子宮におけるビスフェノール A の代謝動態の解析

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

#### C-3 ラット子宮での代謝解毒酵素活性の解析

子宮でビスフェノール A などのグルクロン酸抱合を担う酵素分子種の検索をおこなった。免疫組織染色の結果、UGT はラット子宮内膜上皮細胞・子宮腺および卵管上皮細胞に発現していた。この分子種の一つは UGT1A6 であったが、

肝臓でビスフェノール A の抱合を担っている UGT2B1 は発現していなかった。分子種特異的抗体を用いて、ウエスタンブロット法を行ったところ、ラット子宮には UGT1A6 の他に、肝臓では発現していない 2B ファミリー分子種も発現しており、発情周期によって発現量が異なると予測された。UGT2B1 は子宮内では発現していないので、ビスフェノール A をグルクロン酸抱合する分子種はこの中に存在すると思われる。

#### C-4 ラット子宮内膜上皮細胞を用いた代謝解毒酵素活性の解析

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。

#### C-5 ラット子宮間質細胞を用いた代謝解毒酵素活性の解析

妊娠ラット子宮から間質細胞を単離培養し、酵素活性を測定する系を構築した。これにより、妊娠ラット子宮間質細胞に低い値ながらビスフェノール A のグルクロン酸抱合能が存在していることを確認できた。この結果は、免疫組織染色によるグルクロン酸抱合酵素の局在の結果と一致した。

#### C-6 モルモット胎盤におけるビスフェノール A の代謝動態の解析

モルモットの胎盤灌流実験系を確立し、1-ナフトールの胎盤での代謝を解析すると、その多くがグルクロン酸抱合され母体側に戻っていた。次にビスフェノール A を灌流したところ、1-ナフトールと異なり、その多くが胎盤を通過した。さらに、移行したビスフェノール A は胎児の様々な臓器にグルクロン酸抱合されていない Free 体のまま蓄積していた。上述の結果とあわせると、ビスフェノール A は非妊娠期には、子宮上皮細胞に存在する UGT によってグルクロン酸抱合(解毒)され、妊娠期にはやはり胎児を取り巻く間質細胞によってグルクロン酸抱合される事により解毒される、すなわち、子宮環境が薬物のバリアーとして機能していることを示している。一方、妊娠後期のモルモット胎盤はそのまま通過することが分かった。ラットおよびモルモットにおいて、ビス

フェノール A が胎児に移行するのは妊娠後期でありそれは胎盤にグルクロン酸抱合酵素が発現していないことに起因すると考えられる。C-7 DEHP の胎盤形成および胎児発生への影響の解析

これまで、妊娠雌マウスへの投与実験や TS 細胞培養系への添加実験により、ベンツピレンは直接は胎盤細胞の分化にほとんど影響を及ぼさないが、母体細胞でのレチノイン酸合成を増加させることにより、二次的な効果を及ぼす可能性があることを明らかにしてきた。これらの解析法にならい、DEHP の妊娠マウスへの投与実験を行った。その結果、低用量 (0.2 mg/kg) 投与群の一部で栄養膜巨細胞の過形成が確認されたが、他の濃度における栄養膜巨細胞の明確な過形成は見られていない。これは、胎盤形成に影響を及ぼす DEHP 濃度に上下の閾値が存在する可能性を示唆し興味深い。胎児の成長 (サイズ、発生ステージ) には、DEHP 投与群と対照群との間で明確な差は見られなかった。C-8 DEHP の TS 細胞への作用の解析

未分化 TS 細胞への DEHP の添加実験では、細胞の増殖能や形態に明確な影響は見られなかった。生体内に取り込まれた DEHP は血中ですみやかに代謝されて MEHP になり、実際に内分泌かく乱作用を示すのは MEHP であると考えられている。DEHP が TS 細胞に対して明らかな作用を示さなかったことは、TS 細胞の培養系では DEHP が MEHP に転換されないことによるものと考えられる。

#### C-9 MEHP の TS 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。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-10 MEHP の TS 細胞ゲノム DNA メチル化への影響の解析

未分化維持条件下、および、分化誘導条件下のどちらにおいても、MEHP 添加による細胞形態の明瞭な変化は観察されなかった。RLGS によるゲノム DNA のメチル化解析では、未分化維持条件下では 20 ヶ所のメチル化の変化が (亢

進 12/阻害 8)、分化誘導条件下では 22 ヶ所のメチル化の変化が (亢進 16/阻害 6) 認められた。また、これらのうち、メチル化の亢進した 2 ヶ所は両条件で共通していた。

#### D. 結論

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。また、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 の発現の役割が環境ホルモンの代謝動態にとって重要であることが分かった。さらに、新たに確立した胎盤灌流システムにより、従来通過すると考えられていた脂溶性で低分子の化学物質でもグルクロン酸抱合されると母親側に戻されることを明らかにした。

MEHP 添加によりゲノム DNA のメチル化異常が検出されたことの意義は大きい。DNA メチル化は細胞分裂後も維持されるので、MEHP の前駆体である DEHP への一過的な暴露が、DNA メチル化の異常を介して慢性的な遺伝子発現異常を引き起こす可能性がある。この結果は、内分泌かく乱作用の研究に“エピジェネティック毒性”という新たなパラダイムを提示するものである。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Matsumoto, J., Yokota, H. and Yuasa, A. Developmental Increase in Rat Hepatic Microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities toward Xenoestrogens and Decrease during Pregnancy. *Environ Health Perspect* 110(2), 193-196 (2002)
- 2) Yokota, H., Miyashita N. and Yuasa, A. High Glucuronidation Activity of Environmental Estrogens in the Carp, *Cyprinus carpio* Intestine. *Life Science* 71(8), 887-898 (2002)
- 3) Yamashiki, N., Yokota, H., Sakamoto, M. and Yuasa, A. Presence of Phenol UDP-glucuronosyltransferase in Bovine Alveolar Macrophages and Bronchial Epithelial Cells. *Toxicology* 176(3),

- 221-227(2002)
- 4) Yokota, H., Kunimasa, Y., Shimoyama, Y., Kobayashi, T., Matsumoto, J. and Yuasa, A. Tissue Specific Effects on UDP-glucuronosyltransferase in Hypophysectomized Rat. *J. Biochem* 132(2), 265-270 (2002)
  - 5) Sakamoto, H., Yokota, H., Kibe, R., Sayama, Y. and Yuasa A. Excretion of Bisphenol A-glucuronide into the Small Intestine and Deconjugation in the Cecum of the Rat. *Biochim. Biophys. Acta.* 1573, 171-176 (2002)
  - 6) Shibata, N., Matsumoto, J., Nakada, K., Yuasa, A and Yokota, H. Male Specific Suppression of Hepatic Microsomal UDP-glucuronosyltransferase Activities toward Sex Hormones in the Adult Male Rat Administered Bisphenol A. *Biochem. J.* 368, 783-788 (2002)
  - 7) Daidoji T, Inoue H, Kato S, and Yokota H. Glucuronidation and excretion of nonylphenol in perfused rat liver. *Drug Metab Dispos.* 31, 993-998 (2003)
  - 8) Inoue, H., Yuki, G., Yokota, H. and Kato S. Bisphenol A Glucuronidation and Absorption in Rat Intestine. *Drug Metab. Dispos.* 31, 140-144 (2003)
  - 9) Narukawa J., Inoue H., Kato S., Yokota H. Glucuronidation of 1-naphthol and excretion into the vein in perfused rat kidney. *Drug Metab. Dispos.* 32, 758-761 (2004)
  - 10) Kibe R, Sakamoto M, Hayashi H, Yokota H, Benno Y. Maturation of the murine cecal microbiota as revealed by terminal restriction fragment length polymorphism and 16S rRNA gene clone libraries. *FEMS Microbiology Letters* 235, 139-146 (2004)
  - 11) Ito, H., Yokota, H., Wang, R., Yamanoshita, O., Ichihara, G., Wang, H., Kurata, Y., Takagi, K. and Nakajima, T. Species differences in the metabolism of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in several organs of mice, rats, and marmosets. *Archives of Toxicology* 1432-0738 (Online), (2004)
2. 学会発表
    - 1) Tomikawa, J., Yan, J., Ohgane, J., Hattori, J., Makino, T., Tanaka, S. and Shiota, K. Effect of benzo(a)pyrene on placentation. Society for the Study of Reproduction 35th Annual Meeting (2002年7月)
    - 2) 松本順也, 井上博紀, 山鋪直子, 湯浅亮, 横田博「ラット子宮に存在する内分泌攪乱化学物質抱合UDP-glucuronosyltransferaseの役割について」第5回環境ホルモン学会(2002年11月)
    - 3) 井上博紀, 福島裕介, 工藤聡子, 横田博, 翁長武紀, 加藤精雄「雌ラット肝におけるビスフェノールA動態の解明」第5回環境ホルモン学会(2002年11月)
    - 4) 佐々木聖史, 結城豪, 井上博紀, 横田博, 翁長武紀, 加藤精雄「ラット肝および町に置けるビスフェノールA動態の系統差」第5回環境ホルモン学会(2002年11月)
    - 5) 大江洋正, 大道寺智, 井上博紀, 横田博, 成川淳一, 翁長武紀, 加藤精雄「ラット精巢灌流法を用いた内分泌攪乱化学物質および植物エストロジェンの動態評価」第5回環境ホルモン学会(2002年11月)
    - 6) 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回日本生化学会(2003年10月)
    - 7) 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回日本環境ホルモン学会(2003年12月)
    - 8) 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回日本環境ホルモン学会(2003年12月)
    - 9) 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回日本環境ホルモン学会(2003年12月)
    - 10) 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回  
日本環境ホルモン学会（2003年12月）

- 11) 五島朋子・富川順子・服部中・田中智・塩  
田邦郎（東京大学）；「フタル酸エステルに  
よるゲノムワイドなDNAメチル化状態への  
影響」；第138回日本獣医学会学術集会  
（2004年9月）

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



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する遺伝子の解明」

分担研究者 木村 稯 （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

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ているが、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。そこで、本疾患の遺伝的要因を遺伝学的相関解析によって明らかにすることを目的とした。

（平成 14 年度 1 年目）

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に対する遺伝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 (*ESR1*)、チトクロム・グルクロン酸抱合酵素 (*CYP1A1*)、アリルヒドロカーボン受容体 (*AHR*) の各遺伝子については、各遺伝子内に存在する多型を明らかにし、その解析方法を確立した。さらに、遺伝的多型マーカーとして有用な高度な多型性を示す遺伝マーカーを設定するために、子宮内膜症患者 2 名および健常者 8 名を用いて、合計 9 遺伝子座について対立遺伝子のタイピングを行い（表 1）、解析方法を確立した。

（平成 15 年度 2 年目）

子宮内膜症候補遺伝子である *ESR1* 遺伝子、*CYP1A1* 遺伝子、*AHR* 遺伝子の各遺伝子について、子宮内膜症との関連を詳細に解析するために、さらに遺伝的多型マーカーの設定を行った。子宮内膜症患者 5 名および健常者 11 名を用いて、各候補遺伝子の対立遺伝子のタイピングを行い、遺伝的多型マーカーとして有用であると予想される Minor allele frequency > 0.2 の SNP マーカーを選定した。*ESR1* 遺伝子については、27 箇所中 13 箇所について Minor allele frequency > 0.2 の SNP マーカーが確認された。同様に、*CYP1A1* 遺伝子および *AHR* 遺伝子については、それぞれ 4 箇所および 1 箇所が確認された。

（平成 16 年度 3 年目）

有用性の検討が行われた遺伝的多型マーカーを用いて子宮内膜症患者 43 名、一般健常者 59 名の日本人試料における、各一塩基多型 (SNP) の対立遺伝子頻度および遺伝子型頻度について遺伝的相関解析を行った。*CYP1A1* 遺伝子および *AHR* 遺伝子については、統計学的有意差を示す対立遺伝子が各々 1 個の遺伝子座で見出された。また、*ESR1* 遺伝子については統計学的有意差を示す対立遺伝子は見出されなかったが、1 個の SNP マーカーにおいて遺伝子型頻度において統計学的有意差が示された。

さらに、*ESR1* 遺伝子のイントロン 5 に存在するマクロサテライト繰り返し配列のタイピングを行い、5 個の対立遺伝子を同定した。また、子宮内膜症患者 32 名、一般健常者 42 名の日本人試料において、各対立遺伝子頻度に関する相関解析を行った結果、1 個の対立遺伝子において統計学的有意差が示された。

A. 研究目的

一般にヒト疾患は遺伝要因と環境要因の組

み合せによって規定されることが考えられる。極端な例としては、単一遺伝性疾患のレッシュナイ



ハン症候群などの場合は遺伝要因が大きく寄与し、また、交通事故による骨折や脳挫傷などは物理的な外力つまり環境要因がその主たる原因である。現在までに進められてきた疾患の遺伝要因の解析の多くは、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。

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。しかし一方で、同一の環境条件下でもその反応性に個人差があることは良く経験されることである。

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方法、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に対応する遺伝子を選定した。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 (*ESR1*)、チトクロム・グルクロン酸抱合酵素 (*CYP1A1*)、アリルヒドロカーボン受容体 (*AHR*) の各遺伝子である。これらの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、高密度な遺伝マーカーの設定およびその遺伝的多型の解析法を確立し、さらに、子宮内膜症患者集団および健常者集団を用いて、各遺伝マーカーの対立遺

伝子頻度および遺伝子型頻度について、遺伝学的相関解析によって子宮内膜症感受性対立遺伝子を同定することを目指とした。

## 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、約 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*, *CYP1A1*, *AHR*) のゲノム領域内において SNPs の検出を行うためには、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)、遺伝子間のスペーサー領域に存在する 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。

現在までにヒト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 の箇所ごとに設計した (表 2)。このソフトウェアは PCR に適

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り、この点は精査した。

#### 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 断片が検出できなかつたり、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変化させることによって特異的な DNA 増幅を検討した。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、SNP 検出においては、PCR 増幅条件を十分に検討することが重要である。

#### 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。

#### 6. 統計解析

対立遺伝子頻度および遺伝子型頻度は、各対立遺伝子および遺伝子型を直接カウントすることによって算出した。患者および健常者集団の間で対立遺伝子の分布に関する偏りは、Fisher の P 検定によって調べた。このとき、 $P < 0.05$  を統計学的有意差とした。オッズ比および 95% 信頼区間は全てのマーカーで解析された。各集団において、遺伝子型頻度がハーディ・ワインベルグの平衡状態にあることも解析した。

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十分に配慮した。採取する試料は、臨床診断に

も利用する血液の一部、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 号の承認を 2002 年 10 月 17 日に得たが、その後、本研究班の班会議において、人体の暴露量測定には尿や毛髪、または子宮内膜症の検査に必須の腹水も有効な試料となる可能性が示されたことから、再度変更申請を行い、伊医倫 02-053 号の承認を 2002 年 11 月 27 日に得ている。

一方この研究について、本大学医学部では情報管理、遺伝カウンセリングの体制も十分備えて万全を期している。

### C. 研究成果

#### (1 年目)

##### 1. 遺伝的多型箇所の検索

現在までに報告されている文献等によって子宮内膜症候補遺伝子を *ESR1* 遺伝子、*CYP11A1* 遺伝子、*AHR* 遺伝子の 3 遺伝子に選定した。さらに、上記 3 遺伝子について遺伝的多型箇所をデータベースおよび文献検索によって調べた。*ESR1* 遺伝子については、イントロン 1 において 3 個、エクソン 4 において 1 個の SNPs を選定し、子宮内膜症患者 2 名および健常者 8 名を用いて、対立遺伝子のタイピングを行った (表 1)。その結果、イントロン 1 における 1 個の SNP を除く 3 個の SNPs について多型を確認した。また、*CYP11A1* 遺伝子については、エクソン 7 において 1 個、3' flanking 領域において 1 個の SNPs を選定し、同様にタイピングを行った。その結果、2 個の SNPs とともに多型を確認した (表 1)。さらに、*AHR* 遺伝子についてはエクソン 10 に存在する 3 個の SNPs を選定し、同様にタイピングを行った。その結果、1 個の SNP において多型を確認した (表 1)。

#### (2 年目)

##### 2. 遺伝的多型マーカーの設定

子宮内膜症と各候補遺伝子の関係を詳細に調べるために、さらに遺伝マーカーの設定を行った。患者群 5 名、対照群 11 名を用いて、子宮内膜症候補遺伝子内に検出された遺伝的多型箇所のうちランダムにいくつかの SNP を選択して、塩基配列の決定を行った。その結果、*ESR1* 遺伝子については SNPs 45 箇所中 34 箇所において多型性が確認された。さらに、多型が

確認されたこれらの SNP について Minor allele frequency を算出したところ、多型マーカーとして有用であると予想される Minor allele frequency が 0.2 以上の SNPs を 20 箇所を確認した (表 2)。同様に、*CYP11A1* 遺伝子については SNP33 箇所中 8 箇所において多型性が確認され、Minor allele frequency が 0.2 以上の SNP は 4 箇所存在していた (表 3)。また、*AHR* 遺伝子については SNP11 箇所中 5 箇所において多型性が確認され、この 5 箇所の SNP は Minor allele frequency が 0.2 以上を満たしていた (表 4)。

(3年目)

患者群 5 名、対照群 11 名について、子宮内膜症候補遺伝子内に検出された遺伝的多型箇所のうちランダムに SNP を選択して、塩基配列の決定を行った。その結果、*ESR1* 遺伝子については SNP43 箇所中 31 箇所において多型性が確認された。さらに、多型が確認されたこれらの SNP について Minor allele frequency を算出したところ、多型マーカーとして有用であると予想される Minor allele frequency が 0.2 以上の SNP を 26 箇所を確認した (表 6)。同様に、*CYP11A1* 遺伝子については SNP32 箇所中 8 箇所において多型性が確認され、Minor allele frequency が 0.2 以上の SNP は 4 箇所存在していた (表 6)。また、*AHR* 遺伝子については SNP11 箇所中 5 箇所において多型性が確認され、この SNP はすべて Minor allele frequency が 0.2 以上を満たしていた (表 6)。

### 3. 遺伝的相関解析

子宮内膜症患者集団において特異的な対立遺伝子が存在するかを調べるために、上記のようにして設定された SNP マーカーを用いて、日本人対象者集団 59 人と子宮内膜症患者 43 人における相関解析を子宮内膜症候補遺伝子である *ESR1* 遺伝子、*CYP11A1* 遺伝子、*AHR* 遺伝子の各遺伝子について行った。*ESR1* 遺伝子については、17 箇所の SNPs マーカー (プロモーター領域 1 個、翻訳領域 2 個、非翻訳領域 2 個、イントロン領域 12 個) を用いた。その結果、統計学的な有意差を示す対立遺伝子は見い出されなかった。

しかしながら、遺伝子型頻度については 1 箇所の SNPs マーカーにおいて統計学的な有意差を示した (*rs2228480*)  $P=0.031$ , Odds Ratio=8.06,  $\chi^2=4.67$  (表 7, 8)。*CYP11A1* 遺伝子については、4 箇所の SNPs マーカー (プロモ-

ーター領域 1 個、翻訳領域 1 個、イントロン領域 1 個、3' flanking 領域 1 個) を用いた。その結果、プロモーター領域における SNP マーカーにおいて統計学的な有意差を示す対立遺伝子が見出された (*rs3826041*)  $P=0.007$ , Odds Ratio=2.16,  $\chi^2=7.34$  (表 7)。*AHR* 遺伝子については、5 箇所の SNPs マーカー (翻訳領域 1 個、イントロン領域 4 個) を用いた。その結果、統計学的な有意差を示す対立遺伝子が 1 箇所の SNP マーカーにおいて見出された (*rs2106728*)  $P=0.038$ , Odds Ratio=2.16,  $\chi^2=4.32$  (表 7)。さらに、遺伝子型頻度についても上記の SNPs マーカーにおいて統計学的な有意差を示した。*AHR*-intron 10 T/T (*rs2106728*)  $P=0.020$ , Odds Ratio=2.71,  $\chi^2=5.40$  (表 8)。

### 4. マイクロサテライトマーカー解析

さらに、*ESR1* 遺伝子のイントロン 5 に存在するマイクロサテライト繰り返し配列のタイピングを行った。このマイクロサテライトは、塩基配列 (AAAT) の繰り返し配列であり、日本人対象者集団 42 人と子宮内膜症患者 32 人におけるタイピングの結果、5 箇所の対立遺伝子が存在していた。このうち 1 箇所の対立遺伝子において統計学的な有意差を示した。*ESR1*-intron 5 MS-aaat [262]  $P=0.015$ , Odds Ratio=5.86,  $\chi^2=5.90$  (表 9)。 $[ ]$ 内は、PCR 産物の長さである。

### D. 考察

現在までのところ、内分泌かく乱化学物質が関与する疾患の遺伝的要因については不明な部分が多く、各疾患の発症および病態を捕らえるまでには至っていない。本研究は、このような疾患に関与する遺伝子を科学的根拠に基づき選定し、その遺伝的関与を詳細に解析するという点で独創的な研究であると考えられる。現在までに行われてきた疾患感受性遺伝子の解析は、その遺伝子の翻訳領域を中心とした解析が中心であった。これはそれまで、ヒトのゲノム情報の不完全さが原因であり、そのため大変低い対立遺伝子頻度を対象とした解析により実際にはその疾患に重要な遺伝子多型を見逃してしまう可能性があった。

しかしながら、現在ではヒトのゲノム情報を簡単迅速に入手することが可能となり、疾患感受性遺伝子の遺伝的解析においてもその遺伝子領域全体を高密度な遺伝的多型マーカーを

用いて網羅的に解析することが可能となった。このようなことから、高度な多型性を示す遺伝マーカーを高密度に設定し、疾患との感受性を解析することにより、より信頼性の高い解析結果と評価が可能であると予想される。本研究において、見出された高度な多型性を示す遺伝マーカーは本疾患との関係を詳細に解析するだけでなく、今後の疾患感受性遺伝子の遺伝的解析においても重要な知見をもたらすことは間違いないと期待される。

また、相関解析において統計学的有意差を示した各対立遺伝子については、その対立遺伝子自身あるいはその近傍に存在する多型が子宮内膜症に何らかの影響を与えている可能性が高いと考えられる。

今回、相関解析に用いた患者集団および対象者集団はそれぞれ43名、58名であり、昨年度に比べてその人数を増やしているが、さらに検体数を増加させることにより、比較的弱い遺伝的効果を検出できる可能性がある。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の多くは、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ている。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的要因を明らかにすることができる可能性がある。

このような高密度な遺伝的多型マーカーを用いるゲノム多様性研究のために、米国ではSNPs (Single nucleotide polymorphisms: 一塩基多型) の検出が盛んに行われている。SNPsはヒトゲノム中におよそ1000塩基に一つと期待される一塩基置換である。これらは、マイクロサテライトのような他のマーカーよりもゲノム中に豊富に存在しており、遺伝子内にも存在するという利点をもっている。このことから、遺伝子のコード領域および調節領域における全ての塩基置換をカタログ化しようとする試みが考えられた。これにより、疾患感受性に

影響を与える多型を包括することでき、さらに患者集団と健常者集団においてこれらの多型頻度を比べることによって疾患に影響を及ぼすような多型が患者集団において見出すことができるであろうと期待されていた。

しかしながら、原理的には大変単純のように見えるが、現実的にはいくつかの問題が生じることが報告された。これは、遺伝子のコード領域内に存在するSNPsであるcSNPs (coding SNP; コード SNP) を収集する直接法と呼ばれるものであるが、このアプローチは、タンパク質の構造を変えるようなSNPsのほとんどを取り逃している可能性があり、おそらくまだ疾患に直接的に影響を与えるSNPsが存在していることを指摘された。また、ほとんどのSNPsは、タンパク質産物に直接的に影響を与えるものではなく、ヒトゲノムの約95%と見積もられている非コード領域に含まれるかあるいは同義語的(静的)置換として作用していると予想した。そして、cSNPsが非同義語的置換であることはヒト遺伝子プールで大変まれであることが報告された。これは、タンパク質構造におけるいかなる変化に対しても強い選択が存在し、これらの変化のほとんどが進化の過程で取り除かれたと予想している。この2つの報告により、疾患に関与する非同義語的cSNPを見出すことは大変困難であり、これらを見出すためにはできる限り大きくさらにさまざまなサンプル集団が必要とされることが指摘された。先に述べた通り上記の方法は、疾患に直接的に関与する遺伝子のコード領域内および調節領域内の変異を収集することから、直接法と呼ばれているが、遺伝子のコード領域以外の、たとえば調節領域やイントロン多型などによる遺伝子機能に影響を与える遺伝的変異を見出すことは大変困難である。

これに対して、疾患感受性遺伝子座とその近傍の多型との間の連鎖不平衡により相関が示される間接法がある。この方法は、遺伝子のコード領域以外のSNPsすなわちgSNPs (genomic SNPs: ゲノムSNPs) を用いることによってすべての変異を包括する必要性を避けることができる。一見直接法に比べてかなり有用であるように思われるが、この間接法にも現在問題点が指摘されている。それは、疾患感受性変異を調べるうえで十分な遺伝的マーカー数がどの程度必要であるかということである。この答えは、人類集団における連鎖不平衡の程