

in women with recurrent spontaneous abortion. Hokkaido Igaku Zasshi 2004; 79: 237-241.

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; 51: 241-247.

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; 19(4): 1018-1024.

Morikawa M, Yamada H, Kato E.H, Shimada S, Yamada T, Minakami H. Embryo loss pattern is predominant in miscarriages with normal chromosome karyotype among women with repeated miscarriage. Hum Reprod 2004; 19: 2644-2647.

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, 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

森川 守, 山田秀人, 平山恵美, 片岡宙門, 島田

茂樹, 渡利道子, 山田 俊, 長 和俊, 森本裕二,  
水上尚典. 脊髄損傷合併妊娠の1例. 周産期医学  
(印刷中)

森川 守, 山田秀人, 山田 俊, 平山恵美, 島田  
茂樹, 片岡宙門, 長 和俊, 水上尚典. 胎児尿管  
遺残の1例. 周産期医学 (印刷中)

## 2. 学会発表

Yamada H, Shimada S, Morikawa M, Kato EH, Nishida R, Minakami H. Decrease in a specific killer cell immunoglobulin-like receptor on natural killer cells in the decidua of spontaneous abortion with normal chromosome karyotype. 9th International Congress of Reproductive Immunology. October 12-15, Hakone, 2004

山田秀人. 不育症における免疫学的異常と遺伝学的素因. 第7回阪神不妊治療懇話会 (特別講演) 9月16日, 尼崎, 2004

山田秀人, 敦賀律子, 平山恵美, 古田伊都子, 小橋 元, 渥美達也, 小池隆夫, 松浦栄治, 水上尚典. 抗リン脂質抗体と妊娠中毒症との関連. 第25回日本妊娠中毒症学会 (ワークショップ). 9月24-25日, 東京, 2004

山田秀人, 平山恵美, 島田茂樹, 森川 守, 櫻木範明, 佐田文宏, 岸 玲子, 水上尚典. 習慣流産の遺伝学的素因: GSTM1, CYP17, IL-6. 第56回日本産科婦人科学会, 4月10-13日, 東京, 2004

Yamada H, Kato EH, Morikawa M, Shimada S, Nishihira J, Minakami H: Decreased serum levels of macrophage migration inhibitory factor in miscarriages with normal chromosome karyotype. 第19回日本生殖免疫学会, 10月11-12日箱根, 2004

G. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

## 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxinの絨毛細胞における 糖取り込みに関する研究

分担研究者 遠藤 俊明 札幌医科大学 助教授  
共同研究者 斉藤 豪 札幌医科大学 教授  
林 卓宏 札幌医科大学 講師

### 研究要旨

妊娠絨毛細胞モデルとして絨毛癌株を用いてTCDD添加実験を行い、m-RNAおよび蛋白レベルでのglucose transport protein (GLUT)発現につき検討した。TCDD添加により、GLUT蛋白発現には影響を認めなかったものの、一時的ではあるがGLUT1 m-RNA発現は抑制された。これらの結果から、環境ホルモンの胎盤に対する糖輸送能の微妙な変化は、正常な胎児発育に影響を及ぼす可能性が示唆された。

### A. 研究目的

環境ホルモンの一種である

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin(TCDD)は、その摂取によりベトナム戦争軍人の統計から、2型糖尿病との関連が報告されている。また、血中のTCDDが高濃度の群では、糖尿病を発症しなかった場合でも高インスリン血症を示し、いわゆるTCDDによるインスリン抵抗性の存在が推測されている。

現在我々の生活においてもTCDDは日常的に食物から経口摂取されており、血中脂質TCDD濃度は2.5 pptときには10ppt を超える場合もあるとされている。10-15 pptを超えると、インスリン抵抗性の出現可能性が高まると報告されている。

胎盤は胎児の発育のために、母体から栄養分および酸素を運搬する重要な臓器であるが、特に母体糖分は胎児にとって重要な栄養源である。同時に、胎盤の機能を維持するためには大量の糖分を必要とすることから、胎盤は糖要求性の高い臓器であるといえる。マウスの実験では、TCDDを投与することによりグリコーゲンの生成が増加し胎盤の胎児への糖輸送能が低下、遅れてglucose transport protein(GLUT 3) m-RNAの発現が変化し、胎盤への糖取り込みも変化することにより胎盤の糖輸送能のかく乱を生じて、最終的に胎仔

の発育異常や子宮内死亡に至ると報告されている。従ってヒト妊婦の場合でも、日常的にTCDDの暴露を受けた場合に、胎盤の糖輸送能に変化を及ぼし、胎児の発育状況に悪影響を与える可能性が考えられる。

今回我々は、妊娠絨毛細胞モデルとして絨毛癌株を用いてTCDD添加実験を行い、m-RNAおよび蛋白レベルでのGLUT発現につき検討した。

### B. 研究方法

#### 1. 細胞培養法

絨毛癌細胞株 JAR, JEG-3を10% fetal bovine serum加RPMI1640にて培養。単離浮遊細胞を10cmディッシュに $1.0 \times 10^5$  cells 37°C、5%CO<sub>2</sub>インキュベータ内で2日間培養後、DMSOに溶解したTCDDを濃度10nM添加し培養0, 24, 48時間後の上清ならびに細胞を回収した。なお、コントロールとして同量のDMSOを加えた培養液で同様に添加・培養した。

#### 2. 上清β-hCG測定

培養細胞の分化程度を決定するため、β-hCG RIAキットを用いて得られた上清の濃度を測定した。

#### 3. RT-PCR

培養細胞をISOGENにて処置し、その溶解液か

らtotal RNAを採取。これら5 $\mu$ gRNAからDNase 1 による m-RNA 精製後、random oligodeoxynucleotide primersを用い一本鎖cDNAを作成しPCRを施行した。PCR条件は95 $^{\circ}$ C, 5 minの後、95 $^{\circ}$ C, 60 $^{\circ}$ C, 72 $^{\circ}$ Cそれぞれ30 secを35サイクルの後72 $^{\circ}$ C, 7 minとした。

今回用いたプライマーは

GLUT1: NM006516, left primer (1489-1509)

5'-TCACTGTGCTCCTGGTTCTG-3',

right primer (1721-1741)

5'-CCTGTGCTCCTGAGAGATCC-3',

product size 233bp, GLUT3: NM006931, left primer (1548-1568)

5'-ACCGGCTTCCTCATTACCTT-3', right primer (1706-1726)

5'-AGGCTCGATGCTGTTTCATCT-3', product size 159bpでhousekeeping遺伝子として $\beta$ アクチンを用いた。

#### 4. Western analysis

超音波破碎を行った細胞溶解から蛋白質を抽出し1xSDSサンプルバッファーに溶解した100 $\mu$ gを電気泳動、膜トランスファーの後GLUT1, 3各種抗体を作用させた。洗浄後、ペルオキシダーゼ結合2次抗体を作用し、 $\beta$ アクチンを基準にしNIH imageにて画像解析した。

### C. 研究結果

#### 1. 細胞増殖および $\beta$ hCG分泌量

JAR細胞株では、添加0時間後の細胞数と比較し、いずれの条件でも添加24時間後には約2.7倍、48時間後には約5倍の細胞増殖を認めた(図1)。JEG-3細胞株でも同様に、添加0時間後の細胞数と比較し、いずれの条件でも添加24時間後に約2倍、添加48時間後に約4倍の細胞増殖を認めた(図2)。以上よりJARおよびJEG-3細胞株どちらもTCDD添加による細胞数増加に対する変化は認めなかった。

次に、JAR細胞株の細胞数10<sup>5</sup>個あたりの $\beta$ hCG分泌量を検討したところTCDD 1nM添加24時間後でコントロールと比較し1.4倍、TCDD

10nM添加では1.6倍の分泌量増加を認めた。しかしながら48時間後では、いずれの濃度においてもコントロールと同様の分泌量となった(図3)。JEG-3細胞株ではいずれの濃度・添加時間でもコントロールと比較し変化はなかった(data not shown)。

#### 2. GLUT1および3 m-RNAの発現

JAR細胞株において、TCDD 1nMと10nM添加24時間後において、両者共にGLUT1 m-RNA発現抑制を観察したが、添加48時間後には両者ともにコントロールの発現と同等に復帰した(図4)。JEG-3細胞株では、TCDD添加による変化は認めなかった(data not shown)。GLUT3 m-RNA発現は両細胞株共に添加条件・時間に依存せず同様に発現が認められた(data not shown)。

#### 3. GLUT1および3蛋白の発現

GLUT1およびGLUT3蛋白の発現はどちらの細胞株、添加条件においてもほぼ同様発現が認められた(data not shown)。

### D. 考 察

TCDD添加による細胞増殖能の変化はJARおよびJEG-3両細胞株で認めなかったが、細胞あたりの $\beta$ hCG分泌量においてはJAR細胞株の添加24時間で増加を認めることから、TCDDは細胞増殖には影響がないものの細胞分化の面では一時的に分化促進に働く傾向のあることが示唆された。

GLUT1 m-RNA発現に関しては、JAR細胞株でTCDD添加24時間後に抑制が観察されたことより、TCDDによる糖輸送能の抑制作用が考えられた。しかしながら、TCDD添加48時間後にはGLUT1 m-RNAの発現はコントロールと同様に復帰していることより、その抑制は一時的であることが考えられた。また、GLUT3 m-RNA発現において、今回用いたTCDD濃度・作用時間では変化のないことから、TCDDのGLUTに対する作用はそのisoformにより違いのあることが考えられた。

一方で、GLUT1および3蛋白発現に変化が認められなかったことから、細胞全体としてのGLUT

蛋白発現量は変わらないと考えられた。しかしながら、細胞内GLUT蛋白量が同じであっても細胞膜GLUT蛋白局在が多い場合、機能的に糖輸送能が活発であると考えられる。従って、今後はGLUTの細胞膜局在の評価、すなわちGLUT translocationについての検討が必要であると思われる。

## E. 結 論

TCDD添加により、GLUT蛋白発現には影響を認めなかったものの、一時的ではあるがGLUT1 m-RNA発現は抑制された。これらの結果から、環境ホルモンの胎盤に対する糖輸送能の微妙な変化は、正常な胎児発育に影響を及ぼす可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

準備中

## H. 知的所有権の取得状況

なし

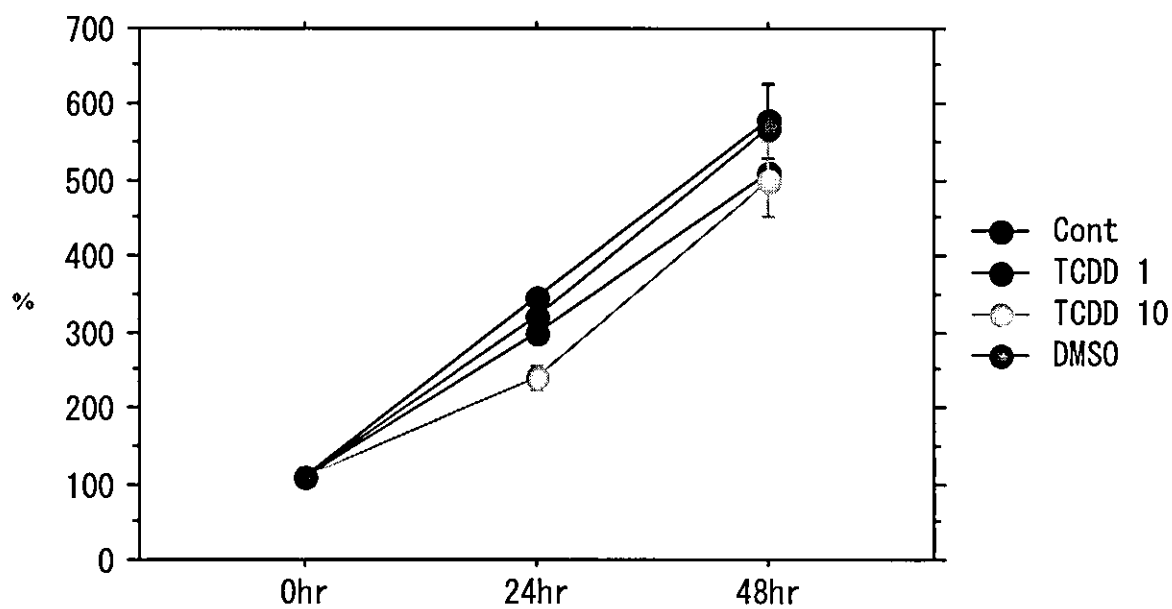


図1 JAR 細胞増殖曲線

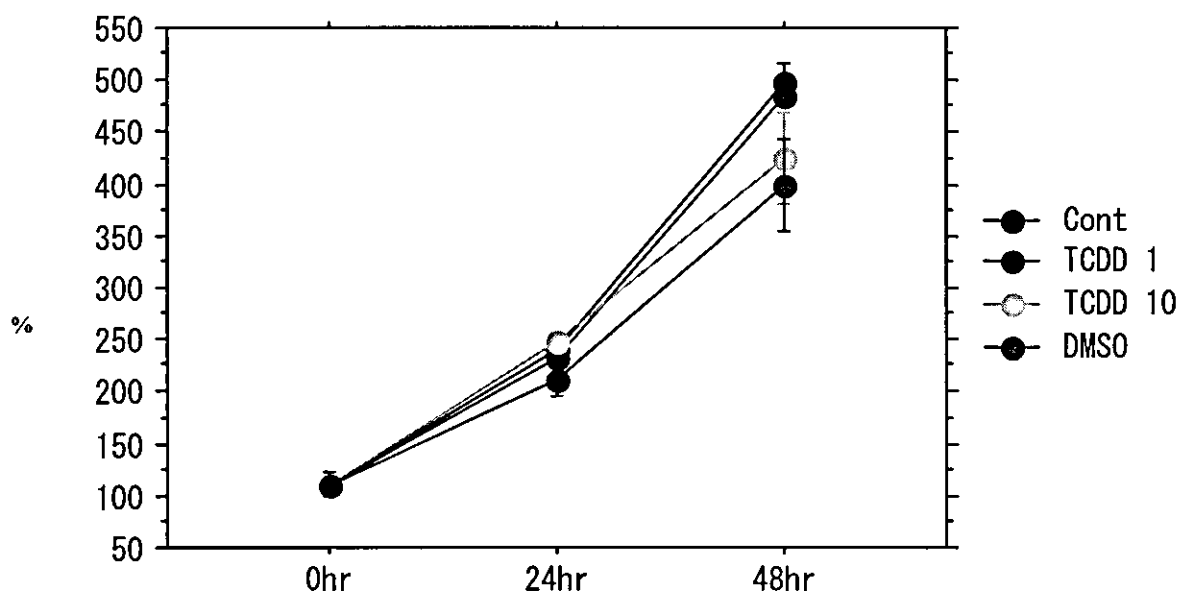


図2 JEG-3 細胞増殖曲線

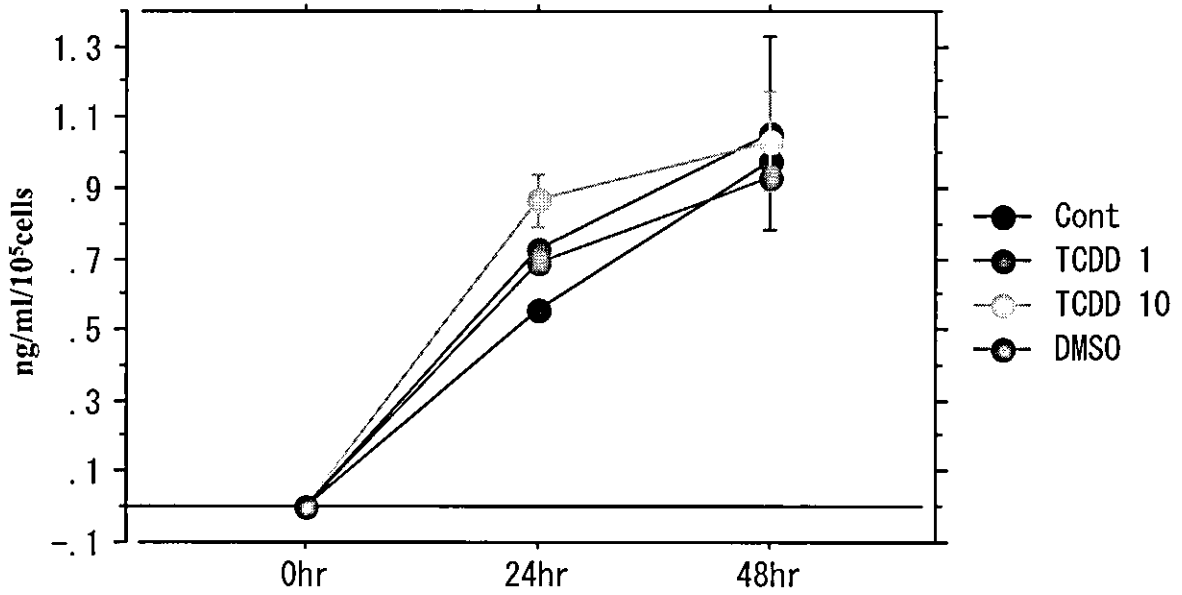


図3 JAR 10<sup>5</sup>細胞あたりの $\beta$ -hCG分泌量

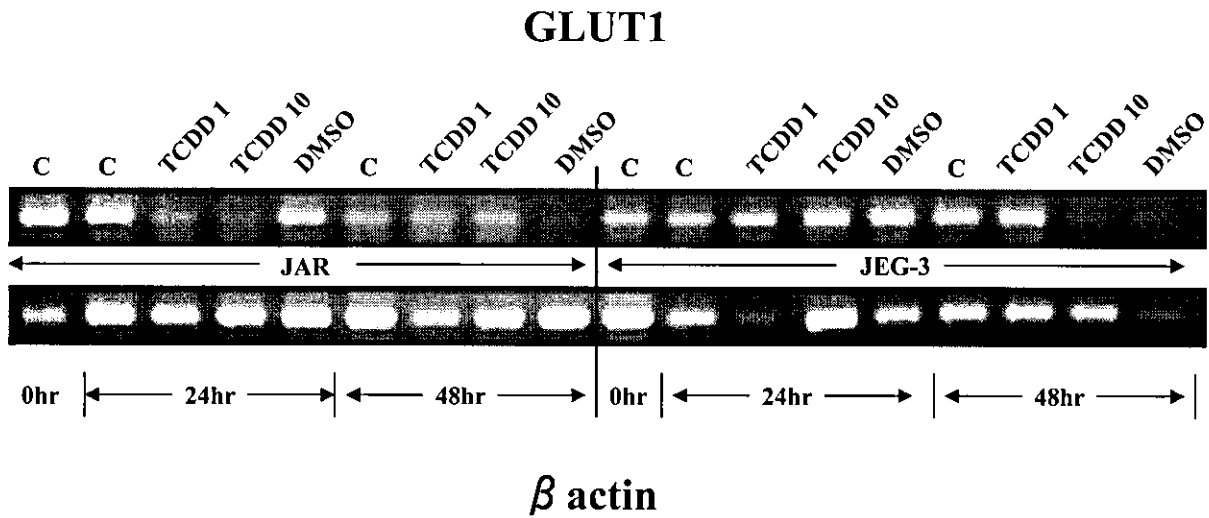


図4 TCDD添加JARおよびJEG-3細胞におけるGLUT1発現の経時的変化

## 精子形成に関与するヒト精巣特異的遺伝子の同定

分担研究者 石川 陸男 旭川医科大学医学部附属病院長

### 研究要旨

最近までの不妊治療のめざましい進歩により、女性不妊因子の治療成果は着実に進歩しているものの、男性不妊症に関しては現在でも不妊治療の大きな壁となっている。男性因子は遺伝的原因の他にも社会の高度化による現代人のストレス、また環境化学物質等が関与しているという報告もあり、今後ますます増加することが推測される。今回我々は精子形成に関与すると予想されるヒト精巣特異的遺伝子の同定を試みた。

### 【研究協力者】

宮本 敏伸 旭川医科大学産婦人科助手  
田熊 直之 旭川医科大学附属病院助教授  
佐々木禎仁 旭川医科大学産婦人科医員

### A. 研究目的

最近、マウスおよびラットにおいて精巣特異的に発現する遺伝子が数多く同定されており、2002年のEMBO reportの報告に、マウスにおいて精巣特異的に発現するとされる80個におよぶTISP遺伝子が発表された。しかしながら現在のところヒトにおいてはまだそれほど多くの精巣特異的遺伝子は同定されていない。今回我々は本研究によってヒト精巣特異的遺伝子の同定を試みた。

### B. 研究方法

マウスの80個のTISP遺伝子の中からGenBankよりヒトと相同性の高い配列を検索した。指摘された相同部位にプライマーを設定し、ヒト組織（15臓器）のcDNAライブラリーを鋳型としてPCRを行い、精巣特異的なcDNAの同定を試みた。精巣特異的とされた遺伝子に関して3'RACE、5'RACEを行いfull lengthの解析を行った。またアミノ酸レベルにおいてマウスとの相同性の比較を行なった。

（倫理面への配慮）

本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針を遵守し、全てのサンプルは匿名化（ナ

ンバー化）され、個人が特定できないようにデータファイルされた。

### C. 研究結果

80個のマウスTISP遺伝子からヒトと相同性の高い28個のヒトTISP 遺伝子について解析を行った。3個のみ精巣優位に発現し、5個については精巣自体にも発現がみられず、残りは精巣も含め他臓器で発現をみるものが多かった。今回、精巣特異的とされたTISP15, 43, 50の3個についてcDNAを解析し、TISP50についてはfull lengthを同定し、またアミノ酸レベルにおいてマウスとの相同性も83%と高かった。TISP15, 43についてはpartialながら同定した。

### D. 考 察

本研究によりヒトとマウスの間でTISP遺伝子の発現パターンには、かなりの差異があることが示された。報告の中で述べられている遺伝子のうちヒトでは一部のみ精巣特異的であることが示唆された。今回、ヒト精巣特異的とされたTISP15, 43, 50の3遺伝子は、その発現パターンとアミノ酸配列より精子形成への関与が予想された。

### E. 結 論

今後は実際の乏精子症や無精子症の症例において発現パターンの解析を行い、さらに環境化学物質等が精子形成不全に遺伝子レベルで関与するか

否かを検討する。

#### F. 健康危険情報

特記なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Sasaki Y, Miyamoto T, Sengoku K, Hayashi H, Takuma N, Ishikawa M. The human transcript induced in spermatogenesis 50. ; Reproductive Medicine and Biology 2004; 3: 237-243.

##### 2. 学会発表

[ヒト精子特異的遺伝子であるTISP 50, TISP 15, TISP 43についての解析]

9月10日～11日 第52回北日本産科婦人科学会  
(札幌)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし。



## cytochrome P450など異物代謝酵素遺伝子の多形解析と毒性評価

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

シトクロムP450 (P450、CYP) は広範な生物種に存在し、生理活性物質の生合成や、医薬品・環境汚染物質などの代謝排泄に関与する、生体のホメオスタシス維持の為に重要な酵素である。

CYP遺伝多型による異物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、様々なCYP分子種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作成した。

本研究では、ピオチンラベルしたprimerを用いてPCR productを生成した後、それらをガラスプレート上に貼り付けたオリゴDNAにハイブリダイゼーションし、アビジン-HRP (horseradish peroxidase) によってTMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) を発色させる方法をとった。血液あるいは毛髪ゲノムのサンプルを用いて解析を行い、今回作製したP450Chipの利点・改善点について考察した。

### 【研究協力者】

石塚真由美 北海道大学大学院獣医学研究科  
助教授

### 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。CYP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。

ヒトのゲノム情報29億塩基対の中には300万を超えるSNP (single nucleotide polymorphism) が存在し、これらが遺伝病のみならず、医薬品や環境化学物質の感受性、生活習慣病の発症率、副作用リスクを決定していると考えられている。このSNP、特にP450を中心とした薬物代謝関係のSNPを考慮したオーダーメイド（テーラーメイド）薬物療法は近年製薬会社を中心に注目を集めてきた。国内ではゲノムプロジェクトの次世代プ

ロジェクトとして、「オーダーメイド医療実現プロジェクト」が進行しており、SNPs解析のために「30万人計画」のサンプリングが行われている。internationalではゲノム/ハプロタイプをマッピングする「HapMap計画」が進行している。

昨年12月に、米国FDA (Food and Drug Administration;食品医薬品局) はロシュが販売するヒトCYP2D6、CYP2C19のSNPsを同定するマイクロアレイ「アンプリチップCYP450」を臨床診断薬として認可した。研究向けにはアマシャムがP450のSNP検出の為にマイクロアレイ (CodeLink) を販売している。ロシュとAffymetrix社によるアンプリチップCYP450は29アレルのCYP2D6、2アレルのCYP2C19を搭載しており、臨床医薬品の25%の代謝と、世界人口の99%のgenotypeをカバーすると言われている。

しかし、実際には、環境化学物質や薬物感受性を決定付ける遺伝子要素の数はあまりに膨大である。P450はもちろん、GST (グルタチオン抱合酵素) やUGT (グルクロン酸抱合酵素)、硫酸抱合酵素などの数々の第2相抱合酵素群、MDR (P糖タンパク) をはじめとする種々のトランスポータ

一、それらの発現を調節する転写因子群、そして転写因子の結合サイト等々、薬物代謝に関与する遺伝子群の多型は、膨大な数に上っている。実際、これまでに日本人で既に4000以上の薬物代謝関連遺伝子のSNPsが報告されている。アンプリチップCYP450のような既存のマイクロアレイ遺伝子解析ツールでは、「薬物動態」の多型をカバーできず、他の遺伝子解析ツールと同様に、単なる1-2遺伝子のSNPアレル解析しか行えない。

一方、Affimetrix社が網羅的解析用に販売するSNP chipはHuman Genomeのマッピングを可能にしており、SNPコンソーシアムのデータベース上の11500個のSNPの解析を可能にしている。しかし、このchipの目的はあくまでマッピングであり、実際に特定のSNP解析を行うことはできず、高額なスキャナーを必要とするほか、chip1枚6万円と高価格で、実際の臨床の場で使用することは難しい。

そこで、本研究では、P450を始めとする薬物代謝酵素群とその制御機構に存在する遺伝多形について、安価かつ簡便な新規SNPs解析方法の開発を試みた。

## B. 研究方法

SNP解析のためには、現在ゲノムプロジェクトにも用いられているInvader法(CFLP: Cleavase Fragment Length Polymorphismの応用)の他、LC-MSやシーケンス解析、電気的にSNPsを検出するElectrochemical DNA array (ECA chip)、SSCP (single-strand conformational polymorphism)、DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)、TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis)、Restriction fragment length polymorphism (RFLP)、Taqman assay、Protein truncation test (PTT)、Ribonuclease S1 nuclease、MutYやMutSを用いた方法、ALBUM (Aldehyde-Linker-Based-Ultrasensitive-Mismatch Scanning)法などが行われている。開発中の方法としては、アフィニティーキャピラリー電気泳動マイクロチップや金コ

ロイドなどナノ粒子の凝集を用いた方法が挙げられる。また、既に、一昨年よりイムノクロマトグラフィーを利用したSNPs解析方法も開発された。

我々は、膨大な遺伝情報が必要なSNP解析には、一度に多くの情報を得ることを特徴とするマイクロアレイ法が最も適していると考えた。ビオチンラベル化したPCR productをアビジン-HRP (horseradish peroxidase) で検出することで、サーマルサイクラー以外の特殊な機械を必要とせず、TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) 発色によって変異アレルを検出することを目的とした。また、マイクロアレイ法の利点である「一度に多数」の遺伝子について調べることができる。Multiplex法を用いたPCRの簡略化によって、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、我々は、試験版としてP450を中心とした薬物代謝関連遺伝子のSNPグラスアレイを開発した。膨大なSNPの中でも、(1) cSNP (coding SNP) やrSNP (regulatory SNP) のようにfunctionに実際に関わっているSNPであること、

(2) 日本人に多い多型であること、(3) 特に変異原物質などを代謝する酵素群に焦点を絞ること、を条件に薬物代謝酵素関連遺伝子のアレルから数十種の遺伝子の選定を行った。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 (Nアセチルトランスフェラーゼ)、AhR (arylhydrocarbon receptor)、PPAR (peroxisome proliferators activated receptors) の11遺伝子、の32アレルをリストアップした。

### (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

に立つ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

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ことがわかった。また、CYP2D6 deletion、GST nullなどのdeletion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。そこで、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ガラスにスポッティングし、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、混合してスライドガラス上のオリゴ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。変異検出には、ゲノムPCR産物のハイブリ後の発色で、スキャナーなどの光学機器を必要とせず、目視判定が可能であった。

ヒト血液20-50ulより各々genomeDNAを抽出し、SNPsを検出することができた。約50名のgenomeを用いて再現性や検出感度を確認したところ、CYP1B1\*3、CYP2C19\*3、GSTP1、AhRについては、確実な多型の検出が可能であった。CYP1A2、NAT2は非常に弱いシグナルが得られた。CYP2D6、PPAR、CYP2A6については、安定した結果が得られなかった。

さらに、血液よりも非侵襲的なサンプルである毛髪や眉毛、爪からのゲノム抽出を行ったところ、それらのPCR産物がchipを用いた遺伝多型の判

定に利用できる可能性が考えられた。DNAの増幅は1本の毛髪あるいは眉毛でも十分可能であった。

### D. 考 察

現在、人薬物代謝関連遺伝子のSNPsは日本人で4000ほど報告されている。これらを簡便な方法で全て検出することは難しく、また肉眼判定可能なツールでは少数の遺伝子アレルに関する解析に限定される。従って、今後、chipによるSNPs解析ツールは、high densityとlow densityの二極化が必要であると考えられる。

今回、ピオチンラベルしたPCR産物のアレイ上オリゴへのハイブリダイゼーションによってSNPsを検出する方法をとった。しかし、一塩基の違いではハイブリダイゼーションの効率を変えることは難しいとも言われており、本研究でも、疑陽性のスポットが検出された。従って、今後は、chip上でのDNA extension法を利用するなど、よりSNPs配列に特異性の高い方法の開発が必要と思われる。

現在、国内SNPs解析のmajorな手法となっているInvader法をchip上で行う方法が理化学研究所を中心に開発されつつある。また、chip法の中でmajorになりつつあるのはArrayed primer extension(APEX)法である。この方法では、chip上のオリゴDNAprimerにハイブリしたDNAサンプルの1塩基extensionを検出するため、蛍光や発光など感度の高い検出方法が要求される。このため、ポリメラーゼによる伸長反応で生成されるピロリン酸をATPに変換し、luciferaseを用いることで、ルシフェリンなどの高感度検出を実現しているが、スキャンには特殊な機器が必要である。一方、on chipで数塩基をextensionさせるSifted termination assay (STA)法に、今回用いた検出方法であるHRP発色法を組み合わせることで、APEX法よりも感受性を高め、特殊なスキャナー機器を必要としない方法が開発可能であると考えられた。

また、今回の結果から、血液採取よりもより非侵襲的で安全なサンプルである毛髪を用いたchip

による判定方法も可能であると考えられた。

## E. 結 論

ヒトCYPのSNPs解析において、マイクロアレイ解析法は、従来の方法よりも簡便に遺伝多形の検出を行うことができた。しかし、より特異性を高めるために、on chipの塩基のextensionなど、今後新たな方法との組み合わせが必要である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Muzandu, K., Shaban, Z., Ishizuka, M., Kazusaka, A., Fujita, S. Possible involvement of peroxyne in estrogen-induced oxidative stress. *Free Radical Research*. (In press)

Shaban, Z., Soliman, M., El-shazly, S., El-bohi, K., Abdelazeez, A., Kehelo, K., Kim, H., Muzandu, K., Ishizuka, M., Kazusaka, A., Fujita, S. AhR and PPAR $\alpha$  Antagonistic effects on CYP2B and CYP3A and additive inhibitory effects on CYP2C11. *Xenobiotica*. (In press)

Nikaidou, S., Ishizuka, M., Maeda, Y., Hara, T., Kazusaka, A., Fujita, S. Effect of components of green tea extracts, caffeine and catechins on hepatic drug metabolizing enzyme activities and mutagenic transformation of carcinogens. *J Vet Med Sci*. (In press)

Shaban, Z., El-Shazly, S., Abdelhady, S., Fattouh, I., Muzandu, K., Ishizuka, M., Kimura, K., Kazusaka, A., Fujita, S. Down regulation of hepatic PPAR $\alpha$  function by AhR ligand. *J Vet Med Sci*. 66(11):1377-86 (2004)

Sakamoto, K.Q., Ishizuka, M., Kazusaka, A., Fujita, S. Iodine intake as a possible cause of discontinuous decline in sperm counts: a

re-evaluation of historical and geographic variation in semen quality. *Jpn J Vet Res*. 52(2):85-94. (2004).

Kim HS, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Alterations of activities of cytosolic phospholipase A2 and arachidonic acid-metabolizing enzymes in di-(2-ethylhexyl)phthalate-induced testicular atrophy. *J Vet Med Sci*. 66(9):1119-24 (2004).

Saito K, Sakai N, Kim HS, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Strain differences in diazepam metabolism at its three metabolic sites in sprague-dawley, brown norway, dark agouti, and wistar strain rats. *Drug Metab Dispos*. 32(9):959-65 (2004).

Shaban Z, El-Shazly S, Ishizuka M, Kimura K, Kazusaka A, Fujita S. PPAR $\alpha$ -dependent modulation of hepatic CYP1A by clofibrate in rats. *Arch Toxicol*. 78(9):496-507 (2004).

Saito K, Kim HS, Sakai N, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Polymorphism in diazepam metabolism in Wistar rats. *J Pharm Sci*. 93(5):1271-8 (2004)

### 2. 学会発表

Shaban, Z, El-Shazly, S, 石塚真由美, 数坂昭夫, 藤田正一, Ah受容体リガンドによるPPAR $\alpha$ 機能の抑制, 環境ホルモン学会(2004)

石塚真由美, 高菅卓三, 谷川力, 数坂昭夫, 藤田正一, 野生ドブネズミに蓄積する環境汚染物質と生体影響のgenomics解析, 環境ホルモン学会(2004)

藤田正一, 石塚真由美, 高菅卓三, 谷川力, 千葉一成, 佐治尚介, 坂本健太郎, 数坂昭夫, 日本の野生生物における内分泌攪乱と環境汚染, 環境ホルモン学会(2004)

K.M. Muzandu, M. Ishizuka, A. Kazusaka and S. Fujita. POSSIBLE INVOLVEMENT OF PEROXYNITRITE IN ESTROGEN-INDUCED OXIDATIVE STRESS AND PROTECTIVE ROLE OF CAROTENOIDS. 10th International Congress of Toxicology (2004, Finland)

H-S. Kim, M. Ishizuka, A. Kazusaka and S. Fujita. DI-(2-ETHYLHEXYL) PHTHALATE SUPPRESSES TAMOXIFEN-INDUCED APOPTOSIS IN PITUITARY GH3 CELLS. 10th International Congress of Toxicology (2004, Finland)

M. Ishizuka, T. Takasuga, T. Tanikwa, S. Fujita. SUPPRESSION OF TESTOSTERONE SYNTHESIS IN TESTES OF WILD NORWAY RATS IN JAPAN: ACCUMULATION OF PERSISTENT ORGANOCHLORINE POLLUTANTS AND POLYBROMINATED DIPHENYL ETHER AND THEIR EFFECT. 10th International Congress of Toxicology (2004, Finland)

## オンライン固相抽出ー液体クロマトグラフ／タンデム質量分析計を利用した ヒト血液中有機フッ素系化合物の一斉分析法の開発

主任研究者 岸 玲子 北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野  
分担研究者 中澤 裕之 星薬科大学薬品分析化学教室  
研究協力者 斉藤 貢一、井之上浩一、  
伊藤 里恵、岡田 文雄、仲田 尚生 星薬科大学薬品分析化学教室

### 研究要旨

有機フッ素系化合物は、生体内における蓄積性が高く、また内分泌かく乱化学物質(ED)として疑われている。前向きコホート研究に伴う先天性異常モニタリングとして、有機フッ素系化合物に注目し、分析法の構築、ヒト血液の測定を中心に研究を行ってきたが、昨年度までにLC/MSを用いた有機フッ素系化合物の分析法の開発及び胎児暴露に関する調査を行ってきた。大規模な疫学研究へ応用するには、より迅速で高精度な分析法が要求されている。そこで、本年度は測定装置にLC/MS/MSを用い、迅速かつ高感度・高精度な有機フッ素系化合物の分析法の開発を行った。分析法に関しては、前年度と同様にオンライン固相抽出法を採用し、ヒト血漿中PFOS, PFOSA, PFOA, PFNA, PFDAを対象とした。本法を用いて検量線を作成したところ、0.5～100ppbの範囲で良好な直線性(相関係数； $r=0.999$ )が得られた。ヒト血漿試料を用いた添加回収試験においては、回収率93%以上( $RSD<8.9$ ,  $n=6$ )と良好な結果が得られた。本法を用いて母体血207検体を分析した結果、PFOS及びPFOAがそれぞれ100%、88%と高い頻度で検出された。

本法は、有機フッ素系化合物5種類を15分以内と短時間で分離・定量が可能となり、大規模スクリーニングを視野においた疫学的解析評価に展開できるものと期待される。

### A. 研究目的

有機フッ素系化合物であるPFOS類は、繊維類の撥水剤、界面活性剤、消火剤、潤滑油、テフロン加工製品など我々の生活環境中において様々な用途で用いられているが、使用実態が具体的に明らかにされていない化合物である。この一連の有機フッ素系化合物は、残留性有害化学物質(POPs)として、法的に指定されていないが、その性質(難分解性や生体残留性等)もPCBやDDT等と類似し、また近年の研究論文等で実験動物に対する甲状腺ホルモンのかく乱作用、神経系への影響、また催奇形性などの毒性が報告されている<sup>1,2)</sup>ことから生体への影響が懸念されている。有機フッ素系化合物の国内におけるモニタリング報告としては、環境モニタリングが僅かに実施されているが、ヒトでの汚染状況や生体影響を検討している研究は

皆無である<sup>3)</sup>。

そこで本研究では、前向きコホート研究に伴う先天性異常と環境汚染物質(有機フッ素系化合物)との関連性を調査するため、ヒト血液試料中の有機フッ素系化合物の分析法を開発した。昨年度までに、オンライン固相抽出ーLC/MS法を用いて血液試料中の有機フッ素系化合物の分析法の開発及び母体血、臍帯血のペア検体の測定を行った。しかし、今後、前向きコホート研究に伴う先天性異常と有機フッ素系化合物との関連性について大規模スクリーニングに伴う疫学的解析評価を行うためには、より精度の高い分析手法が要求されている。

そこで、本年度は、上記の目標を達成するために、測定装置にLC/MSより精度の高いLC/MS/MSを採用し、試料前処理には前年度と同様に多検体

処理能を有するオンライン固相抽出法を導入し、迅速かつ高感度・高精度な有機フッ素系化合物の一斉分析法を開発した。

## B. 研究方法

### B. 1. 試薬

PFOS (Perfluorooctane sulfonate) : 和光純薬工業社製

PFOSA (Perfluorooctane sulfonamide) : ABCR GmbH & Co.KG社製

PFOA ( Perfluorooctanoic acid ) , PFNA (Perfluorononanoic acid) : Fluka写真

PFDA (Perfluorodecanoic acid) : Lancaster社製 Internal Standard(IS) PFHpA (Perfluoroheptanoic acid) : Aldrich社製

アセトニトリル : 和光純薬工業社製 HPLC用及び残留農薬用300

メタノール : 和光純薬工業社製 HPLC用

酢酸アンモニウム : 和光純薬工業社製 特級

精製水 : Millipore社製 EDS Polisher付 Milli-Q gradient A10で精製

### B. 2. オンライン固相抽出-LC/MS/MS法の測定概要

測定試料の調製法は、血液試料（血漿・血清）に内標準物質を含むアセトニトリル溶液を加えて除タンパク操作を行い、遠心分離(3000 rpm 10 min)した後、上清をメンブランフィルターに通した。抽出・精製・濃縮は、前年度と同様にオンライン固相抽出用カートリッジを用いて行い、カラムスイッチングにより、分析対象物質をLC分離部及び検出部 (MS/MS) に導入する。検出には、エレクトロスプレーイオン化法(ESI)のネガティブモードを採用した。

#### 測定試料の調製法

-80℃で凍結保存してある血液試料を常温で解凍し、転倒混和を行った後、ピペッターで正確に100 μl を量り取り、アシストチューブ (2 ml) に移す。同様に内標準物質(PFHpA)を添加したアセトニトリル溶液を200 μl 量り取り、ゆっくりと添加する。溶液をよく混ぜ、タンパク質

を十分変性させた後、遠心分離 (3000 rpm, 10分) で除タンパク操作を行う。遠心後の上清をパスツールピペットで取り、0.20 μmのメンブランフィルターを通したものを測定試料とする。

#### 標準試料の調製法

各標準品をアセトニトリルに溶解させ、1.0 mg/mlの溶液を調製し、0.5~100 μg/mlの範囲で標準溶液を水で適宜希釈して測定用試料を調製した。

#### 測定条件

MS/MS装置 : Waters社製Quattro micro APIシステム

LC装置 : Waters社製アライアンス

HPLC2795システム

#### LC条件

- 分析用カラム : GLサイエンス社製 Inertsil ODS-3 (2.1×50 mm, 5 μm)
- 前処理用カラム : OASIS HLB (2.1×20 mm, 25 μm)
- 移動相 : アセトニトリル+1.0 mM酢酸アンモニウム/1.0 mM酢酸アンモニウム溶液 (45 : 55 → 85 : 15 v/v , 5-12分)
- 流速 : 0.2 ml/min
- 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> (50 L/min, 350 °C)
- キャピラリー電圧 : 0.6 V
- モニタリングイオン (m/z) : 499→80 (PFOS), 498→78 (PFOSA), 369→169 (PFOA), 419→169(PFNA), 469 → 169 (PFDA), 319 → 169(PFHpA)

#### 【カラムスイッチングのプログラム】

| min |   |      |     |
|-----|---|------|-----|
| 0   | - | 5    | 洗 浄 |
| 5   | - | 10   | 負 荷 |
| 10  | - | 14.5 | 測 定 |

## C. 研究結果

### C. 1. オンライン固相抽出-LC/MS/MS法による 分析条件の検討

図1に分析対象物質のマススペクトルを示す。この結果より、MRMモニタリングイオンは、 $(m/z)$ ：499→80 (PFOS), 498→78 (PFOSA), 369→169 (PFOA), 419→169(PFNA), 469→169 (PFDA), 319→169(PFHpA)とした。また、移動相については、酢酸アンモニウムの添加濃度の影響（図2）及びキャピラリー電圧ピーク強度に及ぼす影響を検討し（図3）、最適分析条件を設定した。オンライン固相抽出法においては、オンライン固相抽出カートリッジから測定対象物質が溶出された際、保持時間を一定にするため、移動相に50mM酢酸・酢酸アンモニウム緩衝液(pH=4.7)を用い、有機溶媒(メタノール)との混合比率の検討をした(図4)。また、血漿試料に標準溶液を添加後、その回収率を求めた結果、93%以上(RSD<8.9%, n=6)と良好な結果が得られた(表1)。また、添加回収実験におけるクロマトグラムを図5に示す。

### C. 2. 母体血(血清)における分析結果

本分析法を母体血207検体の分析に応用した。有機フッ素系化合物5種類を測定した結果を表2に示す。母体血より、PFOS及びPFOAが高頻度で検出された。それぞれの化合物の検出率は、100%(PFOS), 88%(PFOA)であり、検出された濃度範囲は2.8～16.2ppb(PFOS), N.D～4.8ppb(PFOA)であった。

## D. 結論

本法は、除タンパク操作のみで迅速に測定ができるオンライン固相抽出法と、対象物質の質量数及びプロダクトイオンの質量数に合わせてモニタリングができるタンデム質量分析計を用いた非常に精度の高い分析法である。本法を用い、有機フッ素系化合物5種類に応用した結果、全ての測定対象物質において0.5～100ppbの範囲で良好な直線性(相関係数 $r=0.999$ 以上)を有する検量線を作成した。また、ヒト血漿試料を用いた添加回収試験においても回収率93%以上と良好な結果が得

られたため、迅速かつ高感度・高精度な分析法が開発できた。本分析法を母体血207検体の分析へ応用した結果、母体血より高頻度でPFOS及びPFOAが検出された。

ヒト血液試料中の高精度かつ高感度な分析手法の構築が達成でき、今後大規模スクリーニングに伴う疫学的解析評価への応用が期待される。

## E. 参考文献

- 1) Thibodeaux JR, Hanson RG, Rogers JM, Grey BE, Barbee BD, Richards JH, Butenhoff JL, Stevenson LA, Lau C.: Exposure to perfluorooctane sulfonate during pregnancy in rat and mouse. I: maternal and prenatal evaluations. *Toxicol Sci* 74, 369-381 (2003)
- 2) Lau C, Thibodeaux JR, Hanson RG, Rogers JM, Grey BE, Stanton ME, Butenhoff JL, Stevenson LA.: Exposure to perfluorooctane sulfonate during pregnancy in rat and mouse. II: postnatal evaluation. *Toxicol Sci* 74, 382-392 (2003)
- 3) Taniyasu S, Kannan K, Horii Y, Hanari N, Yamashita N: A survey of perfluorooctane sulfonate and related perfluorinated organic compounds in water, fish, birds, and humans from Japan. *Environ Sci Technol* 37, 2634-2639 (2003)

## F. 発表

学会発表

第125回薬学会（東京：2005年3月）

「日本人における有機フッ素系化合物の暴露状況」岡田文雄, 中田彩子, 井之上浩一, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 花岡知之, 小林実夏, 月野浩昌, 津金昌一郎, 中澤裕之

第14回環境ホルモン学会講演会

（東京：2005年1月）

「生体試料中の有機フッ素系化合物の分析と残留」中澤裕之



第124回薬学会（大阪：2004年3月）

「ヒト母体血及び臍帯血における有機フッ素系化合物の胎児移行性評価」岡田文雄，井之上浩一，伊藤里恵，加藤静恵，佐々木成子，中島そのみ，鶴野安希子，西條泰明，佐田文宏，岸 玲子，中澤裕之

発表論文

- 1) INOUE, K., OKADA, F., ITO, R., KAWAGUCHI, M., OKANOUCI, N. AND NAKAZAWA, H.: Determination of perfluorooctane sulfonate, perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonylamide in human plasma by column-switching liquid chromatography - electrospray mass spectrometry coupled with solid phase extraction. *J. Chromatogr. B*, 810, 49-56 (2004)
- 2) INOUE, K., OKADA, F., ITO, R., KATO, S., SASAKI, S., NAKAJIMA, S., UNO, A., SAIJO, Y., SATA, F., YOSHIMURA, Y., KISHI, R. AND NAKAZAWA, H.: Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) and Related Perfluorinated Compounds in Human Maternal and Cord Blood Samples: Assessment of PFOS Exposure in Susceptible Population during Pregnancy. *Environ. Health Perspect.*, 112, 1204-1207 (2004)

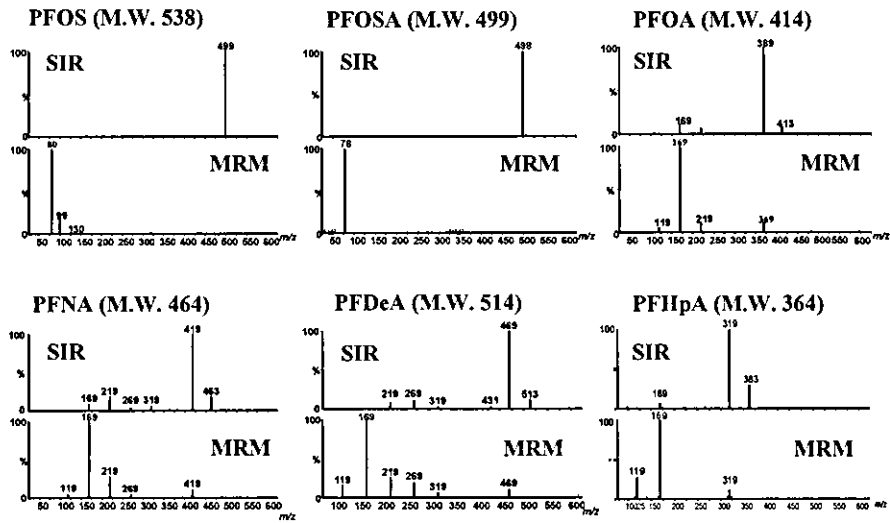


図1 測定対象とした有機フッ素系化合物のマススペクトル

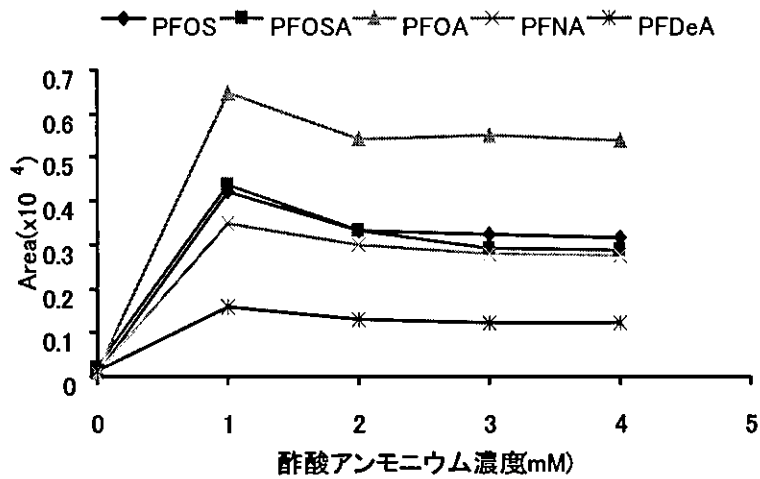


図2 酢酸アンモニウム添加濃度のピーク強度への影響

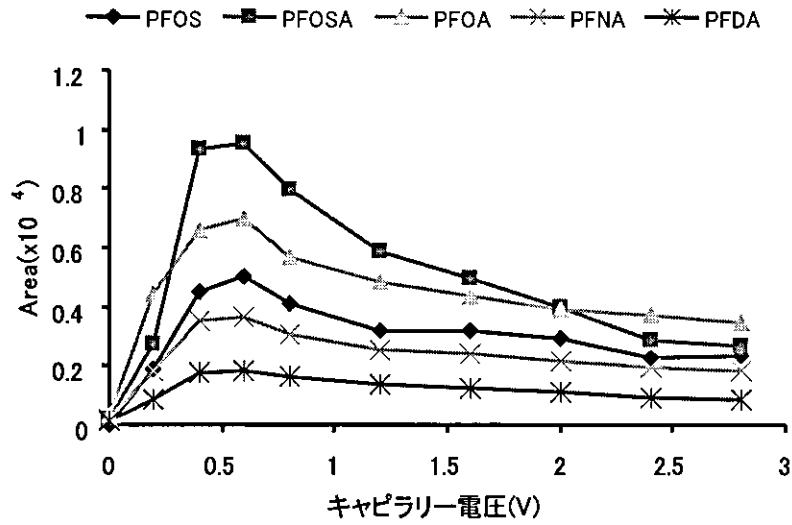


図3 キャピラリー電圧のピーク強度に及ぼす影響

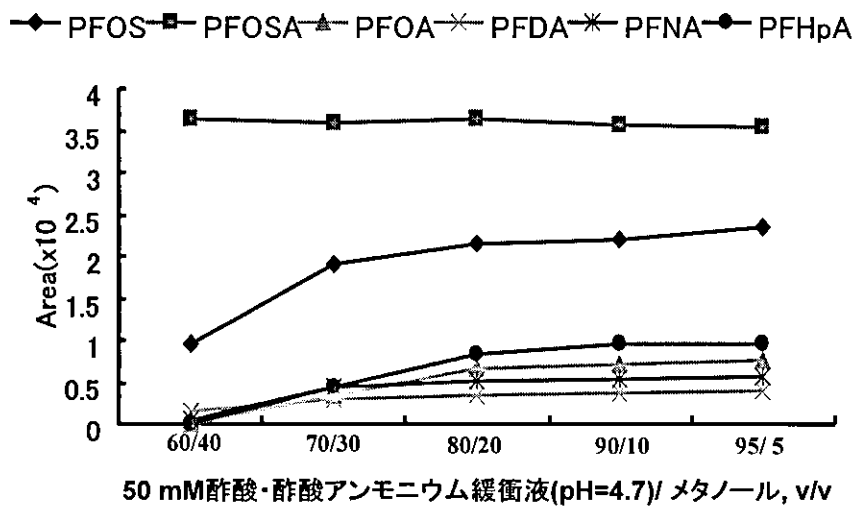


図4 洗浄溶液の検討

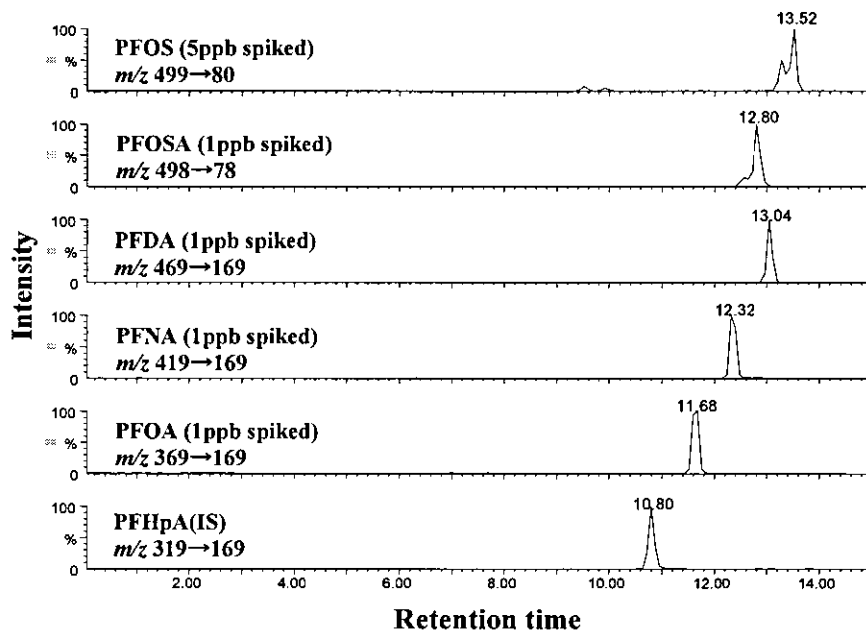


図5 添加回収試験におけるMRMクロマトグラム

表1 添加回収試験の結果

| Compound | Spike amount<br>(ppb: plasma sample) | Recovery<br>average(%) | RSD(n=6)<br>(%) |
|----------|--------------------------------------|------------------------|-----------------|
| PFOS     | 5                                    | 99.3                   | 3               |
|          | 50                                   | 97.5                   | 6.3             |
| PFOSA    | 1                                    | 98.3                   | 4.2             |
|          | 10                                   | 105                    | 4.2             |
| PFOA     | 1                                    | 100                    | 8.9             |
|          | 10                                   | 97.3                   | 4.8             |
| PFNA     | 1                                    | 96.7                   | 8.4             |
|          | 10                                   | 94.7                   | 3.1             |
| PFDA     | 1                                    | 93.3                   | 8.7             |
|          | 10                                   | 102                    | 4.7             |

表2 母体血(血清)の測定結果

|       | n       | 検出濃度範囲(ppb) | 検出率(%) |
|-------|---------|-------------|--------|
| PFOS  | 207/207 | 2.8~16.2    | 100    |
| PFOSA | 8/207   | N.D~0.7     | 3.9    |
| PFOA  | 182/207 | N.D~4.8     | 88.0   |
| PFNA  | 87/207  | N.D~2.0     | 42.0   |
| PFDA  | 25/207  | N.D~1.6     | 12.0   |

N.D< 0.5 ppb