

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

前向きコホート研究による先天異常モニタリング、
特に尿道下裂、停留精巣のリスク要因と
内分泌かく乱物質に対する感受性の解明

平成14年度～16年度 総合研究報告書

主任研究者

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

岸 玲子

分担研究者

北海道大学大学院医学研究科生殖・発達医学講座産科・生殖医学分野
札幌医科大学産婦人科学講座

水上 尚典

工藤 隆一

遠藤 俊明

旭川医科大学産婦人科学講座

石川 陸男

北海道大学大学院医学研究科生殖・発達医学講座婦人科学分野

櫻木 範明

北海道大学大学院医学研究科外科治療学講座腎泌尿器外科学分野

小柳 知彦

野々村 克也

北海道大学大学院獣医学研究科環境獣医科学講座毒性学分野

藤田 正一

星薬科大学薬品分析化学講座

中澤 裕之

福岡県保健環境研究所

飯田 隆雄

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

佐田 文宏

平成17 (2005) 年 3 月

目 次

I はじめに	1
II 総括研究報告書	
前向きコホート研究による先天異常モニタリング、特に尿道下裂、停留精巣のリスク要因と 内分泌かく乱物質に対する感受性の解明 (岸 玲子ほか)	2
III 分担研究報告書	
1. 妊婦の血清葉酸値が児の出生時体重に及ぼす影響について (岸 玲子、水上尚典、櫻木範明、遠藤俊明、石川睦男ほか)	33
2. 妊娠中の母親の喫煙が乳児の身体的成長に及ぼす影響に関する研究 (岸 玲子、水上尚典、櫻木範明、遠藤俊明、石川睦男ほか)	37
3. 尿道下裂のリスク要因に関する症例対照研究 (岸 玲子ほか)	40
4. 停留精巣と環境化学物質曝露との関連についての症例対照研究 (岸 玲子ほか)	48
5. 尿道下裂患者のステロイド合成関連酵素 CYP17 遺伝子多型 (岸 玲子ほか)	53
6. 尿道下裂リスクと母親の CYP1A1, GSTM1, GSTT1 遺伝子多型との関連 (岸 玲子ほか)	58
7. 尿道下裂・停留精巣の遺伝要因－異物代謝酵素の遺伝子多型 (岸 玲子ほか)	62
8. 尿道下裂術後長期例における精巣容積に関する研究 (野々村克也ほか)	68
9. 尿道下裂症例の長期予後に関する研究 (野々村克也ほか)	70
10. 妊娠期における母体側の遺伝的感受性－不育症例における遺伝子多型解析 (佐田文宏ほか)	75
11. カフェイン摂取、異物代謝酵素遺伝子多型と不育症リスク (佐田文宏ほか)	81
12. 不育症に関わる免疫学的異常と子宮内胎児発育遅延に関わる遺伝学的因子の解明 (水上尚典ほか)	85
13. 妊娠維持機構および免疫学的生殖不全病態の解明 (水上尚典ほか)	90
14. 当科で経験した胎児の形態異常と超音波検査について (工藤隆一ほか)	93
15. 妊娠中毒症の病態解析に関する研究 (工藤隆一ほか)	96
16. 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 (遠藤俊明ほか)	99
17. 婦人科疾患 (良性卵巣腫瘍) 患者におけるダイオキシン類の汚染状況に関する検討 (石川睦男ほか)	104
18. 新たなヒト無精子症の原因遺伝子であるヒト SYCP3 遺伝子同定に関する研究 (石川睦男ほか)	105
19. 精子形成に関与するヒト精巣特異的遺伝子の同定 (石川睦男ほか)	107
20. cytochrome P450 など異物代謝酵素遺伝子の多形解析と毒性評価 1 (藤田正一ほか)	109
21. cytochrome P450 など異物代謝酵素遺伝子の多形解析と毒性評価 2 (藤田正一ほか)	119
22. cytochrome P450 など異物代謝酵素遺伝子の多形解析と毒性評価 3 (藤田正一ほか)	138
23. 内分泌かく乱化学物質のヒト暴露評価－新規高感度分析手法の構築－ (中澤裕之ほか)	143
24. ヒト生体試料からの内分泌かく乱化学物質の微量分析法の確立 (中澤裕之ほか)	152
25. 妊婦 (200 人) の血中 PCDDs, PCDFs, ノンオルソ Co-PCBs およびモノオルソ Co-PCBs 濃度 (2003-2004 年) (飯田隆雄ほか)	159

I はじめに

平成14年度より開始した厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業「前向きコホート研究による先天異常モニタリング、特に尿道下裂、停留精巣のリスク要因と内分泌かく乱物質に対する感受性の解明」も3年間の研究を終了することができました。

尿道下裂・停留精巣をはじめとする先天異常は、最近増加しているとの報告が発表されていますが、日本では、地域の一定集団で発生率やリスク要因を評価することがいまだなされていません。本研究の特徴は、諸外国でもこれまでほとんど実施されていなかった前向きコホート研究の形で実施されていることです。（従来の多くの研究では対照研究による疫学研究が中心でした）

これまで内分泌かく乱物質の次世代への直接的な影響と因果関係は、ほとんど解明されていません。そこで本研究では、北海道各地の産婦人科の皆様方の御協力を得て、妊娠初期に説明と同意を得た妊婦さんから採血し、葉酸と予備的にダイオキシン類および有機フッ素系化合物の測定を行いました。今後もビスフェノールA・フタル酸エステル類、あるいは植物エストロゲンなど内分泌かく乱物質を分析測定し、分娩時に臍帯血を分析測定させていただくことにより、アウトカムである出産時点での児への影響（先天異常の有無や、子宮内発達）あるいは、アレルギー等への影響を調べていく予定です。

加えて異物(薬物)代謝酵素の関与が考えられるダイオキシンや喫煙などと、遺伝的な多型との関連もさらに詳細に調べていく予定です。このような研究は、将来は、同じ曝露濃度でもハイリスク感受性者には、より予防的な対応を進めるという意味で重要になってきます。

本研究は広範囲の産婦人科医療機関のご協力で進められていますが、今回の調査により多くの生児人口がカバーされれば、その地域集団での発生率の推移や地理的分布もわかります。日本ではごく一部の地域を除いて、地域ベースの先天異常モニタリングシステムがありませんが、北海道で、今回のように予防医学（公衆衛生学）と臨床医学（産科、泌尿器科、小児科など）が共同で進めるこのような協力体制を続けることができれば、将来は、生まれてくる児の早期医療など、予防医学的アプローチとQOLを一層高める方向でも種々の発展が可能になることでしょう。

最後に、多くの皆様の御協力により実施され、3年間の総合報告書をこのようにまとめることができたことに対して、衷心より御礼申し上げます。

平成17年3月
主任研究者 岸 玲子

前向きコホート研究による先天異常モニタリング、特に尿道下裂、停留精巣の リスク要因と内分泌かく乱物質に対する感受性の解明

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教授）

研究要旨

本研究は、わが国においても、諸外国でもこれまでほとんど実施されていなかった妊婦を対象にした前向きコホート研究を行い、妊娠中の妊婦への内分泌かく乱物質等の曝露が、胎児へどのような影響を及ぼすかを解明し、予防に役立てることを目的としている。前向き研究の形で、妊娠初期の 12 週までに、同意を得た妊婦から採血し、PCB・ダイオキシン類、有機フッ素系化合物など内分泌かく乱物質の濃度を測定し、アウトカムである出産時点での児への影響（先天異常の有無など）を確認することにより、内分泌かく乱物質と尿道下裂・停留精巣をはじめとする先天異常との直接的な因果関係を評価することが可能になる。本研究を進めるのに際し、（1）マーカー奇形の選定と手引き書・新生児個票の作成、（2）妊婦への説明・同意書、医療機関に対する趣意書の作成、（3）調査票の作成、（4）採血スピッツの選定と汚染状況の確認、（5）妊婦からの採血・調査票回収、（6）化学物質の新規高感度分析手法の構築、及び（7）遺伝的感受性解析用 DNA マイクロアレイの開発等を行った。

平成 15 年 2 月から平成 17 年 1 月までの本研究への参加妊婦数は、累計 6508 人であった。このうち平成 15 年 11 月までに本調査に同意のうえ参加され、出産を終えた妊婦 532 人を対象として、妊娠 13 週未満の血清を用いて葉酸値の測定を行った。さらに葉酸代謝酵素である MTHFR の C677T 及び A1298C 多型の遺伝子型を、リアルタイム PCR 法で解析した。母親の出産時年齢、妊娠前 BMI、教育歴、新生児性別、在胎週数、出産経歴、喫煙および遺伝子型で調整した場合、葉酸値が 5.7ng/ml 以下であると出生時体重との間に負の関連がみられた。また C677T 及び A1298C 多型のそれぞれの遺伝子型と出生時体重との有意な関連はみられなかった。葉酸値が低値になると、出生時体重に影響を及ぼす可能性があり、周産期における葉酸摂取の必要性が示唆された。また、母親の妊娠中の喫煙が母親の妊娠中の喫煙が児の出生時の身体的特徴（身長、体重、頭囲、胸囲）に及ぼす影響について調べたところ、非喫煙群の児と比べて、喫煙群の児は、身長、体重、頭囲、胸囲すべてにおいて、出産年齢、在胎週数、出産回数、児性別、母親 BMI、母親学歴で調整してもなお、有意に小さかった。

前向きコホート研究と並行して、尿道下裂、停留精巣、不育症（習慣流産）、不妊症の症例対照研究も実施した。尿道下裂の症例対照研究では、出生時低体重でのオッズ比（OR）は 4.92、95%信頼区間（CI）は 2.38-10.19、帝王切開による出生では OR=3.28、95%CI=1.70-6.32 であった。患児の CYP17 遺伝子多型と疾患との関連はみられなかった。1990 年以降に停留精巣の手術を受けた患児 94 名、停留精巣・尿道下裂をもたない病院対照男児 116 名を対象として、疾患リスクに影響を及ぼす要因を検討したところ、異常分娩（帝王切開・吸引分娩・鉗子分娩）（OR=2.2 95%CI=1.1-4.4）、妊娠初期・妊娠中の父の職業性ディーゼル暴露（各 OR=1.9 95%CI=1.0-3.4、OR=1.9 95%CI=1.1-3.5）、妊娠初期・妊娠中の父の喫煙（OR=2.4 95%CI=1.1-5.6、OR=2.4 95%CI=1.0-5.6）でオッズ比の上昇がみられた。今回の調査からは、父親の喫煙などの化学物質との関連が示唆された。

CYP1A1 (MspI), GSTM1, GSTT1 と尿道下裂との関連を調べるために、尿道下裂患児の母 31 例と対照の母 64 人で症例対照研究を行ったところ、CYP1A1 変異型ヘテロ、変異型ヘテロ+ホモが、野生型と比較して有意なオッズ比の減少を示し（各 Adjusted OR=0.17, 95%CI=0.04-0.74、OR=0.28,

95%CI=0.08-0.97)、尿道下裂と母親のエストロゲン代謝との関連が示唆された。尿道下裂患児、停留精巣患児の症例対照研究では、CYP1A1、GSTM1、GSTT1 の遺伝子多型と疾患との間に有意な関連はみられなかった。

尿道下裂術後長期経過例の精巣容積について検討し、本邦における精巣容積曲線と比較した。1983 年以後の 20 年間に当科で尿道形成術を施行した 447 例中、術後 7～17 年経過した 14 例（術後平均 11.8 年）において精巣容積を計測した。精巣容積評価時の年齢は 11～22 歳で、精巣容積は 9～20 ml であった。本邦における精巣容積曲線の -2SD 以下の萎縮精巣が 14 例中 1 例、28 精巣中 2 精巣（7.1%）で認められた。

1983 年以降に 6 歳以下で初回手術を施行し現在 18 歳以上となった尿道下裂症例 33 人の性的長期予後の検討を行なったところ、尿道下裂既往のない 18 歳以上の男性 50 例と比べて陰茎の状態についてはサイズに不満が強く、性機能については、射精機能や性交機能に関しての満足度は同程度で、性的活動性もほぼ同様であった。

不育症と食事・生活習慣および異物代謝酵素遺伝子多型との関連を明らかにするため、北大附属病院産科を受診した不育症患者 81 人、健常経産婦 226 人に、生活習慣、食事、職業、居住環境などに関する質問紙調査票を郵送し、各々 53 人（回答率 65.4%）、144 人（回答率 63.7%）から回答を得た。不育症例では、対照に比べカフェインを多く摂取する傾向がみられた。CYP1A2 遺伝子の CYP1A2 遺伝子の CYP1A2*1F(C731A)多型の AA 型（活性上昇型）において、カフェイン摂取量が多くなるにつれて、不育症のリスクの上昇がみられ、1 日当たりの平均カフェイン摂取量が 300mg 以上で、オッズ比 5.22（95%信頼区間 1.02-26.2）の有意のリスクの上昇がみられた。また、GSTM1 欠損型、IL6 野性型、CYP17 変異型において、不育症のリスクの上昇がみられた。

習慣流産女性（n=20）では、コントロール（n=17）に比較して子宮内膜中 CD3+ 細胞、CD4+IFN- γ +細胞、CD4+TNF- α +細胞比率が有意に低値であった。染色体正常流産ないし化学妊娠に至った 17 人の非妊娠時 NK 細胞活性/細胞比率は、生産に至った 59 人に比較し有意に高く、染色体異常流産に至った 9 人と同レベルであった。非妊娠時の高 NK 細胞活性（>46%）/高細胞比率（>16.4%）は、その後の妊娠における染色体正常流産ないし化学妊娠の予知因子（相対危険率 3.6/4.9）であることを明らかにした。習慣流産患者の NK 細胞における CD158a 発現は、コントロールに比較して有意に低値を示した。CYP17 A1 allele ホモ型（n=44）の IUGR 頻度は、A2 allele キャリア（n=90）の頻度に比較して有意に高かった（OR =3.41）。また、GSTM1 null 型（n=67）の分娩週数は、GSTM1 presence（n=67）に比較して有意に早かった。Cytochrome P450c17 α enzyme をコードする CYP17 遺伝子多型が IUGR の病因に関連することを解明した。

マウスモデルおよびヒト材料を用いて、妊娠維持機構および免疫学的生殖不全、特に不育症における、NK 細胞、NKT 細胞、Th1/Th2 サイトカインバランス、M ϕ の役割を検討したところ、新たな習慣流産の原因として、Th diminution (immunodystrophism) が存在すること、染色体正常の自然流産原因として、NK 細胞抑制受容体低下が関与すること、免疫グロブリンは、M ϕ を介して流産抑止効果を発揮することを明らかにした。

通常の妊婦の超音波スクリーニングにおいて、胎児の形態異常は認められなかった。

妊娠中毒症の病態を研究するにあたり、胎盤の詳細な検討、胎盤絨毛細胞培養および絨毛細胞モデルを用いて、低酸素条件下においての変化が予想される老化抑制遺伝子 klotho と、aromatases P450 (CYP19)の発現様式について検討した。

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ところ、一時的ではあるが GLUT1 m-RNA 発現は抑制された。このことから、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。

子宮内膜症性嚢胞を含む卵巣腫瘍患者の皮下脂肪のダイオキシン類濃度の平均値は 24.92 pgTEQ/gfat、現段階で子宮内膜症患者とその他の良性卵巣腫瘍患者の間で、ダイオキシン類濃度に有意な差は認められなかった。

ヒト無精子症の原因として以前より、Y 染色体上の部分的欠失ことに AZF (azoospermia factor) 領域の欠失が報告されているが、今日までこの AZF 領域においてヒト無精子症の原因遺伝子として明らかとされたのは、わずか 3 つにすぎない。今回、ヒト 12 番染色体上に新たな無精子症原因遺伝子 SYCP3 の同定に成功した。不妊症の男性側のリスク要因をあきらかにするために、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。80 個のマウス TISP 遺伝子からヒトと同源性の高い 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、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同源性も 83% と高かった。

多くの CYP 分子種は、ステロイドホルモンやエイコサノイド、サイトカインなどによる発現制御を受けている。従って、これらの生理活性物質が大きく変動する妊娠期や性成熟は、CYP 活性を左右する大きな要因となっている。妊娠ラットを用いて母体肝臓における各 CYP 分子種の発現レベルや、aniline、propranolol、ethanol など薬物あるいは外来異物の代謝活性について測定した。CYP2D サブファミリーに関しては妊娠期に活性が増加するが、その他の CYP 分子種、CYP2B、CYP2E、CYP2C、CYP1A2 に関しては、蛋白発現量あるいは薬物代謝活性が、妊娠期に顕著に減少することが明らかとなった。Cytochrome P450(CYP)には様々な分子種が存在するが、様々な CYP 分子種の遺伝子多型によって、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子多型について、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子多型を一度に解析するために、新規マイクロアレイを作成し、血液あるいは毛髪ゲノムのサンプルを用いて解析を行った。さらに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と考えられた。

内分泌かく乱化学物質 (ED) のヒト暴露モニタリング手法の基礎的検討を基盤として、ビスフェノール A、アルキルフェノール類および有機フッ素系化合物に関する新たな分析法および暴露評価の構築を目指した。LC-MS 法を用いるフッ素系化合物の微量分析法を構築し、ヒト母体血-臍帯血濃度分布を測定した結果、決定係数 $r^2=0.875$ を得ることができた。その結果、母体暴露推移と胎児への影響が懸念される。また、母体血における分析結果のみにおいて、胎児への影響も想定できることとなった。PFOS に関しては、妊婦 207 検体全てより検出され、今後疫学研究への発展に期待される。

妊婦 200 人から母体血 (末梢血) を採取し、200 件の血液について、血中ダイオキシン類濃度 (PCDDs7 種、PCDFs10 種、ノンオルソ Co-PCB 4 種及びモノオルソ Co-PCBs8 種、合計 29 種) を異性体別に測定した。異常値を示した 1 件を除いた初産婦 96 名及び経産婦 103 名の血中ダイオキシン類平均濃度は、それぞれ、20.21 pg-TEQ/g lipid 及び 17.52 pg-TEQ/g lipid であった。

【分担研究者】

水上 尚典

（北海道大学大学院医学研究科生殖・
発達医学講座産科・生殖医学分野教授）

工藤 隆一

（札幌医科大学名誉教授）

遠藤 俊明

（札幌医科大学産婦人科学講座助教授）

石川 睦男

（旭川医科大学産婦人科学講座教授）

櫻木 範明

（北海道大学大学院医学研究科生殖・
発達医学講座産婦人科学分野教授）

小柳 知彦

（北海道大学大学院医学研究科名誉教授）

野々村 克也

（北海道大学大学院医学研究科外科治療学講座
腎泌尿器外科学分野教授）

藤田 正一

（北海道大学大学院獣医学研究科
環境獣医科学講座毒性学分野教授）

中澤 裕之

（星薬科大学薬品分析化学講座教授）

飯田 隆雄

（福岡県保健環境研究所部長）

佐田 文宏

（北海道大学大学院医学研究科予防医学講座
公衆衛生学分野助教授）

【研究協力者】

兼元 敏隆

（北海道産婦人科医会 会長）

山田 秀人、奥山 和彦、長 和俊、平山 恵美

片山 宙門

（北海道大学大学院医学研究科生殖・発達医学講
座産科・生殖医学分野、北海道大学附属病院産
科婦人科・周産母子センター）

柿崎 秀宏、柴田 隆、守屋 仁彦、村雲 雅志

古野 剛史

（北海道大学大学院医学研究科外科治療学講座
腎泌尿器外科学分野）

斉藤 豪、林 卓宏、北島 義盛、林 巧
藤松 正明、山崎 清大

（札幌医科大学産婦人科学講座）

田熊 直之、宮本 敏伸、佐々木 禎仁、山下 剛
福家 信二

（旭川医科大学産婦人科学講座）

芳賀 宏光、長谷川天洙、玉手 健一

（旭川赤十字病院産婦人科）

石塚真由美、数坂 昭夫

（北海道大学大学院獣医学研究科

環境獣医科学講座毒性学分野）

斉藤 貢一、吉村 吉博、井之上浩一、川口 研

伊藤 里恵、岡田 文雄、仲田 尚生

（星薬科大学薬品分析化学講座）

中川 礼子、松枝 隆彦、平川 博仙、堀 就英

飛石 和大、芦塚 由紀、戸高 尊

（福岡県保健環境研究所）

多田 実

（埼玉県立小児医療センター泌尿器科）

辻 克和

（社会保険中京病院泌尿器科）

黒川 泰史

（徳島大学医学部泌尿器科）

西條 泰明、玉置 淳子、貢 英彦、近藤 朋子

森 ゆうこ、笠井世津子、倉橋 典絵、宇津木 恵

森岡 三果、鈴木 佳奈、小池 晶、田中 亜美

宮崎美代乃、山岡 ゆう

（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）

【研究協力機関】

青葉産婦人科クリニック、秋山記念病院、旭川医
科大学附属病院、旭川赤十字病院、岩見沢こども・
産婦人科クリニック、遠軽厚生病院、えんどう桔
梗マタニティクリニック、王子総合病院、帯広協
会病院、帯広厚生病院、北見赤十字病院、北見レ
ディースクリニック、勤医協札幌病院、釧路赤十

字病院、釧路労災病院、慶愛病院、幌南病院、公立芽室病院、五輪橋産科婦人科小児科病院、札幌医科大学附属病院、札幌厚生病院、札幌徳州会病院、市立札幌病院、市立士別総合病院、市立函館病院、市立稚内病院、白石産科婦人科病院、新日鐵室蘭総合病院、手稲溪仁会病院、天使病院、道立紋別病院、中標津町立病院、中村病院、名寄市立総合病院、日鋼記念病院、函館五稜郭病院、函館中央病院、はしもとクリニック、朋佑会札幌産科婦人科、北海道大学附属病院

（平成 17 年 3 月現在）

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質の多くは、次世代影響が大きいのが特徴である。今回の研究では、尿道下裂、停留精巣等の先天異常の疫学研究を population-based で行い、リスク要因を検討する。まず発生率そのものが近年、真に増加しているかどうかを検討する。同時に、前向きコホート研究で、同意を得られた妊婦を対象に、妊娠時の母体血、出産時の母体血、臍帯血を保存し、内分泌かく乱物質（PCB・ダイオキシン類、有機フッ素系化合物等）の濃度の直接的な曝露量の測定を行い、内分泌かく乱物質と疾患との直接的な関連を追求する。これらの環境要因の検討と同時に、内分泌かく乱物質の代謝に関係の深い薬物代謝酵素等の遺伝子多型についても検討する。このような遺伝子多型による個体の感受性の検討は予防上も重要である。

葉酸は生体内では DNA 合成の際の補酵として重要であり、またアミノ酸であるホモシステインをメチオニンに転換する過程で重要である。葉酸が欠乏すると高ホモシステイン血症になり、高ホモシステイン血症は流産や胎児発育遅延、胎児奇形の発生との関連も報告されており、周産期疾患予防の観点からも、葉酸は重要であると考えられる。近年、欧米を中心とした疫学調査によって妊娠前から妊娠初期の葉酸の十分な摂取が神経管欠損症（NTD）やその他の先天異常（先天性心疾患）に対しての予防効果が報告されたことや、葉酸欠

乏状態は早産や低出生体重になるリスクが上昇することが報告されている。また妊婦を対象とした調査によると喫煙によって葉酸値が低下することや葉酸代謝酵素である MTHFR が変異形ホモ 677TT をもつ妊婦では、葉酸値がより低くなることを報告している。一方、日本では欧米諸国と比較して二分脊椎の発症率が低いことなどの理由から、これまで関連する疫学調査は行われていなかったが、ICBDMS（国際先天異常監視機構）によると、わが国の二分脊椎の発症率が増加傾向にあることが報告されたことや、今後、わが国の食生活の多様化により、食物摂取の個人格差が大きくなり、葉酸摂取量が減少していく可能性があることから、日本においても妊娠可能な女性に対しての葉酸摂取は、検討すべき課題であると考えられる。そこで本研究では、妊娠初期の葉酸値、喫煙、その他の環境要因、遺伝子多型（MTHFR）の感受性素因と児への影響（出生時体重）の関連の検討を行った。

前向きコホート研究と並行して、尿道下裂、停留精巣、不育症（習慣流産）、不妊症に関する症例対照研究・実験研究を行い、疾患リスクに影響を及ぼす要因を検討し、併せて遺伝的感受性の評価法、有機フッ素系化合物、ダイオキシン類の高感度微量測定法の検討も行った。

B. 研究方法

1. 妊婦の血清葉酸値が児の出生時体重に及ぼす影響

平成 15 年 1 月から 11 月までに北海道の 3 3 産科施設に通院中で、本調査に同意を得た妊婦 605 人のうち除外基準として、内分泌障害、凝固障害、葉酸サプリメントの服用者、てんかん、乾癬の既往を持つ人、腎不全患者および先天異常をもつ児を出産した母のいずれかに該当する 73 人を除いた、532 人を解析対象とした。

妊婦の血清葉酸値の測定は、妊娠初期（13 週未満）の血清 800 μ l を用いて CLIA 法で測定した。

自記式質問紙票を用いて、母親の属性（母親の

出産時年齢、妊娠前身長、体重、教育歴、既往歴、妊娠初期の喫煙、葉酸サプリメントの摂取）を調べた。さらにまた児の属性については、出産後に医療機関で記載された新生児個票から（新生児性別、在胎週数、出生時体重、奇形の有無）の情報を得た。

出産後の母体血を採取し、DNA 抽出を行い、MTHFR 遺伝子の C677T と A1298C の多型について、allelic discrimination assay で解析を行った。

統計解析は、SPSS ver.11.0 を用い、出生時体重に関連する因子である、母親の出産時年齢、妊娠前 BMI、出産経歴、新生児性別、在胎週数、喫煙、教育歴および妊婦の血清葉酸値（四分位）、C677T と A1298C の遺伝子型で調整して重回帰分析を行った。

2. 妊娠中の母親の喫煙が乳児の身体的成長に及ぼす影響

平成 16 年 8 月までに調査協力が得られた妊婦 613 名のうち、除外基準として、双生児、先天異常のある児、調査票の記入が不完全な者、63 名を除き、550 名を対象とした。喫煙に関しては、非喫煙群（一度も喫煙をしたことがない人）、禁煙群（妊娠初期にやめた人）、喫煙群（妊娠中も喫煙をしていた人）に分けて解析を行った。

解析は SPSS ver.11.0 を用いて一元配置分散分析を行い、その後多重比較をおこなった。

3. 尿道下裂のリスク要因に関する症例対照研究

症例は北海道大学附属病院泌尿器科外来にて経過観察中の、1984 年以降に出生の尿道下裂児。調査票を郵送した症例は 202 名、回収は 161 名（回収率 80%）である。対照は北海道大学附属病院小児科入院患者他、札幌市内の小児科入院・および外来患者男児とした。回収は 136 名（回収率 66%）である。

診療録からは、停留精巣を含む合併先天奇形、染色体異常所見、その他の周産期の異常の有無と重症度分類の情報が得られている。

質問票の内容は以下の通りである。

（1）母親の病歴

- ①妊娠前・初期の病歴・服薬歴など
- ②月経開始時期、生理不順など
- ③妊娠前の婦人科病歴（子宮内膜症、不妊治療とその治療のためのホルモン製剤使用、避妊薬使用）
- ④過去の妊娠、出産の回数・経過、流産の回数、対象児の同胞の病歴、
- ⑤対象児妊娠の経過・合併症

（2）父親の病歴

- ①不妊治療、尿道下裂の有無
- ②既往症・服薬歴など。

（3）環境要因

- ①職業性曝露（妊娠前・妊娠中に従事した業種と従事した仕事内容、使用した化学物質の種類。特に農業従事・農薬使用は独立の設問で質問。
- ②飲酒・喫煙（過去の喫煙の有無、妊娠初期、妊娠中の飲酒喫煙の頻度と量）
- ③食事内容（大豆製品・魚類などの摂取頻度）
- ④家庭菜園・花壇の作業による農薬曝露

4. 停留精巣と環境化学物質曝露との関連についての症例対照研究

症例は、1990 年以降、札幌市の泌尿器科 3 施設（大学病院：1、一般病院：2）で停留精巣の手術の既往のある児 96 名を対象とした（回収率 71%）。病院対照として、札幌市の小児科 4 施設（大学病院：1、一般病院：4）入院および外来中の停留精巣・尿道下裂を持たない男児とその両親を対象とし、116 名から回答を得た（回収率 79%）。

質問紙調査法を用い、過去に手術を受けた男児については質問紙を患児の保護者宛に郵送した。調査票の主な内容は、児要因（出生時体重、在胎期間、先天奇形合併）、産科要因（妊娠経過、妊娠時・出産時における問題：妊娠中の出血・切迫流産・帝王切開・異常分娩・妊娠悪阻・子癇前症、過去の妊娠歴・出産歴）、母親の要因（母親の病歴・薬剤服用歴、喫煙・飲酒、）食事、父親の要因（父

親の病歴：不妊治療、泌尿器系疾患、喫煙・飲酒、食事）、化学物質曝露（内分泌攪乱物質の職業性曝露・食物からの摂取、農作業・家庭菜園での作業における農薬への曝露等）である。

児出生年、母親の児出生時年齢、世帯収入を調整因子として、ロジスティック回帰分析を行った。

5. 尿道下裂患者のステロイド合成関連酵素 CYP17 遺伝子多型

症例は、北海道大学付属病院泌尿器科外来にて経過観察中の尿道下裂児 38 例。これら症例は外来診療あるいは入院治療時に、保護者にインフォームドコンセントの上、遺伝子解析のための血液サンプルを採取した。対照は、泌尿器科疾患歴のない健康な男性ボランティア 98 名。

PCR 法を用い、血液サンプルより抽出した DNA を鋳型として PCR-RFLP 法により、制限酵素 MspI によって CYP17 遺伝子のプロモーター領域の変異を検出した。

6. 尿道下裂リスクと母親の CYP1A1, GSTM1, GSTT1 遺伝子多型との関連

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）で尿道下裂の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。

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。

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）は龟头、冠状溝、陰茎部の開口とし、重症（近位）は陰茎陰囊部、陰囊部の開口とした。

両群の母より 2 ml 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。

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。

7. 尿道下裂・停留精巣の遺伝要因—異物代謝酵素の遺伝子多型

①尿道下裂・停留精巣患児

北海道大学医学部附属病院泌尿器科・埼玉県立小児医療センター泌尿器科、社会保険中京病院泌尿器科・徳島大学医学部附属病院泌尿器科で、尿道下裂の手術を受けた男児 64 人と、停留精巣の手術を受けた男児 27 人を症例群とし、尿道下裂・停留精巣などの泌尿生殖器系先天異常をもたないボランティア健常男性 96 人を対照群とした。

②尿道下裂・停留精巣児を出産した母親

北海道大学医学部附属病院泌尿器科・社会保険中京病院泌尿器科で尿道下裂の手術を受けた男児の母親 31 人、停留精巣の手術を受けた 9 人を症例群とし、北海道大学産婦人科で、奇形を持たない男児を出産した経産婦 61 人を対照群とした。

③妊娠中の母親の喫煙と遺伝子多型との関連

②の対象者のうち、妊娠中の生活習慣に関する調査票に回答した尿道下裂・停留精巣児の母親 29 人（有効回答率 72.5%）、奇形を持たない男児を出産した経産婦 48 人（有効回答率 78.7%）を対象として、喫煙の有無と遺伝子多型との関連を調べた。

対象者の末梢血から通常の方法で DNA を抽出し、シトクロム P450 のアイソザイムである CYP1A1、グルタチオン転移酵素のアイソザイムである GSTM1、GSTT1 の遺伝子多型を解析した。CYP1A1 は 3' 側の Msp I 多型を PCR-RFLP 法により対象者の遺伝子型を判定し、GSTM1、GSTT1 は PCR 法により、欠損の有無を判定した。

統計解析方法は、ロジスティック回帰分析を用い、野生型 homozygote および野生型 homozygote+非喫煙群を reference として、オッズ比を求めた。喫煙との関連については、児出生時の世帯収入と、母親の学歴を調整因子とした。

8. 尿道下裂術後長期例における精巣容積に関する研究

1983 年以降北大附属病院泌尿器科で尿道形成術を施行された 447 名の患者のリストを作成した。患者カルテの調査とともに、術後長期での観察を呼び掛ける手紙を郵送し、外来受診を促した。精巣容積の測定は、オルキオメーターを用いて行った。本邦における精巣容積曲線を用いて、 $-2SD$ 以下を萎縮精巣と判定した。

9. 尿道下裂症例の長期予後に関する研究

尿道下裂症例は、1983 年以降に 6 歳以下で初回手術を施行し、現在 18 歳以上となった症例で、現在連絡可能であり、了解が得られた 33 例を症例群とした。対照群は、尿道下裂既往のない 18 歳以上の男性 50 例とした。

症例群と対照群に、自己記入式質問表を記入してもらい、郵送にて返却とした。質問表では、現在の陰茎の状態・性機能 (勃起の状態・性欲・射精・性交時の問題点)・性行動 (自慰行為、性交) に対して、質問した。

解析は t 検定、カイ自乗検定を行い、 $p < 0.05$ にて有意とした。

10. 妊娠期における母体側の遺伝的感受性—不育症例の異物代謝酵素等の遺伝子多型

北海道大学医学部附属病院を受診した不育症の患者および少なくとも 1 度正常分娩を経験した流産の既往のない年齢、居住地を合わせた健康女性を対象とした。対象者の末梢血から通常の方法で DNA を抽出した。Ah 受容体、シトクロム P450 のアイソザイムである CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP17、グルタチオン転移酵素のアイソザイムである GSTM1、GSTT1、GSTP1、およびサイトカインのインターロイキンの 1 種の IL1b、IL6 の遺伝子多型を解析した。PCR-RFLP 法または Real-time PCR 法により、各遺伝子の遺伝子型を判定し、ロジスティック回帰分析により、オッズ比と 95%信頼区間を求めた。同時に、質問紙調査を実施し、生活習慣、食事、居住地、

職業等の環境要因の検討も行った。

11. カフェイン摂取、異物代謝酵素遺伝子多型と不育症リスク

北大附属病院産科を受診した不育症患者 81 人、健康経産婦 226 人に、生活習慣、食事、職業、居住環境などに関する質問紙調査票を郵送し、各々 53 人 (回答率 65.4%)、144 人 (回答率 63.7%) から回答を得た。また、受診時に、採血を行い、白血球より DNA を抽出し、PCR-RFLP 法により、CYP1A2 遺伝子型を判定した。ロジスティック回帰分析により、オッズ比と 95%信頼区間を求めた。統計解析には SPSS ウィンドウズ版を用いた。

12. 不育症に関わる免疫学的異常と子宮内胎児発育遅延に関わる遺伝学的因子の解明

1) 習慣流産 20 人と正常女性 17 人における黄体期中期の子宮内膜中 CD56+NK 細胞数、CD3+CD4-CD8-TCRV α 24+V β 11+NKT 細胞数、CD4+細胞における細胞内 IFN- γ 、IL-4、TNF- α 発現をフローサイトメーター法 (FCM) で調べ比較した。

2) 習慣流産患者 113 人における非妊娠時末梢血中の NK 細胞活性 (Cr 遊離法)、細胞比率 (FCM) とその後の妊娠の帰結との関連を前方視的に検討した。

3) 習慣流産 20 人と正常女性 15 人における末梢血 CD3-CD56+NK 細胞マーカー、perforin、CD94、CD161、CD158a、CD158b、CD244 を解析 (FCM) した。

4) コホート研究として、北大で 24 週をこえて出産した 134 女性から末梢血 DNA を採取し、PCR/PCR-RFLP 法による各種遺伝子多型：CYP1A1 (MspI)、CYP17 (MspAI)、GSTP1 (BsmAI)、GSTM1 (presence/null)、GSTT1 (presence/null) と出生体重、分娩週数、子宮内胎児発育遅延 (IUGR) 頻度、早産頻度、妊娠中毒症頻度との関係を調べた。

13. 妊娠維持機構および免疫学的生殖不全病態の 解明

前方視的コホート研究として、自然流産の脱落膜中 CD3-CD56+NK 細胞の perforin, CD94, CD161, CD158a, CD158b, CD244 発現を、および CD8 陽性 T 細胞の perforin 発現をフローサイトメトリー法で解析し、同時に絨毛染色体核型分析を行った。染色体正常流産、異常流産、人工中絶間で比較検討した。

Poly(I:C) 誘導の免疫学的生殖不全マウスモデルを作成した。CBA/J×DBA/2J 妊娠マウスに Poly(I:C) 60～200 μ g を ip. (Day7) して胎仔吸収率（流産率）を Day13 に調べた結果、Poly(I:C)用量依存性に流産率が上昇し、200 μ g ip.によってプラトーに達し、コントロールの流産率 20%から 55 \pm 5 (M \pm SD)%に上昇した ($p < 0.01$)。

このマウスモデルを用いて、免疫グロブリン投与によって、流産率変化を解析した。

14. 胎児の形態異常と超音波検査について

1988 年 3 月から札幌医科大学産婦人科において妊婦検診を行った単胎症例のうち、妊娠 17 週から 22 週の時期に超音波スクリーニングを希望した妊婦 186 例、そのうち 146 例が分娩後当院小児科医により診察を受けており、これらの症例が対象となった。超音波スクリーニングで異常が推測された場合、必ず再度超音波検査を行い異常の有無を再確認することにした。超音波再検で異常を認めなかった場合は、超音波スクリーニング正常群に含めることにした。測定項目は、BPD (児頭大横径)、APTD (胎児腹部前後径)、TTD (胎児腹部横径)、HL (上腕骨長)、FL (大腿骨骨長)、羊水ポケット、後頭蓋窩、後頸部、側脳室 atrium を計測した。また、胎児心および外性器を中心とした詳細な観察も同時に施行した。このスクリーニング検査には通常 1 人約 30 分を要した。

また、2001 年と 2002 年に市中病院で胎児奇形を疑い当科に紹介となりそのまま当科での分娩したそれぞれ 15、12 症例の確定した異常内容を検討した。

15. 妊娠中毒症の病態解析に関する研究

B-1) 妊娠中毒症および正常胎盤の採取

全例、帝王切開による分娩時に、無菌的に胎盤を採取し、採取より 15 分以内に液体窒素下に凍結・保存もしくは直ちに絨毛細胞培養のため Kliman らの方法に準じた処理を行う。一部は組織学的検討のため、凍結およびパラフィン包埋に供する。

B-2) 細胞培養法

培養実験として、上記絨毛細胞のほかに絨毛モデルとして絨毛癌細胞株 (BeWo) を用いる。培養条件は低酸素培養 (酸素濃度 5%以下) 下での培養と air condition 下での培養を比較検討する。また、hypoxic-reoxygenation 条件での培養も行う。

B-3) 遺伝子解析

摘出物および培養細胞の *CYP19* および *klotho* m-RNA 発現を Northan blott, in situ hybridization および real time RT-PCR 法を用いて定量・局在に関し検索する。

B-4) 関連蛋白解析

CYP19 発現を抑制する human Mash-2 (mammalian achaete/scute homologue 2) と 2 種類の *Klotho* 蛋白発現・局在につき、Western blott および免疫組織染色を施行する。

B-5) 機能評価実験

それぞれの遺伝子につきアンチセンス実験や他の抑制遺伝子発現により、細胞の生存率や分化状況・ホルモン産生能の変化を解析する。また、これとは反対に、過剰発現させた場合の機能変化についても検討する。

16. 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

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 1.0×10^5 cells 37°C 、5% CO_2 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 μ g RNA 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。

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 μ 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、 β アクチンを基準にし NIH image にて画像解析した。

17. 婦人科疾患（良性卵巣腫瘍）患者におけるダイオキシン類の汚染状況に関する検討

子宮内膜症性嚢胞を含む卵巣腫瘍患者において、当科で核出手術、あるいは摘出手術を施行した患者から文書で同意を得、術中に創部（下腹部）の皮下脂肪約 1 グラムの供与を受け、CALUX 法にてダイオキシン類濃度を測定した。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。

18. 新たなヒト無精子症の原因遺伝子であるヒト SYCP3 遺伝子同定に関する研究

マウス Sycp3 cDNA をもとに、ヒト精巢 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、ヒト SYCP3 cDNA を単離し、その後減数分裂異常により、無精子症を呈している不妊症患者 19 名から文章による同意をもとに遺伝子異常の検索を行った。

19. 精子形成に関与するヒト精巢特異的遺伝子の同定

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、精巢特異的な cDNA の同定を試みた。精巢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。

20. cytochrome P450 など異物代謝酵素遺伝子の多形解析と毒性評価 1

1) 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、GST（グルタチオン抱合酵素）などの薬物代謝酵素から、日本人に多形が多い変異アレルを選定し、マイクロアレイの作成を行う。

2) フタル酸エステルが精巢に及ぼす影響

2-1) DBP による精巢毒性のメカニズム解明

フタル酸ジブチル (DBP: 500mg/kg)、コントロールとしてコーンオイル、そして、PPAR α のリガンドとして clofibrate (30mg/kg)、PPAR β のリガンドとして 2-bromohexadecanoic acid (2BR16C: 10mg/kg) を 7 週齢オスおよびメスラット (Wistar 系) 4 匹ずつ、計 10 群 (オス、メス 5 群ずつ) に 1 週間、連続経口投与した。1 週間後、精巢において、フタル酸ジブチルおよび PPAR β リガンド 2BR16C 投与群の mRNA 発現プロフ

ファイルや発現レベルがどのように変動するか、その作用機構を比較検討する為 cDNA マイクロアレイを用いて調べた。

2-2) DEHP テストステロン代謝に及ぼす影響

Wistar ラットオス 3 週齢にフタル酸エステルであるジエチルヘキシルフタル酸 (DEHP) を 0、100mg、1000mg/kg/day で 5 日間経口投与し、精巣におけるテストステロン代謝活性にどのような影響を及ぼすのかを調べた。テストステロン合成に関与する 17 β HSD、活性型テストステロン DHT 合成に関与するステロイド 5 α 還元酵素、また、テストステロンを水酸化し、テストステロンのクリアランスに関与する CYP3A 及び CYP2C11、テストステロンをエストロゲンに変換する CYP19 (アロマターゼ) などについて発現や代謝活性を HPLC-UV やウェスタンブロットング法、RT-PCR 法を用いて測定した。血中テストステロン濃度は ELISA 法により解析した。

21. cytochrome P450 など異物代謝酵素遺伝子の多形解析と毒性評価 2

1) 母と子の薬物代謝の差

ヒトにおける母と子の薬物代謝、特に、母体肝臓、胎児肝臓、胎盤に発現する CYP を中心に、その発現レベルやパターンの違いについて文献を調べた。

2) 妊娠ラットの母体肝臓における薬物代謝能の変動

妊娠ラットをモデルとして、妊娠中に CYP 各分子種の発現や薬物代謝活性がどのように変動するかを調べた。妊娠 0 日目、10 日目、11 日目、15 日目、18 日目、20 日目の Wistar ラットについて、肝臓を採取し、ミクロソームにおける CYP 発現や薬物代謝活性を測定した。妊娠時のラット肝臓に発現する CYP 各分子種発現量の変動は CYP2B1、CYP2B2、CYP2E1、CYP2C12 に特異的な各抗体 (ウサギ血清) を用い、Western blotting によって解析した。

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子多型を簡便に調

べる為に、マイクロアレイを用いた方法の開発を試みた。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。

22. cytochrome P450 など異物代謝酵素遺伝子の多形解析と毒性評価 3

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子多型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。

23. 内分泌かく乱化学物質のヒト暴露評価—新規高感度分析手法の構築—

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、標準原液としてメタノールで 1.0 mg/ml とする。その後、各種濃度にメタノールを加え調製する。又、内標準物質を暫定濃度になるよう精製水で希釈する。

LC/MS-SIM もしくは GC/MS-SIM 法により、標準・試料溶液を測定し、内標準法により、ピーク面積を利用して、各濃度範囲内において、検量線を作成し、定量分析に用いた。

24. ヒト生体試料からの内分泌かく乱化学物質の微量分析法の確立

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、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。

25. 妊婦（200 人）の血中 PCDDs、PCDFs、ノンオルソ Co-PCBs およびモノオルソ Co-PCBs 濃度（2003-2004 年）

2002 年から 2003 年に採取した 200 件の妊婦母体血中ダイオキシン類を、超高感度精密分析法で測定した。すなわち、血液 5g 秤取後凍結乾燥し、ダイオキシン類の内標準を添加し、高速溶媒抽出器で脂質を抽出した。これをヘキサンに再溶解後、硫酸処理し、硝酸銀シリカゲルカラムおよび活性炭カラム直結して精製し、ダイオキシン類と PCB 等に分離した。ダイオキシン画分は濃縮して溶媒除去大量試料注入装置 (SCLV-system) を装着した高分解能ガスクロマトグラフィー・高分解能マススペクトロメトリー (HRGC/HRMS) で測定した。PCB 画分は活性炭カラムでモノオルソ PCB を分離精製して HRGC/HRMS で測定した。(2004 年度は GPC カラムで PCB 画分を精製してモノオルソ PCB を含むヒト血中に残留す

る 68 種類の PCBs を HRGC/HRMS で測定した。)

倫理面への配慮

疫学調査は北海道大学大学院医学研究科医の倫理委員会および遺伝子解析審査小委員会および共同研究施設の倫理規定に従って実施し、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」、「疫学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。研究への参加は自由意志により、自発的に中止しても不利益を被らないよう配慮した。対象者のプライバシーの保持には細心の注意を払った。すべての実験・研究は、北海道大学大学院医学研究科及び獣医学研究科で規定されている、ヒト組織及び動物を用いた実験指針に従った。以上のように、本研究は、倫理面の十分な配慮のうえ行った。

C. 研究結果

1. 妊婦の血清葉酸値が児の出生時体重に及ぼす影響

妊婦 532 人の妊娠 12 週時の葉酸値の平均値は 7.3 ± 2.6 ng/ml であった。出生児体重を従属変数とし、4 分位に分けた葉酸値と、母親の出産時年齢、妊娠前 BMI、教育歴、新生児性別、在胎週数、出産経歴、喫煙および C677T と A1298C の遺伝子多型を独立変数として、強制投入法で重回帰分析を行った。その結果、喫煙や出産時年齢、新生児性別、在胎週数、出産経歴、妊娠前 BMI においても出生時体重との関連がみられたが、それらの変数を調整しても、葉酸値が 5.7 ng/ml 以下である群と出生時体重との間に負の関連がみられた。また、教育歴と、C677T と A1298C 遺伝子多型と出生時体重との関連はみられなかった。

2. 妊娠中の母親の喫煙が乳児の身体的成長に及ぼす影響

対象の内訳は、喫煙群 68 名、禁煙群 92 名、非喫煙群 390 名であった。非喫煙群の児と比べて、喫煙群の児は、身長、体重、頭囲、胸囲すべてに

において、出産年齢、在胎週数、出産回数、児性別、母親 BMI、母親学歴で調整してもなお、有意に小さかった。一方、禁煙群の児と非喫煙群の児を比較したところ、有意な差はみられなかった。

3. 尿道下裂のリスク要因に関する症例対照研究

161 例の症例から有効回答があった。conditional multivariate logistic analysis により、妊娠中毒症、切迫流産あるいは流産防止薬の投与、父の過去の喫煙を同一モデルに入れると、妊娠中毒症の OR は、1.88 (0.83-4.27)、切迫流産あるいは流産防止薬の投与は 1.92 (0.90-4.09)、父の過去の喫煙は 1.72 (0.94-3.14) であった。いずれも有意ではないが、リスク上昇傾向を示す。SGA、切迫流産あるいは流産防止薬の投与、父の過去の喫煙を同一モデルに入れると、SGA の OR は、5.13 (2.42-10.88)、切迫流産あるいは流産防止薬の投与は 2.37 (1.00-5.64)、父の過去の喫煙は 1.62 (0.83-3.14) であった。SGA と切迫流産あるいは流産防止薬の投与は有意にリスクを上昇させた。父に喫煙歴があることもリスクを上昇させる傾向にあった。

4. 停留精巣と環境化学物質曝露との関連についての症例対照研究

妊娠中のつわりは、症例で高い傾向にあった。切迫流早産、妊娠中毒症（浮腫、高血圧、蛋白尿のいずれかあり）は症例群で比較的多くみられたが、有意な差は認められなかった。帝王切開でリスクの上昇傾向、異常分娩（帝王切開、吸引分娩、鉗子分娩）では有意にリスクの上昇を認めた。

職業性の化学物質曝露については、症例で、父親の妊娠初期のディーゼル曝露のオッズ比が高い傾向にあった。母親の職業性化学物質曝露では有意な関連は無かった。

喫煙については、父の妊娠初期、妊娠中の喫煙で有意なオッズ比の上昇が認められた。また、同居人の喫煙でもオッズ比の上昇が認められた。母の喫煙に関しては、差はみられなかった。

「牛乳を毎日飲む」群で、「ほとんど飲まない」

と比較してオッズ比の上昇傾向がみられた。

5. 尿道下裂患者のステロイド合成関連酵素 CYP17 遺伝子多型

CYP17 の遺伝子型を症例 38 例、対照 98 例について、同定した。

A1/A2 の A1/A1 に対する OR は 0.62 (95% 信頼区間 0.27-1.43)、A2/A2 の OR は 0.65 (0.23-1.82) であった。A1/A2+A2/A2、すなわち A2 アレルを持つものの、A1/A1、すなわち A2 アレルを持たないものに対する OR は 0.63 (0.29-1.35)、A2/A2、すなわち A1 アレルを持たないものの、A1/A1+A1/A2、すなわち A1 アレルを持つものに対する OR は 0.83 (0.32-2.14) であった。

6. 尿道下裂リスクと母親の CYP1A1, GSTM1, GSTT1 遺伝子多型との関連

低出生体重児で有意なオッズ比の上昇がみられた。症例で在胎週数 37 週未満が多かった。妊娠中の喫煙も有意な関連はみられなかった。

GSTM1, GSTT1 に有意な関連はみられなかったが、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みられた（各々 OR=0.31, 95%CI=0.1-0.8 OR=0.4 95%CI=0.2-1.0）。

母親の出産時年齢、出生児体重、妊娠中の喫煙で調整しても、GSTM1, GSTT1 に有意な関連はみられなかったが、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みられた（各々 OR=0.2, 95%CI=0.04-0.7 OR=0.3 95%CI=0.1-0.97）。

7. 尿道下裂・停留精巣の遺伝要因—異物代謝酵素の遺伝子多型

症例群及び対照群の児の CYP1A1, GSTT1, GSTM1 遺伝子多型における遺伝子の頻度を表 1 に示した。CYP1A1 の変異型 Homozygote、Heterozygote をもつ停留精巣児で、オッズ比の低下傾向が見られたが、有意ではなかった。尿道

下裂の母親では、CYP1A1 の Heterozygote で有意なオッズ比の低下が見られた。また、停留精巢の母親では、CYP1A1 の変異型 Homozygote、Heterozygote でオッズ比の低下傾向が見られたが、有意ではなかった。CYP1A1 野生型で喫煙群、GSTT1 欠損型で喫煙群でオッズ比の上昇が見られたが、有意ではなかった。

8. 尿道下裂術後長期例における精巣容積に関する研究

術後 7～17 年経過した 14 例（術後平均 11.8 年、中央値 11 年）において精巣容積を計測した。この 14 例における尿道下裂の程度は、近位型 7 例、遠位型 7 例であった。14 例中 2 例において合併する停留精巣に対し、精巣固定術が施行されていた（両側 1 例、片側 1 例）。精巣容積評価時の年齢は 11～22 歳（平均 15.3 歳、中央値 14 歳）で、精巣容積は 9～20 ml であった。本邦における精巣容積曲線の -2SD 以下の萎縮精巣が 14 例中 1 例、28 精巣中 2 精巣（7.1%）で認められた。萎縮精巣を認めた 1 例は近位型尿道下裂例で、片側停留精巣に対し精巣固定術の既往があり、22 歳時で患側精巣は 10 ml、対側精巣は 9 ml であった。

9. 尿道下裂症例の長期予後に関する研究

質問表を返却した症例群 22 例の尿道下裂の程度は distal type 6 例、middle type 5 例、proximal type 9 例、不明 2 例と比較的程度の強い症例が多かった。

他の人との違いがあるか？という質問に関しては、症例群で約 6 割、対照群で約 4 割が“ある”と答えていた。その内訳は症例群では小さいことが最も頻度が高かったのに対し、対照群では一番は包茎で、小ささは 2 番目であった。

勃起時の問題を訴えたのは有意に症例群で多く（症例群：73%、対照群：45%、 $p < 0.05$ ）、その最も多かった問題点は小さいことであった。

性機能については、射精機能や性交機能についての満足度は同程度で、性的活動性もほぼ同様で

あった。

10. 妊娠期における母体側の遺伝的感受性—不育症例の異物代謝酵素等の遺伝子多型

不育症例および対照となる健常女性の GSTM1、GSTT1、GSTP1、AhR、CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP17、IL1b および IL6 遺伝子多型における遺伝子型の頻度を求めた。GSTM1 遺伝子欠損型の頻度は不育症例で高く、不育症のリスクを高めることが示唆された（オッズ比 2.2、95%信頼区間 1.4-3.7）。今回新たに、不育症例では IL6 遺伝子のプロモーター領域の BsrBI 多型で少なくとも 1 本のアリルに変異型を持つ頻度が有意に低いこと（オッズ比 0.5、95%信頼区間 0.2-0.9）、CYP17 遺伝子のプロモーター領域の MspAI 多型で少なくとも 1 本のアリルに変異型（A2）を持つ頻度が有意に高いこと（オッズ比 1.8、95%信頼区間 1.1-3.2）、IL1b 遺伝子のプロモーター領域の Aval 多型で少なくとも 1 本のアリルに変異型を持つ頻度が有意に低いこと（オッズ比 0.8、95%信頼区間 0.3-1.0）から、これらの遺伝子多型と不育症との関連が示唆された。また、CYP1A2 遺伝子 DdeI 多型の変異型ホモ接合の頻度が不育症例で低かったが、統計学的にはボーダーラインであった（オッズ比 0.2、95%信頼区間 0.0-1.0）。

11. カフェイン摂取、異物代謝酵素遺伝子多型と不育症リスク

不育症例では、対照に比べ、カフェインを多く摂取する傾向がみられ、1日当たりカフェインを 300mg 以上摂取する場合、不育症に対するオッズ比は 2.61 と上昇するが、有意ではなかった。CYP1A2 遺伝子の *CYP1A2*1F* 多型の AA 型（活性上昇型）において、カフェイン摂取量が多くなるにつれて、不育症のリスクの上昇がみられ、1日当たりの平均カフェイン摂取量が 300mg 以上で、オッズ比 5.22（95%信頼区間 1.02-26.2）の有意のリスクの上昇がみられた。

12. 不育症に関わる免疫学的異常と子宮内胎児発育遅延に関わる遺伝学的因子の解明

1) 子宮内膜中 NK 細胞数、NKT 細胞比率には差異を認めなかった。習慣流産女性では、コントロールに比較して CD3+ 細胞 (平均 40.3 vs. 56.5%)、CD4+IFN- γ +細胞 (28.4 vs. 39.5%)、および CD4+TNF- α +細胞 (32.9 vs. 45.8%) 比率が有意に低値であった。Th1/Th2 バランスは両群間で差異を認めなかった。習慣流産患者の子宮内膜では、Th1 優位、NK 細胞、NKT 細胞異常などは認められず、これは従来の仮説と異なり、Th 細胞の減少、つまり immunodystrophism が病因に関連していることが初めて示された。

2) 習慣流産患者 85 人がその後妊娠した。染色体正常流産ないし化学妊娠に至った 17 人の非妊娠時 NK 細胞活性/細胞比率 (平均 47%/17.1%) は、生産に至った 59 人の 33%/13.1% に比較し有意に高く、染色体異常流産に至った 9 人の 27%/15.7% は生産群と同レベルであった。ROC 解析からカットオフ値をそれぞれ設定した。非妊娠時の高 NK 細胞活性 (>46%) / 高細胞比率 (>16.4%) は、その後の妊娠における染色体正常流産ないし化学妊娠の予知因子 (相対危険率 3.6、95%CI 1.6-8.0/4.9、1.7-13.8) であることが初めて明らかとなった。

3) 習慣流産患者の NK 細胞における CD158a 発現は、コントロールに比較して有意に低値 (平均 22.9% vs. 33.6%) を示した。perforin、CD94、CD161、CD158b、CD244 発現は両群間で差異はなかった。NK 細胞で抑制型レセプターである KIR2DL1 (CD158a) の発現低下が認められ、習慣流産の病因に関連していることが初めて示唆された。

4) CYP17 A1 allele ホモ型 (A1A1) (n=44) の IUGR 頻度 (<10th percentile/< -1.5 SD; 22.7%/11.4%) は、A2 allele キャリア (A1A2/A2A2) (n=90) の頻度 (7.8%/2.2%) に比較して有意に高かった (OR =3.41、95% CI = 1.18-9.84)。また、GSTM1 null 型 (n=67) の分娩週数 (Mean \pm SD、37.5 \pm 3.1 週) は、

GSTM1 presence (n=67) の週数 (38.5 \pm 2.4 週) に比較して有意に早かった。Cytochrome P450c17 α enzyme をコードする CYP17 遺伝子多型が IUGR の病因に関連していることが初めて明らかとなった。

13. 妊娠維持機構および免疫学的生殖不全病態の解明

中絶群や染色体異常流産に比し、染色体正常流産では脱落膜中 NK 細胞では、CD158a+細胞や CD94+細胞が減少し、NK 細胞と T 細胞の perforin 発現が有意に増加していた。また NK 細胞における CD158a と CD94 発現には、負の相関関係が認められた。NK 細胞抑制型レセプターの減少と細胞障害性 perforin の増加が、染色体正常流産と関連することが初めて明らかとなった。

Poly(I:C) 誘導免疫学的生殖不全マウスモデルに Poly(I:C) i.p.後、intact ないし Fab 型ヒト免疫グロブリン 0.8g/kg を 3 日間 i.p.したところ、intact 型では流産率が 8%に減少し、流産抑止効果が認められたが、Fab 型では流産率は変化しなかった。この流産抑止効果は Fc 部分を介するものと考えられた。

免疫グロブリン投与非妊娠 donor マウスからの脾細胞を分離し、Poly(I:C) 投与妊娠 recipient マウスに尾静脈から注入して、未分画脾細胞、Thy1.2 陽性 T-, B220 陽性 B-, DX5 陽性 NK 細胞、F4/80 陽性 M ϕ の流産抑止効果を調べた (養子移入実験)。この養子移入実験の結果、未分画脾細胞の移入によって、流産率は 13 \pm 3% に抑制された (p<0.0001)。MACS 法で T 細胞、B 細胞、NK 細胞を除去して移入しても、流産率は各 22%、10%、23% と流産抑止効果は残存したが、M ϕ を除去した場合、流産率 49% と流産抑止効果が消失した。一方、免疫グロブリン投与非妊娠 donor マウスに CL2MDP-liposome i.p.投与し、M ϕ を完全除去した脾細胞を分離して養子移入実験を行った結果、流産抑止効果は消失した。

14. 胎児の形態異常と超音波検査について

超音波スクリーニングの対象妊婦の平均年齢は 31.8 ± 4.9 (mean \pm SD) 歳 (20-42 歳) であった。超音波スクリーニングにおける各部計測値の正常症例は 146 例で、これら正常群は出生後の小児科診察においても異常を認めなかった。また、1 回目の検査で測定値異常を疑われた 14 症例の全てが、2 回目の検査で異常を認めず、出生後の小児科的診察でも異常を認めなかった。

次に、紹介症例では 2001 年の場合、小腸閉鎖 2 例、水頭症 2 例、髄膜瘤 2 例、その他小脳低形成、水腎症、胎児水腫、卵巣腫瘍、横隔膜ヘルニア、13 トリソミーなどであった。2002 年は、胎児水腫 3 例、食道閉鎖 2 例、胎便性腹膜炎 2 例、18 トリソミー 2 例、その他ポッター症候群、胎児腹水、腎嚢胞などであった。

15. 妊娠中毒症の病態解析に関する研究

現在までの予備実験で、2 種類の *klotho* 遺伝子 (membrane-bound form と secreted form) 発現において、どちらのタイプにおいても正常胎盤と妊娠中毒症胎盤との間に m-RNA レベルでの差はなく、どちらも secreted form が有意に発現していることが判明した。*Klotho* 蛋白もこれら m-RNA がコードする 2 種類 membrane form と secreted form の存在が確認されており、これらはさらに 2 種類の domain (hKL1 と hKL2) により構成されている。membrane form は hKL1 と hKL2 両者により、また secreted form は hKL1 のみで構成されており、膜と結合している domain は hKL2 である。予備実験では hKL2 が妊娠中毒症胎盤で有意に発現しており、一方で hKL1 の発現は正常・妊娠中毒症胎盤においても認められなかった。免疫組織学的検討では hKL2 が妊娠中毒症胎盤 syncytiotrophoblast に強い染色を認めた。

16. 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

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。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。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 105 個あたりの β 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。

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。JEG-3 細胞株では、TCDD 添加による変化は認めなかった。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。

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。

17. 婦人科疾患 (良性卵巣腫瘍) 患者におけるダイオキシン類の汚染状況に関する検討

平成 14 年度末までに 21 症例を測定しそのダイオキシン類濃度の平均値は 24.92 pgTEQ/gfat であった。また、現段階で子宮内膜症患者とその他の良性卵巣腫瘍患者の間で、ダイオキシン類濃度に有意な差は認められなかった。

18. 新たなヒト無精子症の原因遺伝子であるヒト SYCP3 遺伝子同定に関する研究

ヒト SYCP3 遺伝子は減数分裂異常により無精子症を呈している不妊症患者 19 名中 2 名の患者に 1 塩基のみの欠失を認め、これが蛋白レベルでの機能異常を呈していることを明らかにした。

19. 精子形成に関与するヒト精巣特異的遺伝子の 同定

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。

20. cytochrome P450 など異物代謝酵素遺伝子の 多形解析と毒性評価 1

1) 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。

変異場所の増幅に PCR を用いるため、現在、多数 primer を用いた PCR 法の条件設定を行っている。現在、CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2C19, GSTP1, NAT2, AhR, PPAR に関しては、primer の作成と、PCR・ハイブリ条件の設定が終了している。

2) フタル酸エステルが精巣に及ぼす影響

2-1) DBP による精巣毒性経路の同定

DBP 曝露によって、精巣では、ホスホリパーゼや G 蛋白、hormone receptors、VEGFR1 (vascular endothelial growth factor receptor 1) や TGF β (transforming growth factor beta) 受容体など growth factor 関連分子あるいは oncogene, proto-oncogene, tumor suppressor、また、カリウムチャンネルを始めとする ion channels など、約 110 遺伝子の発現レベルが上昇することが分かった。

DBP 投与によって、肝臓で発現が誘導されるこ

とが知られているシトクロム P450 分子種の一つ、CYP4A3, CYP4A8 など CYP4A サブファミリー mRNA は、精巣においても発現レベルが 3.0-3.6 倍に増加していた。COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor) と PPAR は相互的に転写活性化することが報告されているが、今回の結果でも、DBP 投与群では COUP-TFI の発現量が増加していることが明らかとなった。また、今回のマイクロアレイ解析から、DBP 曝露がホスホリパーゼ C isoform である δ , γ , β のいずれの発現レベルも上昇させることが明らかとなった。また DBP 投与によって、数種のカルシウム結合蛋白の発現量が増加しており、DBP がこの系の活性化に影響する可能性が示唆された。

一方、2BR16C 投与群では約 180 遺伝子の発現レベルが上昇した。DBP と 2BR16C 投与群の両群のラット精巣に発現する mRNA の発現頻度を比較すると、両群において発現量が増加する共通遺伝子は約 20 種であった。

2-2) DEHP が精巣テストステロン代謝に及ぼす影響

DEHP 曝露によって血中テストステロン濃度は減少した。そこで、精巣においてテストステロン生合成に関与する 17 β HSD 活性に大きな変化は認められなかった。

テストステロン水酸化酵素である CYP3A 及び CYP2C11 はそれぞれ肝臓において 6 β 位水酸化、16 α 位水酸化を行う。今回の結果から、テストステロンの精巣における主要な水酸化代謝物は、肝臓と同様に 6 β 位水酸化体および 16 α 位水酸化体であることが分かった。DEHP 投与によって、精巣の CYP3A2 および CYP2C11 は蛋白レベルで発現が上昇し、それに伴ってテストステロン水酸化活性も増加することが明らかとなった。また、CYP3A2 および CYP2C11 依存の活性であることが分かっているジアゼパム 3 位水酸化、N 脱メチル化活性は、それぞれ、CYP3A2, CYP2C11 蛋白発現レベル、および、テストステロン代謝活性レベルに一致していた。