

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

内分泌かく乱化学物質とホルモン関連腫瘍  
に関する疫学研究

(H17-化学-014)

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

津 金 昌一郎 国立がんセンターがん予防・検診研究センター

分担研究者

加 藤 貴 彦 宮崎大学医学部

坪 野 吉 孝 東北大学大学院法学研究科

岩 崎 基 国立がんセンターがん予防・検診研究センター

平成18（2006）年4月

## 目次

### I. 総括研究報告書

内分泌かく乱化学物質とホルモン関連腫瘍に関する疫学研究 津金昌一郎	—— 1
--------------------------------------	------

### II. 分担研究報告書

1. 研究の総括、コホート内症例対照研究、子宮内膜症の症例対照研究 津金昌一郎	—— 15
2. 前立腺がんの症例対照研究 加藤 貴彦	—— 39
3. 乳がんの症例対照研究 岩崎 基	—— 47
4. 健康影響に関する疫学研究の文献的検討 坪野 吉孝	—— 65

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	—— 101
---------------------	--------

IV. 研究成果の刊行物・別刷	—— 103
-----------------	--------

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
総括研究報告書

内分泌かく乱化学物質とホルモン関連腫瘍に関する疫学研究

主任研究者 津金 昌一郎  
国立がんセンター がん予防・検診研究センター 予防研究部 部長

研究要旨 日常生活環境における有機塩素系化合物などの化学物質曝露がホルモン関連腫瘍の発生に関連するか否かを明らかにすることを目的に疫学研究を行っている。

平成17年度は、平成14年度から平成16年度の研究計画に引き続き、既存の前向きコホート研究において収集された保存生体試料を用いた乳がんのコホート内症例対照研究を行った。また今年度から新たに前立腺がんのコホート内症例対照研究を開始した。乳がんのコホート内症例対照研究については、血漿中イソフラボノイドについて長期保存の影響を検討したところ、長期保存によりレベルが低減することが確認されたが、症例対照間の比較は可能であるため、分析を開始し434検体の測定を終えた。また、微量サンプルでの有機塩素系化合物分析のための予備実験を行い、500マイクロリットルでの分析が可能であることを確認し、分析を開始した。

平成13年度に開始した乳がんの症例対照研究は、平成17年10月に有効症例数(400)に到達し、対象者の収集を終了した。生体試料の分析として、まず血清中有機塩素系農薬類とPCB類の分析項目選定のために解析除外検体を予備的に分析し、その存在割合をもとに項目を決定、測定を開始した。また対象者の末梢血よりDNAを抽出し、エストロゲンの合成・代謝に関連する遺伝子、環境化学物質の代謝に関連する遺伝子、ホルモンレセプター遺伝子などを中心とする40遺伝子61多型についてTaqMan real-time RT-PCR法による多型解析を開始した。食物摂取頻度調査票を含む自記式質問票から得られるデータについては、生理・生殖関連、既往歴、職業、居住地、飲酒、喫煙、食物・栄養素摂取量などの要因と乳がん罹患リスクの関連を予備的に検討した。

平成17年度より開始した前立腺がんの症例対照研究は、症例および対照の収集を継続し、平成18年2月時点で、前立腺がん症例130例、対照500例を収集した。また過去に収集された190名の前立腺がん患者と294名の対照者を用い、症例対照収集後に解析する候補遺伝子の検討を行った。第2相薬物代謝酵素である*GSTA1*、*GSTT1*、*GSTM1*、*GSTP1*の遺伝子多型の頻度を解析し、喫煙者において*GSTA1*および*GSTT1*の遺伝子多型が、前立腺がんの発癌感受性に関与していることを示唆する結果が得られた。

子宮内膜症の症例対照研究では、既に分析が終了している血清中ダイオキシン類とPCB類、尿中イソフラボン類、エストロゲン合成・分解に関与する遺伝子多型やエストロゲンレセプターなどの遺伝子多型のデータを用いて、環境要因と遺伝的要因の相互作用の検討を行った。尿中イソフラボンとER  $\beta$  Rsa I 遺伝子多型の組み合わせにおいて、Large Rアレルを有する人は、ゲニステインによる子宮内膜症のリスクが特に低いこと、また血清中ダイオキシンとCYP1A1 Ile462Val遺伝子多型の組み合わせにおいて、バリニアレルを有する群で、ダイオキシン類による子宮内膜症のリスクがむしろ低いという傾向が観察された。また、尿中ビスフェノールAの分析法を確立し、分析を行った。

平成11年度から有機塩素系化合物などの化学物質曝露の健康影響に関する疫学研

究の文献的検討と情報公開を行なっている。平成16年10月末までの文献を検討した「内分泌かく乱化学物質問題の現状と今後の取組 厚生労働省内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会 中間報告書追補その2」が出版されているので、今年度はそれ以降から平成17年12月末までに出版されたがんと子宮内膜症に関する原著論文(26件)のレビューを行った。

#### 分担研究者

加藤貴彦 宮崎大学医学部・社会医学講座・教授  
坪野吉孝 東北大学大学院法学研究科・教授  
岩崎 基 国立がんセンター・がん予防検診研究センター・予防研究部・研究員

#### 研究協力者

春日好雄 厚生連長野松代総合病院・外科部長  
横山史朗 長野赤十字病院・外科部長  
小沼 博 長野赤十字病院・外科副部長  
西村秀紀 長野市民病院・外科部長  
草間 律 北信総合病院・外科部長  
黒田嘉紀 宮崎大学医学部・社会医学講座・助教授  
中尾裕之 宮崎大学医学部・社会医学講座・助手  
小宮康裕 宮崎大学医学部・社会医学講座・大学院生  
山野優子 昭和大学医学部・衛生学講座・講師  
鷹橋浩幸 慈恵会医科大学・病理学講座・講師  
池田仁子 国立がんセンター・がん予防・検診研究センター予防研究部・研究員

#### A. 研究目的

日常生活環境における有機塩素系化

合物などの化学物質曝露がホルモン関連腫瘍の発生に関連するか否かを明らかにすることを目的とした疫学研究を行う。生殖器系及び乳腺の悪性新生物と化学物質曝露との関連については症例対照研究および既存の前向きコホート研究(厚生労働省研究班による多目的コホート研究)において収集された保存生体試料を用いたコホート内症例対照研究で検証する。子宮内膜症の症例対照研究では、既に収集したデータを用いて検証する。また、平成11年度から続けている疫学研究の文献的検討と情報公開を行う。

#### B. 研究方法

1. 既存の前向きコホート研究におけるコホート内症例対照研究

(1) 乳がんのコホート内症例対照研究

(1-1) 対象者

岩手県二戸、秋田県横手、長野県佐久、沖縄県中部(以上、1990年開始のコホートI)、茨城県水戸、新潟県柏崎、高知県中央東、長崎県上五島、沖縄県宮古、大阪府吹田市(以上、1993年開始のコホートII)の10保健所管内に研究開始時点に在住していた女性地域住民67521人(40~69歳)のうち、ベースライン調査の質問票に回答しかつ血液検体の提供のあった者から、追跡開始後に判明した不適格者(外国人、調査開始前の転出者、対象年齢外の者、重複登録者)、乳がんまたは卵巣嚢腫の既往がある者を除外した24226人を研究対象者とした。

本研究の症例は、ベースライン調査後から2002年12月31日までの追跡期間中に組織学的に診断された初発の乳がん患者のうち、ベースライン調査の質問票に回答しか

つ血液検体の提供のあった144人である。対照は、研究対象者24226人のうち症例の乳がん発症日(診断日)の時点で乳がんにかかっていない者から、症例と年齢が±3歳以内、管轄保健所が一致、市部または郡部在住が一致、採血年月日が±90日以内、採血時間が±3時間以内、空腹時間が±3時間以内、閉経状況が一致する条件でマッチングし、条件にあう対象者の中からさらに無作為に2名を選び対照とした。

#### (1-2) 調査方法

ベースライン調査(生活習慣アンケート調査、血液の採取・保存)およびフォローアップ調査(異動、死亡、疾病罹患の把握)は、「厚生省コホート研究班コホートI実施要綱」「厚生省コホート研究班コホートII実施要綱」「多目的コホートによるがん・循環器疾患の疫学研究 研究計画書 平成13年度改訂版」(国立がんセンター倫理審査委員会平成13年10月承認)に基づいて実施してきた。

#### (1-3) 測定対象物質

血漿中エストラジオール、性ホルモン結合グロブリン。血漿中インフラボノイド、有機塩素系農薬類。

#### (1-4) 解析方法

測定対象物質の曝露量による乳がん罹患リスク(相対危険度)をConditional logistic modelを用いて検討する。必要に応じて多変量解析を行い、交絡要因を調整する。また、期間(採血時期から乳がん発症まで)で層別化した解析を行う。

(倫理面への配慮)

研究プロトコールは、国立がんセンター倫理審査委員会において平成15年5月22日に承認された。

研究計画全体については国立がんセンター倫理審査委員会で平成13年10月18日に承認されている。また、パンフレットやニュース・レター、インターネット・ホームページを通じて、具体的方法などについて研究対象者個人および広く社会に広報している。血液

検体については主として1990年から1994年にかけてすでに収集されているが、対象者に対してすべての地域で説明文書の個別配布、保健所職員による口頭説明、あるいは説明文書の掲示もしくは配布によって説明を行った。一部地域(秋田横手、沖縄石川、大阪吹田)は同意書を用いて被験者本人の署名を得た。他の地域でも口頭による同意は受けている。

追跡調査によって収集される死亡・住所異動・疾病罹患などの個人情報や既に収集されている生活習慣・健康診査・血液などの個人情報については、厚生労働省多目的コホート研究班・個人情報保護安全管理措置マニュアルに従って、コホート研究対象者に危険・不利益が及ばないように厳格に管理する。解析は、個人識別情報を外したデータを用いて集団として統計的な解析を行う。

#### (2) 前立腺がんのコホート内症例対照研究

##### (2-1) 対象者

岩手県二戸、秋田県横手、長野県佐久、沖縄県中部(以上、1990年開始のコホートI)、茨城県水戸、新潟県柏崎、高知県中央東、長崎県上五島、沖縄県宮古、大阪府吹田市(以上、1993年開始のコホートII)の10保健所管内に研究開始時点に在住していた男性地域住民678721人(40~69歳)のうち、ベースライン調査の質問票に回答しかつ血液検体の提供のあった者から、追跡開始後に判明した不適格者(外国人、調査開始前の転出者、対象年齢外の者、重複登録者)、前立腺がんの既往がある者を除外した14041人を研究対象者とした。

本研究の症例は、ベースライン調査後から2005年12月31日までの追跡期間中に診断された初発の前立腺がん患者のうち、ベースライン調査の質問票に回答しかつ血液検体の提供のあった162人である。対照は、研究対象者14041人のうち症例の前立腺がん発症日(診断日)の時点で前立腺がんにか

罹っていない者から、症例と年齢が±3歳以内、居住地が市町村レベルで一致、採血年月日が±90日以内、採血時間が±3時間以内、空腹時間が±3時間以内の条件でマッチングし、条件にあう対象者の中からさらに無作為に2名を選び対照とした。

#### (2-2) 調査方法

ベースライン調査(生活習慣アンケート調査、血液の採取・保存)およびフォローアップ調査(異動、死亡、疾病罹患の把握)は、「厚生省コホート研究班コホートI実施要綱」「厚生省コホート研究班コホートII実施要綱」「多目的コホートによるがん・循環器疾患の疫学研究 研究計画書 平成13年度改訂版」(国立がんセンター倫理審査委員会平成13年10月承認)および「多目的コホートによるがん・循環器疾患の疫学研究 研究計画書 平成13年度改訂・平成16年度修正版」(国立がんセンター倫理審査委員会平成16年7月承認)に基づいて実施してきた。

#### (2-3) 測定対象物質

血漿中テストステロン、ジヒドロテストステロン、性ホルモン結合グロブリン。血漿中イソフラボノイド、有機塩素系農薬類など。

#### (2-4) 解析方法

測定対象物質の曝露量による前立腺がん罹患リスク(相対危険度)をConditional logistic modelを用いて検討する。必要に応じて多変量解析を行い、交絡要因を調整する。また、期間(採血時期から前立腺がん発症まで)で層別化した解析を行う。

(倫理面への配慮)

研究プロトコルは、国立がんセンター倫理審査委員会において平成18年1月26日に承認された。

研究計画全体については国立がんセンター倫理審査委員会にて平成13年10月(改訂版)及び平成16年7月(修正版)がそれぞれ承認されている。また、パンフレットやニュース・レター、インターネット・ホームページを通じて、具体的方法などについて研究対象者

個人および広く社会に広報している。血液検体については主として1990年から1994年にかけてすでに収集されているが、対象者に対してすべての地域で説明文書の個別配布、保健所職員による口頭説明、あるいは説明文書の掲示もしくは配布によって説明を行った。一部地域(秋田横手、沖縄石川、大阪吹田)は同意書を用いて被験者本人の署名を得た。他の地域でも口頭による同意は受けている。

追跡調査によって収集される死亡・住所異動・疾病罹患などの個人情報や既に収集されている生活習慣・健康診査・血液などの個人情報については、厚生労働省多目的コホート研究班・個人情報保護安全管理措置マニュアルに従って、コホート研究対象者に危険・不利益が及ばないように厳格に管理する。解析は、個人識別情報を外したデータを用いて集団として統計的な解析を行う。

## 2. 乳がんの症例対照研究

### 2-1. 研究デザイン

長野県内の4病院(長野松代総合病院、長野赤十字病院、長野市民病院、北信総合病院)において多施設症例対照研究を行った。

### 2-2. 対象者

初発の乳がんと診断され、上記の4病院に入院した20歳以上75歳未満の女性患者全員を症例とし、400症例を目標に収集した。対照は長野松代総合病院と北信総合病院の人間ドック受診予定者の女性で上記症例に対して年齢(±3歳)と居住地が一致する者のうち最も年齢の近い1名とした。

### 2-3. 調査方法

対象者本人による自記式の質問票調査を行った。質問票は、生理・生殖関連、既往歴、職業、居住地、飲酒、喫煙などに関する質問票と食物摂取頻度調査票の2つを用いた。がんの部位、進行度、ホルモンレセプターなどの臨床情報の記載を担当医師に依頼した。

また生体試料として7mlEDTA2Na採血管1本、および血清9ml用採血管2本分の血液検体を収集した。

#### 2-4. 生体試料の分析

高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/HRMS)を用いた血清中有機塩素系農薬類とポリ塩化ビニル(PCB)の分析を島津テクニサーチで開始した。

また対象者の末梢血よりDNAを抽出し、エストロゲンの合成・代謝に関連する遺伝子、環境化学物質の代謝に関連する遺伝子、ホルモンレセプター遺伝子などを中心とする40遺伝子61多型についてTaqMan real-time RT-PCR法による多型解析を開始した。

#### 2-5. 解析方法

食物摂取頻度調査票を含む自記式質問票から得られる生理・生殖関連、既往歴、職業、居住地、飲酒、喫煙、食物・栄養素摂取量などの曝露要因と乳がん罹患リスクの関連をConditional logistic modelを用いて検討した。

(倫理面への配慮)

研究計画について国立がんセンター倫理審査委員会に申請し、平成12年12月27日に承認されている。全研究対象者に文書と口頭で研究の説明を行い、文書により研究参加の同意を得た。

症例収集数を増やすために、平成16年度に新たに北信総合病院を加え、症例収集期間を延長することとした。これに伴いプロトコル改訂し、平成15年7月23日に国立がんセンター倫理審査委員会において承認された。

### 3. 前立腺がんの症例対照研究

#### 3-1. 調査対象者および調査方法

前立腺がんとEDCとの関連性を解明するために、平成17年度に倫理審査をうけたプロトコルに従って、多施設症例対照研究を開始した。

症例は初発の前立腺がん、東京慈恵

会医科大学泌尿器科学講座、帝京大学医学部泌尿器学講座で診断された40歳以上90歳未満の男性入院患者及び外来患者全員とした。対照者は上記症例に対して、三井記念病院人間ドッグ受診者の男性で、年齢(±3歳)、居住地域が一致する者のうち最も年齢の近い1名を選び対照とした。それぞれの最終的な目標対象者数は、1000例である。目標対象者数に到達したところで、生活習慣に関する質問票及び血清中のEDCやホルモン、シトクロームP450などの環境化学物質の代謝に関与する酵素の遺伝子多型を分析し、前立腺がん発生とEDCとの関連性について検討する。

#### 3-2. 解析候補遺伝子検討のためのパイロット研究

過去に収集された190名の前立腺がん患者と294名の対照者を用い、症例対照収集後に解析する候補遺伝子について検討する。今年度は代表的な第2相薬物代謝酵素であるglutathione S-transferase (GST) A1、GSTT1、GSTM1、GSTP1の遺伝子多型の頻度を比較検討した。統計解析にはロジスティック回帰分析を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は宮崎大学医学部、東京慈恵会医科大学、帝京大学、三井記念病院の各倫理委員会にて研究が承認されている。また全研究対象者に文書と口頭で研究の説明を行い、文書によって研究参加の同意を得ている。

### 4. 子宮内膜症の症例対照研究

#### (4-1) 調査対象者および調査方法

症例および対照は東京慈恵会医科大学産婦人科で収集した、不妊症治療を目的として受診した20～45歳の未経産婦で、腹腔鏡検査を行った全員を把握、登録し、研究参加に同意した者を研究対象者とした。症例は、腹腔鏡検査によって子宮内膜症Stage II以上(AFS1985の基準に従う)と診断され

た者であり、ただし、妊娠3ヶ月以上の妊娠経験者は除いた。対照は、腹腔鏡検査によって子宮内膜症Stage I以下と診断された者とした。ただし、この場合も妊娠3ヶ月以上の妊娠経験者は除いた。出産と授乳は内分泌系に影響をおよぼすため、対象者についても出産と授乳の経験がないことを条件とした。

不妊治療または腹腔内視鏡検査以前の時期に採血(約40 mL)と採尿(約30 mL)を行った。採血・採尿と同時期に面接による質問票調査を行った。

血清中ダイオキシン濃度に差がみられた場合に、それを確認する目的で脂肪組織中のダイオキシン量の測定を行う。このために、腹腔鏡下に脂肪組織も採取した。腹腔鏡検査は研究目的ではなく、主治医の判断で診断あるいは治療目的で行われるものであり、脂肪組織の採取を含む説明と同意は腹腔鏡検査前に行った。患者が検査の前に同意した場合のみ、脂肪組織を腹腔鏡検査中に採取した。

また、血液および尿採取の性周期における時期を確認するために、治療目的のために記録された調査時期の基礎体温データを、患者が検査の前に同意した場合に収集した。

#### (4-2) 分析対象物質と分析方法

血清中のダイオキシン類(PCDDs/PCDFs/cPCBs)22種類、PCB類36種類、有機塩素系農薬11種類の分析は、米国疾病管理予防センター傘下の国立環境保健研究所において行った。分析項目の内訳と分析方法については、平成14年度に報告したとおりである。

尿中イソフラボノイド(ダイゼイン、ゲニステイン、グリシテイン、イコール)の分析は高速液体クロマトグラフィー電気化学検出器で行った。

尿中ビスフェノールAの分析は、高速液体クロマトグラフィー・タンデム型質量分析法

(LC-MS/MS)で行った。

エストロゲン合成・分解に関与する遺伝子多型やエストロゲンレセプターなどの遺伝子多型の解析は、被検者の末梢血よりゲノムDNAを抽出し、PCR-RFLP法にて行った。分析項目の内訳は、平成16年度に報告したとおりである。

(倫理面への配慮)

本研究は、日本および米国の関連4施設(東京慈恵会医科大学、国立がんセンター、国立環境研究所、米国疾病管理予防センター)の倫理委員会で研究が承認され、かつ日本側の研究機関と米国の間でProject Assuranceが取り交わされた。また全研究対象者に文書と口頭で研究の説明を行い、文書により研究参加の同意を得た。

#### 5. 健康影響に関する疫学研究の文献的検討

われわれは、平成15年度における本研究班の分担研究課題として、2001年1月から2003年12月の期間に出版された、内分泌かく乱化学物質のヒト健康影響に関する疫学研究論文のレビューを行った。今年度は、その後2004年1月から2005年12月の期間に出版された、内分泌かく乱化学物質のヒト健康影響に関する疫学研究のうち、がんと子宮内膜症に関する論文のレビューを行った。

米国立医学図書館の医学文献データベースPubMedを用いた文献検索を、2006年1月19日に実施した。検索の際に用いたキーワードは、平成15年度に行った文献検索の際に用いたキーワードと同じものである。

検索によりヒットした候補文献は、がんが263件、子宮内膜症が14件だった。これらの候補文献のタイトルと抄録をもとに内容を調査し、35件の文献を選択した(がん29件、子宮内膜症6件)。

なお、本研究班に関連する取り組みとして、平成17年3月厚生労働省医薬食品局化学物質安全対策室より、「内分泌かく乱化学物



質の現状と今後の取組「内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会中間報告書追補その2」が刊行された。この報告書では、本分担研究課題と同じ方法で疫学論文を検索し、2004年10月までに出版された論文のレビューを行っている。そこで、今回検索された疫学文献から、すでにこの報告書で取り上げられた文献9件を除外した(がん9件、子宮内膜症0件)。これらの重複文献を除外し、残る26件の文献についてレビューを行った(がん20件、子宮内膜症6件)。

## C. 研究結果

### 1. 既存の前向きコホート研究におけるコホート内症例対照研究

#### (1) 乳がんのコホート内症例対照研究

今回分析するサンプルと同時期に採血された匿名化血液を利用して、血漿中イソフラボノイドについて長期保存の影響を検討した。その結果、長期保存によりレベルが低減することが確認されたが、症例対照間の比較は可能であるため、分析を開始し434検体の測定を終えた。また、微量サンプルでの有機塩素系化合物分析のための予備実験を開始し、500マイクロリットルでの分析が可能であることが確認できたので分析を開始した。

#### (2) 前立腺がんのコホート内症例対照研究

乳がんのコホート内症例対照研究の研究計画に準じて研究計画を作成し、国立がんセンター倫理審査委員会に申請を行った。平成18年1月26日に承認が得られたので(添付資料)、対照者の選択をマッチング条件に基づいて行い、サンプルを準備した。

### 2. 乳がんの症例対照研究

#### 2-1. 対象者の収集

平成17年10月に有効症例406例(406ペア)に到達し、症例対照の収集を終了した。症例の平均年齢は53.7歳、閉経後女性の割合

は54.3%であった。一方、対照は平均年齢が53.9歳、閉経後女性の割合は64.8%であった。

乳がん症例406例の特徴を検討したところ、がんの発見動機は自覚症状が約80%を占め、がんの占拠部位としては複数の領域にまたがる病変が37.2%と最も多く、次にC領域の病変が31.5%と多かった。組織型としては浸潤性乳管癌が85.7%を占め、その中の半数程度が硬癌であった。その他、粘液癌、髄様癌、浸潤性小葉癌がそれぞれ3-4%見られた。進展度は、T1、T2症例が全体の約9割を占め、N0症例が83.3%、M0症例が98%であった。エストロゲンレセプター陽性症例は74.7%、プロゲステロンレセプター陽性症例は59.8%であった。

#### 2-2. 生体試料の分析

血清中有機塩素系農薬類とPCB類の分析については、まず解析除外検体を用いて分析項目選択のために予備的な分析を行った。その結果、存在割合が高く測定対象になり得る有機塩素系農薬は、p,p'-DDT、p,p'-DDE、trans-及びcis-Nonachlor、Oxychlorane、HCB、Mirex、b-HCHであった。またPCB異性体のうち#17、#28、#51、#48/#47、#74、#66、#101、#99、#118、#105、#146、#153、#164/#163、#138、#156、#182/#187、#183、#180、#170、#199、#194の存在割合が高く、これらに先行研究によりエストロゲン活性、抗エストロゲン活性が指摘されている異性体(#44、#49、#52、#77、#114、#123、#126、#128、#167、#169、#174、#177、#189、#196、#201、#203)を加え、測定の対象とした。

#### 2-3. 質問票データの解析

自記式質問票から得られる生理・生殖関連、既往歴、職業、居住地、飲酒、喫煙などの曝露要因と乳がん罹患リスクの関連を明らかにするための予備的な解析としてマッチドペアに基づく粗オッズ比を算出した。初経年齢が遅い群で有意ではないが乳がん罹患リ

スクが高い傾向が見られ、一方、閉経年齢は遅い群で有意にリスクが低かった。妊娠回数では有意な関連が見られなかったが、出産数では人数が多くなるほどリスクが低いという関連が観察された。有意ではないが、乳がんの家族歴がある群でリスクが高く、また良性乳房疾患の既往歴ありの群では有意にリスクが高かった。身長や体重、肥満指数などの体格に関する要因との間には関連が見られなかった。喫煙については、非喫煙者に比べて、過去喫煙、現喫煙者ともに有意に乳がん罹患リスクが高かった。運動習慣については、12歳時の激しい運動、20歳時の激しいないしは中程度の運動、最近5年間の中程度の運動の頻度が高いほど有意に乳がん罹患リスクが低いという傾向が見られた。その他、農薬を扱う職業の経歴は関連が見られなかったが、PCBまたはダイオキシンを扱う職業の経歴がある人は、有意でないもののリスクが高い傾向が見られた。また、缶コーヒーやその他の缶飲料の摂取頻度と乳がん罹患リスクの間に有意な正の関連がみられた。

食物摂取頻度調査票のデータをもとに栄養素・食品群別の粗摂取量、及び残差法によるエネルギー調整を行った摂取量を算出した。総エネルギー摂取量が500kcal未満または4000kcal以上の対象者を除いた390ペアについて、栄養素・食品群別摂取量と乳がん罹患リスクの関連を明らかにするための予備的な解析としてマッチドペアに基づく粗オッズ比を算出した。粗摂取量及びエネルギー調整済み摂取量の両者が一致して、摂取量の増加とともに乳がん罹患リスクの有意な低下が観察された栄養素は、たんぱく質、カルシウム、カロテン、レチノール当量、アルファカロテン、ベータカロテン、ルテイン、ビタミンE、ビタミンB2、ビタミンB6、ビタミンB12、葉酸、飽和脂肪酸、n-3脂肪酸、水溶性食物繊維、不溶性食物繊維、総食物繊維であった。同様に有意な負の関連が観察された食

品群は、乳類と野菜であった。一方、ゲニステイン、ダイゼイン、魚介類、肉類、果物の摂取量と乳がん罹患リスクの間には有意な関連は見られなかった。

### 3. 前立腺がんの症例対照研究

#### 3-1. 症例、対照の収集

プロトコールに従って症例、対照を収集し、平成18年2月時点で、前立腺がん症例130例、対照500例を収集し、さらに継続中である。

#### 3-2. 解析候補遺伝子検討のためのパイロット研究

190名の前立腺がん患者と294名の対照者について、GSTA1、GSTT1、GSTM1、GSTP1の遺伝子多型の頻度を比較した。全体の解析では、前立腺がんといずれの遺伝子型との関連性もみられなかった。次に喫煙状態によって層化し、解析を行った。喫煙者群において、酵素活性の低い遺伝子型であるGSTA1\*A/\*BもしくはGSTA1\*B/\*B遺伝子型保有者の前立腺がん患者における頻度は27.8%で、対照群における18.2%とのあいだに有意な差がみられた(オッズ比:1.72 95%信頼区間:1.01-2.94)。また、喫煙者においてGSTT1の非欠損遺伝子型の前立腺がん患者における頻度は63.6%で、対照群における51.2%とのあいだに有意な差がみられた(オッズ比:1.68 95%信頼区間:1.06-2.68)。次に有意な関連性の観察されたGSTA1\*A/\*B、GSTA1\*B/\*BかつGSTT1非欠損の遺伝子型コンビネーションのGSTA1\*A/\*AかつGSTT1欠損の遺伝子型コンビネーションに対するオッズ比は、2.08で95%信頼区間は1.14-3.80だった。

### 4. 子宮内膜症の症例対照研究

これまでに分析が終了している血清中ダイオキシン類(PCDDs/PCDFs/cPCBs)とPCB類、尿中イソフラボン類、エストロゲン合成・分解に関与する遺伝子多型やエストロゲン

レセプターなどの遺伝子多型のデータを用いて、環境要因と遺伝的要因の相互作用の検討を行った。

尿中イソフラボン、ER  $\beta$  Rsa I 遺伝子多型と子宮内膜症の関連を検討したところ、尿中イソフラボン単独では、尿中ゲニステインレベルが高いほど子宮内膜症のリスクが低いという関連が見られたが、ER  $\beta$  Rsa I 遺伝子多型の違いだけでは子宮内膜症のリスクに有意な差は観察されなかった。しかし両者の組み合わせにおいては、Large Rアレルを有する群において、ゲニステインによる子宮内膜症のリスクが特に低いという関連が観察された。

血清中ダイオキシン類、CYP1A1 Ile462Val遺伝子多型と子宮内膜症の関連を検討したところ、血清中ダイオキシン類と子宮内膜症の間には有意な関連が見られず、またCYP1A1 Ile462Val遺伝子多型の違いだけでは子宮内膜症のリスクに有意な差は観察されなかった。しかし両者の組み合わせにおいては、バリニアレルを有する群で、ダイオキシン類による子宮内膜症のリスクがむしろ低いという傾向が観察された。

これらの知見について、現在、論文にまとめ投稿中である。

尿中ビスフェノールAと子宮内膜症の関連を検討するために、固相抽出—安定同位体希釈LC-MS/MS法を用いて、濃度測定可能にする条件を検討し、分析法バリデーションを行い、その上で子宮内膜症の症例対照研究の対象者の尿検体を測定した。

操作ブランクのないバッチでは、1 ng/mL 標準溶液の繰り返し6回測定での定量値の標準偏差の3倍を装置検出下限値 (LOD) としたとき LOD = 0.3 ng/mL であり、標準偏差の6倍を定量下限値 (LOQ) としたとき LOQ = 0.6 ng/mL であった。操作ブランクの観察されたバッチでは、操作ブランク値の標準偏差の3倍を LOD、6倍を LOQ とした。このとき、LOD = 0.37 ng/mL、LOQ = 0.75 ng/mL であった。

精度管理用コントロール標準 (QC 試料) を同一バッチ内で測定した定量値の同時再現性は CV = 8.8% (n = 5)、サロゲート物質の回収率の平均値は 72% であった。相異なる 5 バッチにおいて繰り返し測定した際の日差再現性は CV = 19%、検量線 (0.6-20 ng/mL) の相関係数は  $r = 0.995-0.999$  であった。

子宮内膜症の Stage 0, I の対象者を対照群 (n=80)、Stage II-IV の対象者を症例群 (n=58) と定義し、対数変換後の値を用いて、症例と対照における尿中ビスフェノール A 濃度の平均値 (標準偏差) を比較したところ、症例群が 0.24 (0.49)、対照群は 0.14 (0.46) であり、2 群間に有意な差は観察されなかった。

## 5. 健康影響に関する疫学研究の文献的検討

今回レビューを行った 26 件の文献のうち、疾患別の内訳は、がんが 20 件、子宮内膜症が 6 件だった。がんに関する文献の部位別内訳は、乳がんが 10 件、前立腺がんが 4 件、全がんおよび複数部位が 3 件、その他の部位が 3 件だった。

研究デザイン別の内訳は、メタ分析が 1 件、コホート研究が 7 件 (前向き 3 件、後向き 4 件)、症例対照研究が 13 件 (コホート内 1 件、住民対照 2 件、病院対照 10 件) だった。また、地域相関研究が 3 件、断面研究が 2 件だった。

研究の行われた国を見ると、欧米が主体であった。日本で行われた研究は、がんについては存在しなかったが、子宮内膜症については 2 件あった (病院対照の症例対照研究が 1 件、断面研究が 1 件)。

## D. 考察

有機塩素系化合物などの化学物質に焦点を当てたこれまでの乳がん及び前立腺がんの疫学研究は、PCB 類などの有機塩素系化合物についての欧米諸国の症例対照研

究が大部分で、わが国からの報告はない。コホート内症例対照研究は追跡開始時点での曝露情報を正確に評価できる優れた研究デザインであり、日本人の乳がん・前立腺がんの発生と有機塩素系化合物などの化学物質曝露の関係を検証するうえで有益な情報をもたらすと考えられる。本コホート内症例対照研究の元となるコホート研究では、生活習慣や食習慣の詳細な情報、さらに植物エストロゲンの推定摂取量などの情報が把握されており、すでにデータベース化されている。一方、生体試料については、長期保存による影響の検討、また量に限りがあるため微量化学分析法の検討が求められる。

乳がんの症例対照研究は、平成12年12月に倫理審査委員会の承認を得て、平成13年5月より対象者の収集を開始した。途中、予定調査期間内での目標症例数の到達が困難との予測から調査医療機関の追加と収集期間を延長した。平成17年10月に有効症例数がようやく400を超え、対象者の収集を終了した。対象者の収集は、調査医療機関の担当医師をはじめとするスタッフに多大な負担をかけて行われているため、収集期間の長期化は大きな問題であったが、担当医師をはじめとするスタッフの理解と協力のもと、無事目標症例数を収集することができた。今後は、長期かつ、または大規模な研究計画のもとに症例を収集する際には、調査医療機関への人的サポートも含めた研究体制の構築が鍵になると思われる。

血清中有機塩素系農薬類とPCB類の分析を行うにあたり、解析除外検体を予備的に分析し、その存在割合をもとに分析項目の選択を行った。したがって、社会で現実の人が曝露しているレベルにおいて、これらの化学物質曝露が乳がん罹患リスクに関連しているかどうかを検討することが可能であると考えている。

各種データのクリーニングを行った後、生

理・生殖関連、既往歴、職業、居住地、飲酒、喫煙などに関する質問票と食物摂取頻度調査票の2つから得られる曝露要因と乳がんの関連を予備的に検討した。今回示した結果は粗オッズ比であり、交絡要因の調整は行っていない。したがって今回は個別の解析結果の考察は控える。

解析における今後の課題を以下に示す。今回の解析は閉経前と閉経後の女性と一緒に扱っているが、いくつかの要因については乳がんに対する影響が閉経前後で異なることが指摘されており、閉経状況で層別した解析が必要である。また乳がんはホルモンレセプターの状況によって病因が異なると言われており、これを明らかにするためにレセプター陽性の乳がんと陰性の乳がんに分け、その発生に関連する要因を検討する必要がある。

前立腺がんの症例対照研究では、現在東京2施設から症例の収集を行っているが、進行状況を見ると予想より登録数は少ない。そこで、あと1施設の協力を依頼したところ承諾を得ることができた。その結果、次年度末までに500症例を確保できる見込みである。一方、対照者の収集は順調であり、来年度末までに1000例の確保を目標としたい。

症例収集終了後の解析対象とする遺伝子を検討するために、過去に収集された190名の前立腺がん患者と294名の対照者を用い症例対照研究を行った。今年度はEDCやホルモンを含めた環境中化学物質の代表的な第2相薬物代謝酵素であるglutathione S-transferase (GST) A1、GSTT1、GSTM1、GSTP1に焦点を合わせた。喫煙と前立腺がんとの関連については未だ見解が分かっている。タバコ煙にはラットの前立腺に変異を起こす2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine (PhIP) などのGSTA1によって代謝される物質やジクロロメタンなどのGSTT1によって代謝活性化される物質も含

まれる。本研究の結果、喫煙者において GSTA1 および GSTT1 の遺伝子多型が、前立腺がんの発癌感受性に関与していることが示された。これらの結果から、PhIP、ジクロロメタンなどの環境要因と遺伝要因との相互作用が前立腺がんの発生の一因となっている可能性が示唆された。

子宮内膜症の症例対照研究では、これまでに、血清中ダイオキシン類22項目、PCB類36項目、有機塩素系農薬類13項目との関連を検討し、これらの化学物質は子宮内膜症とは関連しておらず、子宮内膜症の発症に有機塩素系化合物などの内分泌かく乱作用が懸念される化学物質が関与しているという証拠は得られなかったことを報告している。また、エストラジオール合成酵素遺伝子である HSD17B1 遺伝子多型、ダイオキシン類や PCB 類の作用発現において重要な役割を果たしている AhRR 遺伝子多型において子宮内膜症との関連を報告している。

今年度は環境要因と遺伝要因の相互作用に焦点を当てて分析を行った。尿中イソフラボン、ER  $\beta$  Rsa I 遺伝子多型と子宮内膜症の関連では、イソフラボン類の一つであるゲニステインの高曝露群で子宮内膜症のリスクが有意に低かった。これは子宮内膜症がエストロゲン依存性の疾患であることから、その発生に対するゲニステインの抗エストロゲン作用を支持する結果といえる。また、ゲニステインはエストロゲンレセプターを介して作用することが知られており、その機能は遺伝子多型の存在によって個体間にバリエーションが存在すると考えられる。ER  $\beta$  Rsa I 遺伝子多型で Large R アレルを有する群において、ゲニステインによる子宮内膜症のリスクが特に低いことが観察され、遺伝子多型による個体間のバリエーションの存在を支持する結果が得られた。この理由として、ER  $\beta$  Rsa I 遺伝子多型は hormone binding domain の近くに存在することから、ゲニステ

インとの親和性に関与しているのではないかと推測している。

血清中ダイオキシン類と子宮内膜症の間には関連が見られなかったものの、CYP1A1 Ile462Val 遺伝子多型との組み合わせにおいては、バリアレルを有する群で、ダイオキシン類による子宮内膜症のリスクがむしろ低いという傾向が観察された。CYP1A1 Ile462Val 遺伝子多型はバリアレルの方が誘導・酵素活性が強いことが知られており、また CYP1A1 はエストロゲン代謝にも関与していることから、ダイオキシン類による CYP1A1 の誘導がエストロゲン代謝にも影響を与えているのではないかと推測している。

今回確立した尿中ビスフェノールAの分析法は、わずか0.2mLの尿検体から、尿中成分の妨害を極力除去することで微量のビスフェノールAを低濃度域まで定量できる方法になっている。また、実験室内の空気・水や器具等からビスフェノールAが混入することは避けられないため、バックグラウンドの汚染として現れる操作ブランク値をコントロールするための方法を採用している。本研究では2 ng/mL付近の実試料測定における再現性がCV = 9-19%であった。結果として、米国CDCのビスフェノールA分析法(オンライン固相抽出-安定同位体希釈LC-MS/MS法。使用尿量 0.1 mL, 検出下限濃度 0.4 ng/mL, 低濃度QC試料(2.9 ng/mL)の日差再現性CV = 17%)に近い水準にあるといえる。

今回測定した尿中ビスフェノールA濃度の平均値を症例群と対照群の間で比較したところ、有意な差は見られなかった。さらに交絡要因を調整した解析を行い、最終的な結論を導く予定である。

2004年1月から2005年12月の期間に出版された、内分泌かく乱化学物質のヒト健康影響に関する疫学論文のうち、がんと子宮内膜症に関する論文26件のレビューを行った。

特徴的な知見について考察する。

乳がんについては10件の研究が追加された。血清や脂肪組織中の内分泌かく乱化学物質を測定し、乳がん症例と対照で比較する症例対照研究が7件と最も多かった。多数の化合物が測定されているため、結果を概括するのは必ずしも容易ではない。とはいえ全体として、有意なリスク上昇を示す結果は少なく、反対に有意のリスク低下を示す結果も散見された。「内分泌かく乱化学物質の現状と今後の取組—内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会中間報告書追補その2—」では、「有機塩素系化合物に関しては明確なリスク上昇についての一貫した証拠は見出せなかった」と結論している(p98)。今回の検討では、この結論に変更を要するような新たな知見は見出せなかった。

前立腺がんに関する研究の中で、Van Maele-Fabry(2004)らは、農薬使用に関連する職業と前立腺がんに関する疫学研究のメタ分析を行った。対象は、1966-2003年に英語で出版された22件だった(コホート研究が15件、症例対照研究が7件)。Pooled rate ratio(95%CI)は、全22件では1.24(1.06-1.45)と有意なリスク上昇を認めた。15件のコホート研究では1.27(1.06-1.52)、7件の症例対照研究では1.15(0.77-1.72)と、コホート研究の方が高かった。したがって本研究は、職業性の農薬曝露による前立腺がんリスクの上昇が示唆している。とはいえ、本研究では職業性曝露を検討しているのみであるので、特定の化合物の影響についての評価は明らかではない。特定の化合物に関する研究はいまだ件数も少ない現状が確認された。

子宮内膜症については6件の研究が追加された。このうち2件は日本からの報告だったが、total TEQで負の用量反応関係の傾向を認めるもの(Tsukino, 2005)や、ビスフェノールAとの負の関連を示すもの(Hiroi, 2005)であり、内分泌かく乱化学物質によるリ

スク上昇を認めなかった。今後さらに日本人での検証が必要である。

## E. 結論

有機塩素系化合物などの化学物質曝露とホルモン関連腫瘍の関連を検討するために、乳がんと前立腺がんをエンドポイントとしたコホート内症例対照研究および症例対照研究を行っている。乳がんのコホート内症例対照研究は有機塩素系化合物の分析を開始した。また前立腺がんのコホート内症例対照研究を新たに開始した。乳がんの症例対照研究は対象者の収集が終了し、血清中有機塩素系農薬類とPCB類の分析、遺伝子多型の解析を開始した。一方、前立腺がんの症例対照研究は、対象者の収集中である。子宮内膜症の症例対照研究では、ゲニステイン曝露とER $\beta$ 遺伝子多型、ダイオキシン類曝露とCYP1A1遺伝子多型の間に相互作用を示唆する結果が得られた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Tsuchiya M, Nakao H, Katoh T, Sasaki H, Hiroshima M, Tanaka T, Matsunaga T, Hanaoka T, Tsugane S, Ikenoue T. Association between endometriosis and genetic polymorphisms of the estradiol-synthesizing enzyme genes HSD17B1 and CYP19. Hum Reprod 2005;20:974-978.

Tsuchiya M, Katoh T, Motoyama H, Sasaki H, Tsugane S, Ikenoue T. Analysis of the AhR, ARNT and AhRR gene polymorphisms: Genetic contribution to susceptibility to and severity of endometriosis. Fertil Steril, 2005;84:454-458.

Tsukino H, Hanaoka T, Sasaki H, Motoyama H, Hiroshima M, Tanaka T, Kabuto M, Niskard AS, Rubind C, Patterson Jr DG, Turner W, Needham L, Tsugane S. Associations between serum levels of selected organochlorine compounds and endometriosis in infertile Japanese women. *Environ Res*, 2005;99:118-125.

Kurahashi N, Iwasaki M, Sasazuki S, Otani T, Inoue M, Tsugane S. Association of body mass index and height with risk of prostate cancer among middle-aged Japanese men. *Br J Cancer*. 2006;94:740-2.

Tsukino H, Hanaoka T, Sasaki H, Motoyama H, Hiroshima M, Tanaka T, Kabuto M, Turner W, Patterson Jr.DG, Needham L, Tsugane S. Fish intake and serum levels of organochlorines among Japanese women. *Sci Total Environ* (in press).

Iwasaki M, Otani T, Inoue M, Sasazuki S, Tsugane S for the Japan Public Health Center-based Prospective Study Group. Role and impact of menstrual and reproductive factors on breast cancer risk in Japan. *Eur J Cancer Prev* (in press).

Tsukino H, Kuroda Y, Nakao H, Imai H, Inatomi H, Osada Y, Katoh T. Cytochrome P450 (CYP) 1A2, sulfotransferase (SULT) 1A1, and N-acetyltransferase (NAT) 2 polymorphisms and susceptibility to urothelial cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004;130:99-106.

Tatemichi M, Sawa T, Gilibert I, Tazawa H, Katoh T, Ohshima H. Increased risk of intestinal type of gastric adenocarcinoma in Japanese women associated with long forms of CCTTT pentanucleotide repeat in the inducible nitric oxide synthase promoter.

*Cancer Lett* 2005; 217: 197-202.

Komiya Y, Tsukino H, Nakao H, Kuroda Y, Imai H, Katoh T. Human glutathione S-transferase A1 polymorphism and susceptibility to urothelial cancer in the Japanese population. *Cancer Lett* 2005; 221: 55-59.

Komiya Y, Tsukino H, Nakao H, Kuroda Y, Imai H, Katoh T. Human glutathione S-transferase A1, T1, M1, and P1 polymorphisms and susceptibility to prostate cancer in the Japanese Population. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005; 131: 238-242.

## 2. 学会発表

土谷雅紀、花岡知之、加藤貴彦、佐々木寛、津金昌一郎。子宮内膜症とエストラジオール合成酵素遺伝子多型(HSD17B1とCYP19)の関連性。第16回日本疫学会学術総会 名古屋。2006.1.

加藤貴彦, 小宮康裕. 感受性バイオマーカーの産業保健への応用(シンポジウム)、第2回日本癌学会カンファレンス, 2005. 3月, 蓼科

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

該当せず

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
分担研究報告書

研究の総括、コホート内症例対照研究、子宮内膜症の症例対照研究

分担研究者 津金 昌一郎  
国立がんセンター がん予防・検診研究センター 予防研究部 部長

研究要旨 日常生活環境における有機塩素系化合物などの化学物質曝露とホルモン関連腫瘍の関連を疫学的に検証することを目的として、平成14年度から平成16年度の研究計画に引き続き、既存の前向きコホート研究において収集された保存生体試料を用いた乳がんのコホート内症例対照研究を行った。今年度から新たに前立腺がんのコホート内症例対照研究も開始した。また子宮内膜症の症例対照研究のデータを詳細に検討した。乳がんのコホート内症例対照研究については、血漿中イソフラボノイドについて長期保存の影響を検討したところ、長期保存によりレベルが低減することが確認されたが、症例対照間の比較は可能であるため、分析を開始し434検体の測定を終えた。また、微量サンプルでの有機塩素系化合物分析のための予備実験を行い、500マイクロリットルでの分析が可能であることを確認し、分析を開始した。子宮内膜症の症例対照研究では、既に分析が終了している血清中ダイオキシン類とPCB類、尿中イソフラボン類、エストロゲン合成・分解に関与する遺伝子多型やエストロゲンレセプターなどの遺伝子多型のデータを用いて、環境要因と遺伝的要因の相互作用の検討を行った。尿中イソフラボンとERβ Rsa I 遺伝子多型の組み合わせにおいて、Large Rアレルを有する人は、ゲニステインによる子宮内膜症のリスクが特に低いこと、また血清中ダイオキシンとCYP1A1 Ile462Val遺伝子多型の組み合わせにおいて、バリニアレルを有する群で、ダイオキシン類による子宮内膜症のリスクがむしろ低いという傾向が観察された。また、尿中ビスフェノールAの分析法を確立し、分析を行った。

研究協力者  
岩崎 基 国立がんセンター・がん  
予防・検診研究センター  
予防研究部・研究員

の発生に関連するか否かを疫学的に検証することを目的として、既存の前向きコホート研究(厚生労働省研究班による多目的コホート研究)において収集された保存生体試料を用いたコホート内症例対照研究を行う。

A. 研究目的

有機塩素系化合物などの化学物質にはエストロゲンレセプター、アンドロゲンレセプターに親和性があるものが認められるため、日常生活環境における有機塩素系化合物などの化学物質曝露がホルモン関連腫瘍

今年度は平成14年度から平成16年度の研究計画に引き続き、既存の前向きコホート研究において収集された保存生体試料を用いた乳がんのコホート内症例対照研究をすすめる。また新たに前立腺がんのコホート内症例対照研究を開始する。



子宮内膜症の症例対照研究については、平成14年度から平成16年度の研究計画において分析が終了している血清中ダイオキシン類とPCB類、尿中イソフラボン類、エストロゲン合成・分解に関与する遺伝子多型やエストロゲンレセプターなどの遺伝子多型のデータを用いて、環境要因と遺伝的要因の相互作用の検討を行う。さらに尿中ビスフェノールAの分析法の検討を行い、分析を開始する。

## B. 研究方法

### 1. 乳がんのコホート内症例対照研究

#### (1) 対象者

岩手県二戸、秋田県横手、長野県佐久、沖縄県中部(以上、1990年開始のコホートI)、茨城県水戸、新潟県柏崎、高知県中央東、長崎県上五島、沖縄県宮古、大阪府吹田市(以上、1993年開始のコホートII)の10保健所管内に研究開始時点に在住していた女性地域住民67521人(40~69歳)のうち、ベースライン調査の質問票に回答しかつ血液検体の提供のあった者から、追跡開始後に判明した不適格者(外国人、調査開始前の転出者、対象年齢外の者、重複登録者)、乳がんまたは卵巣嚢腫の既往がある者を除外した24226人を研究対象者とした。

本研究の症例は、ベースライン調査後から2002年12月31日までの追跡期間中に組織学的に診断された初発の乳がん患者のうち、ベースライン調査の質問票に回答しかつ血液検体の提供のあった144人である。対照は、研究対象者24226人のうち症例の乳がん発症日(診断日)の時点で乳がんにかかっていない者から、症例と年齢が±3歳以内、管轄保健所が一致、市部または郡部在住が一致、採血年月日が±90日以内、採血時間が±3時間以内、空腹時間が±3時間以内、閉経状況が一致する条件でマッチングし、条件にあう対象者の中からさらに無作為に2名を選び対照とした。

#### (2) 調査方法

ベースライン調査(生活習慣アンケート調査、血液の採取・保存)およびフォローアップ調査(異動、死亡、疾病罹患の把握)は、「厚生省コホート研究班コホートI実施要綱」「厚生省コホート研究班コホートII実施要綱」「多目的コホートによるがん・循環器疾患の疫学研究 研究計画書 平成13年度改訂版」(国立がんセンター倫理審査委員会平成13年10月承認)に基づいて実施してきた。

#### (3) 測定対象物質

血漿中エストラジオール、性ホルモン結合グロブリン。血漿中イソフラボノイド、有機塩素系農薬類。

#### (4) 解析方法

測定対象物質の曝露量による乳がん罹患リスク(相対危険度)をConditional logistic modelを用いて検討する。必要に応じて多変量解析を行い、交絡要因を調整する。また、期間(採血時期から乳がん発症まで)で層別化した解析を行う。

#### (倫理面への配慮)

研究プロトコールは、国立がんセンター倫理審査委員会において平成15年5月22日に承認された。

研究計画全体については国立がんセンター倫理審査委員会で平成13年10月18日に承認されている。また、パンフレットやニュース・レター、インターネット・ホームページを通じて、具体的方法などについて研究対象者個人および広く社会に広報している。血液検体については主として1990年から1994年にかけてすでに収集されているが、対象者に対してすべての地域で説明文書の個別配布、保健所職員による口頭説明、あるいは説明文書の掲示もしくは配布によって説明を行った。一部地域(秋田横手、沖縄石川、大阪吹田)は同意書を用いて被験者本人の署名を得た。他の地域でも口頭による同意は受けている。

追跡調査によって収集される死亡・住所

異動・疾病罹患などの個人情報や既に収集されている生活習慣・健康診査・血液などの個人情報については、厚生労働省多目的コホート研究班・個人情報保護安全管理措置マニュアルに従って、コホート研究対象者に危険・不利益が及ばないように厳格に管理する。解析は、個人識別情報を外したデータを用いて集団として統計的な解析を行う。

## 2. 前立腺がんのコホート内症例対照研究

### (1) 対象者

岩手県二戸、秋田県横手、長野県佐久、沖縄県中部(以上、1990年開始のコホートⅠ)、茨城県水戸、新潟県柏崎、高知県中央東、長崎県上五島、沖縄県宮古、大阪府吹田市(以上、1993年開始のコホートⅡ)の10保健所管内に研究開始時点で在住していた男性地域住民678721人(40～69歳)のうち、ベースライン調査の質問票に回答しかつ血液検体の提供のあった者から、追跡開始後に判明した不適格者(外国人、調査開始前の転出者、対象年齢外の者、重複登録者)、前立腺がんの既往がある者を除外した14041人を研究対象者とした。

本研究の症例は、ベースライン調査後から2005年12月31日までの追跡期間中に診断された初発の前立腺がん患者のうち、ベースライン調査の質問票に回答しかつ血液検体の提供のあった162人である。対照は、研究対象者14041人のうち症例の前立腺がん発症日(診断日)の時点で前立腺がんにかかっていない者から、症例と年齢が±3歳以内、居住地が市町村レベルで一致、採血年月日が±90日以内、採血時間が±3時間以内、空腹時間が±3時間以内の条件でマッチングし、条件にあう対象者の中からさらに無作為に2名を選び対照とした。

### (2) 調査方法

ベースライン調査(生活習慣アンケート調査、血液の採取・保存)およびフォローアップ調査(異動、死亡、疾病罹患の把握)は、「厚

生省コホート研究班コホートⅠ実施要綱」「厚生省コホート研究班コホートⅡ実施要綱」「多目的コホートによるがん・循環器疾患の疫学研究 研究計画書 平成13年度改訂版」(国立がんセンター倫理審査委員会平成13年10月承認)および「多目的コホートによるがん・循環器疾患の疫学研究 研究計画書 平成13年度改訂・平成16年度修正版」(国立がんセンター倫理審査委員会平成16年7月承認)に基づいて実施してきた。

### (3) 測定対象物質

血漿中テストステロン、ジヒドロテストステロン、性ホルモン結合グロブリン。血漿中イソフラボノイド、有機塩素系農薬類など。

### (4) 解析方法

測定対象物質の曝露量による前立腺がん罹患リスク(相対危険度)をConditional logistic modelを用いて検討する。必要に応じて多変量解析を行い、交絡要因を調整する。また、期間(採血時期から前立腺がん発症まで)で層別化した解析を行う。

(倫理面への配慮)

研究プロトコールは、国立がんセンター倫理審査委員会において平成18年1月26日に承認された。

研究計画全体については国立がんセンター倫理審査委員会にて平成13年10月(改訂版)及び平成16年7月(修正版)がそれぞれ承認されている。また、パンフレットやニュース・レター、インターネット・ホームページを通じて、具体的方法などについて研究対象者個人および広く社会に広報している。血液検体については主として1990年から1994年にかけてすでに収集されているが、対象者に対してすべての地域で説明文書の個別配布、保健所職員による口頭説明、あるいは説明文書の掲示もしくは配布によって説明を行った。一部地域(秋田横手、沖縄石川、大阪吹田)は同意書を用いて被験者本人の署名を得た。他の地域でも口頭による同意は受けている。

追跡調査によって収集される死亡・住所異動・疾病罹患などの個人情報や既に収集されている生活習慣・健康診査・血液などの個人情報については、厚生労働省多目的コホート研究班・個人情報保護安全管理措置マニュアルに従って、コホート研究対象者に危険・不利益が及ばないように厳格に管理する。解析は、個人識別情報を外したデータを用いて集団として統計的な解析を行う。

### 3. 子宮内膜症の症例対照研究

#### (1) 調査対象者および調査方法

症例および対照は東京慈恵会医科大学産婦人科で収集した、不妊症治療を目的として受診した20～45歳の未経産婦で、腹腔鏡検査を行った全員を把握、登録し、研究参加に同意した者を研究対象者とした。症例は、腹腔鏡検査によって子宮内膜症Stage II以上(AFS1985の基準に従う)と診断された者であり、ただし、妊娠3ヶ月以上の妊娠経験者は除いた。対照例は、腹腔鏡検査によって子宮内膜症Stage I以下と診断された者とした。ただし、この場合も妊娠3ヶ月以上の妊娠経験者は除いた。出産と授乳は内分泌系に影響をおよぼすため、対象者についても出産と授乳の経験がないことを条件とした。

不妊治療または腹腔内視鏡検査以前の時期に採血(約40 mL)と採尿(約30 mL)を行った。採血・採尿と同時期に面接による質問票調査を行った。

血清中ダイオキシン濃度に差がみられた場合に、それを確認する目的で脂肪組織中のダイオキシン量の測定を行う。このために、腹腔鏡下に脂肪組織も採取した。腹腔鏡検査は研究目的ではなく、主治医の判断で診断あるいは治療目的で行われるものであり、脂肪組織の採取を含む説明と同意は腹腔鏡検査前に行った。患者が検査の前に同意した場合のみ、脂肪組織を腹腔鏡検査中に採取した。

また、血液および尿採取の性周期における時期を確認するために、治療目的のために記録された調査時期の基礎体温データを、患者が検査の前に同意した場合に収集した。

#### (2) 分析対象物質と分析方法

##### 血清中のダイオキシン類

(PCDDs/PCDFs/cPCBs) 22種類、PCB類36種類、有機塩素系農薬11種の分析は、米国疾病管理予防センター傘下の国立環境保健研究所において行った。分析項目の内訳と分析方法については、平成14年度に報告したとおりである。

尿中イソフラボノイド(ダイゼイン、ゲニステイン、グリシテイン、イコール)の分析は高速液体クロマトグラフィー電気化学検出器で行った。

尿中ビスフェノールAの分析は、高速液体クロマトグラフィー・タンデム型質量分析法(LC-MS/MS)で行った。

エストロゲン合成・分解に関与する遺伝子多型やエストロゲンレセプターなどの遺伝子多型の解析は、被検者の末梢血よりゲノムDNAを抽出し、PCR-RFLP法にて行った。分析項目の内訳は、平成16年度に報告したとおりである。

##### (倫理面への配慮)

本研究は、日本および米国の関連4施設(東京慈恵会医科大学、国立がんセンター、国立環境研究所、米国疾病管理予防センター)の倫理委員会で研究が承認され、かつ日本側の研究機関と米国の間でProject Assuranceが取り交わされた。また全研究対象者に文書と口頭で研究の説明を行い、文書により研究参加の同意を得た。

### C. 研究結果

#### 1. 乳がんのコホート内症例対照研究

今回分析するサンプルと同時期に採血された匿名化血液を利用して、血漿中イソフラボノイドについて長期保存の影響を検討し

た。その結果、長期保存によりレベルが低減することが確認されたが、症例対照間の比較は可能であるため、分析を開始し434検体の測定を終えた。また、微量サンプルでの有機塩素系化合物分析のための予備実験を開始し、500マイクロリットルでの分析が可能であることが確認できたので分析を開始した。

## 2. 前立腺がんのコホート内症例対照研究

乳がんのコホート内症例対照研究の研究計画に準じて研究計画を作成し、国立がんセンター倫理審査委員会に申請を行った。平成18年1月26日に承認が得られたので(添付資料)、対照者の選択をマッチング条件に基づいて行い、サンプルを準備した。

## 3. 子宮内膜症の症例対照研究

これまでに分析が終了している血清中ダイオキシン類(PCDDs/PCDFs/cPCBs)とPCB類、尿中イソフラボン類、エストロゲン合成・分解に関与する遺伝子多型やエストロゲンレセプターなどの遺伝子多型のデータを用いて、環境要因と遺伝的要因の相互作用の検討を行った。

尿中イソフラボン、ER  $\beta$  Rsa I 遺伝子多型と子宮内膜症の関連を検討したところ(図1)、尿中イソフラボン単独では、尿中ゲニステインレベルが高いほど子宮内膜症のリスクが低いという関連が見られたが、ER  $\beta$  Rsa I 遺伝子多型の違いだけでは子宮内膜症のリスクに有意な差は観察されなかった。しかし両者の組み合わせにおいては、Large Rアレルを有する群において、ゲニステインによる子宮内膜症のリスクが特に低いという関連が観察された。

血清中ダイオキシン類、CYP1A1 Ile462Val遺伝子多型と子宮内膜症の関連を検討したところ(図2)、血清中ダイオキシン類と子宮内膜症の間には有意な関連が見られず、またCYP1A1 Ile462Val遺伝子多型の

違いだけでは子宮内膜症のリスクに有意な差は観察されなかった。しかし両者の組み合わせにおいては、バリンアレルを有する群で、ダイオキシン類による子宮内膜症のリスクがむしろ低いという傾向が観察された。

これらの知見について、現在、論文にまとめ投稿中である。

尿中ビスフェノールAと子宮内膜症の関連を検討するために、固相抽出-安定同位体希釈LC-MS/MS法を用いて、濃度測定を可能にする条件を検討し、分析法バリデーションを行い、その上で子宮内膜症の症例対照研究の対象者の尿検体を測定した。

操作ブランクのないバッチでは、1 ng/mL標準溶液の繰り返し6回測定の定量値の標準偏差の3倍を装置検出下限値(LOD)としたときLOD = 0.3 ng/mLであり、標準偏差の6倍を定量下限値(LOQ)としたときLOQ = 0.6 ng/mLであった。操作ブランクの観察されたバッチでは、操作ブランク値の標準偏差の3倍をLOD、6倍をLOQとした。このとき、LOD = 0.37 ng/mL、LOQ = 0.75 ng/mLであった。

精度管理用コントロール標準(QC試料)を同一バッチ内で測定した定量値の同時再現性はCV = 8.8% (n = 5)、サロゲート物質の回収率の平均値は72%であった。図3のように相異なる5バッチにおいて繰り返し測定した際の日差再現性はCV = 19%、検量線(0.6-20 ng/mL)の相関係数は $r = 0.995-0.999$ であった。

子宮内膜症のStage 0, Iの対象者を対照群(n=80)、Stage II-IVの対象者を症例群(n=58)と定義し、対数変換後の値を用いて、症例と対照における尿中ビスフェノールA濃度の分布をグラフにした(図4)。平均値(標準偏差)は、症例群が0.24 (0.49)、対照群は0.14 (0.46)であり、2群間に有意な差は観察されなかった。

## D. 考察

有機塩素系化合物などの化学物質に焦