

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-一般-014)

平成18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19 (2007) 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	—— 19
2. 前立腺がんの症例対照研究 加藤 貴彦	—— 48
3. 乳がんの症例対照研究 岩崎 基	—— 57
4. 健康影響に関する疫学研究の文献的検討 坪野 吉孝	—— 76
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	—— 80
IV. 研究成果の刊行物・別刷	—— 82

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と前立腺がんのコホート内症例対照研究を行った。乳がんのコホート内症例対照研究については微量サンプルでの有機塩素系農薬分析のための予備実験を行い、血漿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た後に分析を開始し、432検体の分析を終え、予定していた項目の分析がすべて終了した。また前立腺がんのコホート内症例対照研究は、症例対照のデータセットを作成し、内因性ホルモンの分析を開始した。

平成13年度に開始した乳がんの症例対照研究は、平成17年度に症例対照の収集を終了し、血清中有機塩素系農薬類とポリ塩化ビフェニル(PCB)類の分析、末梢血からのDNAを抽出、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遺伝子多型の解析を開始した。今年度はこれらの生体試料の分析を引き続き行うとともに得られたデータに基づき解析を行った。有機塩素系化合物の分析では、農薬9種類とPCB類41ピークの分析が終了した。また遺伝子多型の解析では40遺伝子60種類について解析が終了した。このうち有機塩素系農薬類とPCB類について乳がんリスクとの関連を予備的に検討したところ、いずれも統計学的に有意なリスク上昇は観察されなかった。むしろ高濃度群のオッズ比は1よりも小さく、負の関連を示す物質が多く見られた。

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19年2月時点で、前立腺がん症例200例、対照990例を収集した。また解析候補遺伝子の検討のため、過去に収集された症例対照研究のデータを用い、遺伝子多型と発がん感受性との関連について予備的な検討を行った。

子宮内膜症の症例対照研究では、平成17年度に分析法を確立し、分析を行った尿中ビスフェノールA濃度と子宮内膜症との関連を検討した。尿中ビスフェノールA濃度の実測値、クレアチニン補正值、平均一日摂取量推定値のいずれにおいても統計学的に有意なリスク上昇は観察されなかった。さらに、尿中カドミウム濃度、尿中フタル酸モノエステル類濃度との関連を検討するために、尿中カドミウムの分析を(独)労働者健康福祉機構・東京労災病院産業中毒センターに委託し、また尿中フタル酸モノエステル類の分析法の検討を開始した。

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っている。今年度は、内分泌かく乱化学物質の健康影響を評価する際の因果関係評価の方法論を検討した。喫煙の健康影響に関する2004年米国公衆衛生総監報告書と内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する2002年の

International Programme on Chemical Safety報告書における、因果関係の判定規準の適用状況を、Parascandolaらの方法を援用して検討した。その結果、因果関係の方法論と実際の適用状況との間に乖離が認められ、さらに、判定規準と矛盾する知見が支配的であるにもかかわらず因果関係が肯定される場合もあることが明らかになった。内分泌かく乱化学物質のヒト健康影響を明らかにするためには、個別の疫学研究の積み重ねに加えて、因果関係評価の方法論を整備し、その方法論を系統的に適用することの重要性が示唆された。

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・室長

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
 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
 伊藤弘明 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・リサーチレジデント

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いつつ、内分泌かく乱化学物質の健康影響を評価する際の因果関係評価の方法論を検討する。

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。血漿中インフラボン、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で在住していた男性地域住民65801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14203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201人である。対照は、研究対象者14203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る者から、症例と年齢が ± 3 歳以内、居住地が市・郡で一致、採血年月日が ± 60 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、性ホルモン結合グロブリン。血漿中イソフラボン、有機塩素系農薬類、ポリ塩化ビフェニル(PCB)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)と居住地域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7ml EDTA2Na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

血清中有機塩素系農薬類とポリ塩化ビフェニル(PCB)類の分析項目を決めるために、解析除外検体を用いて予備分析を行った。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、*o,p'*-DDT、*p,p'*-DDT、*p,p'*-DDE、*trans*-Nonachlor、*cis*-Nonachlor、Oxychlorane、Hexachlorobenzene (HCB)、Mirex、 β -Hexachlorocyclohexane (β -HCH) の9種類であった。またPCB類は3~10塩素化物のうち41 peaks: #17、#28、#51、#52/#69、#43/#49、#48/#47、#44、#74、#66、#77、#90/#101、#99、#123、#118、#114、#105、#126、#146、#153、#164/163、#138、#128/162、#167、#156、#169、#182/#187、#183、#174、#177、#180、#170、#189、#202、#201、#198/#199、#196、#203、#194、#208、#206、#209を測定対象物質とした。

分析は島津テクノロジーに委託し、以下の方法で分析され、濃度測定結果を受け取った。血清 約1.5 gに¹³C 標識体をクリーンアップスパイクとして添加し、分画・精製操作(液液抽出・フロリジルカラムクリーンアップ)を行い、濃縮後、PCBsについては¹³C 標識体のシリジンスパイクを添加した。ガスクロマトグラフ・高分解能質量分析計を用いて、分解能10,000以上で測定、天然同位体存在比の理論値に照らして目的物質を確実に同定している。キャピラリーカラムを用いてガスクロマトグラフィー上で分離し、¹³C 標識体との

ピーク面積比で定量した。分析者は症例・対照の検体のペアを症例・対照交互に分析し、どちらが症例(対照)であるかは知らされない。分析値の変動は20%程度という。濃度によると思われる。S/N=3となる濃度を検出下限値とした。DDT等農薬類では 1.0 pg/g wet、PCB 各コンジェナーでは 0.6 pg/g wet であった。

次に、血清中総脂質濃度をPhilips et al. (1)の血清中総脂質濃度予測式(総脂質濃度 (mg/dL) = 2.27 × 総コレステロール + 中性脂肪 + 62.3)を用いて計算した。血清中総コレステロール濃度 (mg/dL) と中性脂肪濃度 (mg/dL) は京都の臨床検査機関が行った。この血清中総脂質濃度予測値を比重 (g/mL; 個別に実測) で除して個別の血清中総脂質濃度 (%; w/w) を推定し、血清中有機塩素系化合物濃度の粗測定値 [pg/g wet] を除して、脂質1 g当たりの量 (ng/g lipid) に補正した。

遺伝子多型のタイピングに用いたgenomic DNAは、末梢白血球からQIAGEN FlexiGene[®] DNA Kitsを使って抽出した。全部で40遺伝子60種類の遺伝子多型についてGenetic Lab.社に依頼してタイピングを行った。60種類の遺伝子多型中58種類の多型についてはTaqMan[®] SNP Genotyping Assaysによりタイピングを行った。タイピングに用いた各プライマー及びプローブはApplied Biosystems社に設計を依頼し、合成されたものを使用した。残り2種類(GSTM1及びGSTT1)の欠損型の検出はMultiplex PCR法により行った。

2-5. 解析方法

今年度は、分析が終了した血清中有機塩素系化合物と乳がん罹患リスクとの関連を検討した。対照群の分布の四分位点に基づいて対象者を4群に分け、SAS 9.1.3のPHREGプロシジャを用いて条件付ロジスティック回帰分析を実行し、オッズ比と95%信頼区間を算出し、さらに傾向性の検定を行った。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の中から、先行研究でよく考慮される変数を中心に交絡要因を選出し、条件付ロジスティック回帰分析で調整した。また、各カテゴリの中央値を四分位数に代入した四値変数に対して、乳がん罹患オッズ比の直線的単調性を別に検討した。

(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

前立腺がんと内分泌かく乱化学物質(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で、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症例数は、500例である。目標症例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、ホルモンレセプタ

一、遺伝子脆弱性に関与する遺伝子の多型を分析し、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316名の尿路上皮がん患者と361名の対照者を用い、収集終了後に分析する候補遺伝子について検討する。今年度はDNA修復酵素について文献検索し、代表的な除去修復酵素であるXPD(*xeroderma pigmentosum group D*) 遺伝子多型と尿路上皮がんとの関連性について検討した。解析したXPDの遺伝子多型サイトはExon 6、Exon 10、Exon 23の3箇所である。統計解析にはSPSS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。症例と対照の定義は、腹腔鏡検査によって診断されたStage分類(AFS1985の基準に従う)に基づき研究ごとに設定した。ただし、妊娠3ヶ月以上の妊娠経験者は除いた。ま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

ビスフェノールA (BPA) の個人曝露量の指標として尿検体(主として起床後第一尿)中のBPA濃度を用いた。BPAはII相反応を受け、ヒト尿中では硫酸抱合体・グルクロン酸抱合体または遊離体として存在している。これらを加水分解酵素で脱抱合して遊離体の総濃度として測定することで、曝露量と対応付けることができる。

尿検体を解凍、0.2 mLを分取し、BPAの重水素置換体BPA-d₁₆と*Helix pomatia*由来の加水分解酵素β-glucuronidase/sulfataseを添加して脱抱合後、固相抽出(Varian FOCUS VersaPlate Tube 10 mg/1.8 mL)で精製し、高速液体クロマトグラフ(SHIMADZU LC-10AD_{VP}ほか一式)とタンデム型質量分析計(Applied Biosystems API 2000)を用いて安定同位体希釈法で測定した。20 μL注入における検出下限値は0.30-0.55 μg/L、検量線(0.6-20 μg/L)の相関係数は $r = 0.995-0.999$ 、2.4 μg/Lの実尿の分析における同時再現性はCV = 8.8%、同時再現性を含む五日間の日差再現性はCV = 19%であった。この濃度域はベースライン付近であり標準液の繰り返し注入すなわち機器分析のみでも同程度変動する。測定値

の変動は高濃度になれば小さくなり、低濃度では大きくなる。

尿中クレアチニン濃度の測定はSRLに委託して酵素法で測定した。

尿中カドミウム濃度の測定は、(独)労働者健康福祉機構・東京労災病院産業中毒センターを研究協力機関に加えるための研究計画の変更申請を行い、承認が得られたのちに同センターに委託した。尿中カドミウム濃度はカドミウムの長期曝露を反映することから、本研究では尿中カドミウム濃度をヒトのカドミウム曝露量の指標として用いることとした。カドミウムはヒト尿中ではメタロチオネイン等タンパクの結合体または遊離体として存在している。誘導プラズマ質量分析法(ICP-MS)では結合体を分解し、カドミウム遊離体の総濃度として検出する。カドミウムイオンには複数の同位体が存在する。存在比の大きさで有利なイオン(m/z 112や114)はSnイオンとも重なるため採用せず、モニターイオンは m/z 111とした。プラズマの温度を最適化することで一酸化モリブデンの妨害を無視することができる。測定には尿2 mLを使用する。本研究では採尿・保存容器は酸洗浄していない。尿中に共存する夾雑物による妨害の影響を低減するために、精製水で十倍希釈してマトリックス効果を低減、さらに標準添加法を用いて夾雑物の共存による感度の変化を補正した。分析の前検討と精度管理には米国NISTが配付している標準尿を用いた。

フタル酸エステル類の分析は、ジエステル体の代謝物(I相反応生成物)である尿中の各フタル酸モノエステル体を対象とした(米国CDCと同様)。フタル酸モノエステルはヒト尿中ではグルクロン酸抱合体または遊離体として存在している。国際外部精度管理事業(G-EQUAS)のパイロットプログラムから分与された標準物質と尿検体を用いて分析

条件(機器分析および前処理)を検討した。

G-EQUASの標準物質と尿検体にはフタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)とフタル酸ジイソノニル(DINP)の二次代謝物数物質およびフタル酸モノイソブチル(MiBP)とフタル酸モノ-n-ブチル(MnBP)が入っていた。これらとそれぞれの重水素置換体をクロマトグラム上で分離・同定した。

機器分析には高速液体クロマトグラフ(Waters Alliance HT 2795)とタンデム型質量分析計(Micromass Quattro Ultima Pt)を用いた。機器分析条件は先行研究(2)と同様とし変更していない。ただし、装置の個体ごとにモニターイオンの質量数および選択反応検出(MRM)の諸条件は最適化が必要であるため、インフュージョンで最適な値を求め直して適宜変更した(掲載は省略)。

試料前処理は尿0.2 mLを用いて近年の先行研究(3)の方法を参考にして検討した。(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。

尿中カドミウム濃度を(独)労働者健康福祉機構・東京労災病院産業中毒センターに委託するため、同センターを研究協力機関に加えた研究計画の変更申請を行い、国立がんセンター倫理審査委員会の承認を得た。

5. 健康影響に関する疫学研究の文献的検討

内分泌かく乱化学物質のヒトに対する健康影響を評価する際には、因果関係を判断する方法論を整備することが重要である。疫学における因果関係の評価方法で最も影響

力を有するものの一つは、喫煙の健康影響に関する米国公衆衛生総監1964年報告書に示された、「一致性」「強固性」「特異性」「時間的前後関係」「整合性」からなる5項目の判定規準である。この判定規準は、世界の疫学研究や公衆衛生実践において広く用いられ、わが国の公害訴訟等においても参照された。こうした経緯を通して、曝露要因と疾病との因果関係を判断する際の、最も有力な方法論として定着した。

ところが近年、判定規準を提唱した当の報告書において、実際には肺がんの場合を除き5項目の規準が必ずしも系統的に適用されておらず、特に「時間的前後関係」と「特異性」についてはほとんど言及自体がないという注目すべき知見が、米国National Cancer InstituteのParascandolaらにより明らかにされた。

本研究では、まず、Parascandolaらによる1964年報告書の検討内容を吟味する。次に、1964年報告書以来40年ぶりに喫煙の健康影響を包括的に検討した2004年米国公衆衛生総監報告書と、内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する2002年IPCS(International Programme on Chemical Safety)報告書を取り上げ、因果関係評価の方法論の概要を明らかにする。さらに、これら二つの報告書における判定規準の実際の適用状況を、Parascandolaらの方法に倣って検証する。

次の3件の資料を検討対象とした。①喫煙の健康影響に関する1964年米国公衆衛生総監報告書における判定規準の適用状況を検討したParascandola論文(Parascandola M, et al. Emerging Themes in Epidemiology 2006;3:1)。②喫煙の健康影響に関する2004年米国公衆衛生総監報告書(U.S.Department of Health and Human Services, The Health Consequences of Smoking: A Report of the Surgeon General, 2004)。③内分泌かく乱化学物質の健康影

響に関する2002年IPCS報告書
(International Programme on Chemical
Safety. Global Assessment of the
State-of-the-Science of Endocrine Disruptors,
2002)。①の方法論を援用して、②と③にお
ける因果関係の判定規準の適用状況を吟
味した。

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

微量サンプルでの有機塩素系農薬分析
のための予備実験を行い、血漿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
た後に分析を開始し、432検体の分析を終え
た。これで予定していた項目の分析がすべ
て終了した。分析項目は、内因性ホルモンと
して、総エストラジオール、フリーエストラ
ジオール、性ホルモン結合グロブリン、イソフ
ラボン類としてゲニステイン、ダイゼイン、有機
塩素系農薬として、 β -hexachlorocyclohexane
(β -HCH)、Hexachlorobenzene (HCB)、
Dichlorodipenyldichloroethylene
(*p,p'*-DDE)、Dichlorodipenyltrichloroethane
(*p,p'*-DDT)である。

(2) 前立腺がんのコホート内症例対照研究

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、内因性ホルモン
(血漿中テストステロン、性ホルモン結合グロ
ブリン)の分析を開始した。また、微量血漿
サンプルでの有機塩素系農薬類とPCB類の
分析に関しての予備実験を開始した。

2. 乳がんの症例対照研究

2-1. 有機塩素系化合物と乳がんの関連

操作ブランクの有無にかかわらずS/N=3
以上のピークを検出とした場合、100%検出
された物質は、有機塩素系農薬9種類と
PCB類41ピーク中26ピークであった。

各有機塩素系化合物の血清中濃度を症
例対照間で比較した結果、ほとんどすべて
の物質で統計学的に有意に症例群に比べ
て対照群における濃度が高かった。逆に有
意な差が見られなかった物質は、*p,p'*-DDE、
HCB、 β -HCH、TeCB51、TeCB43/49、
TeCB74、PeCB123、PeCB118、PeCB126、
HxCB167、HxCB169、HpCB174、OCB201、
OCB198/199、OCB196であった。

血清中有機塩素系化合物濃度同士の相
関を検討したところ、互いに高い相関のもの
が多く見られた。個々のPCBコンジェナー間
の相関係数も含めると、0.7以上の相関係数
が半数近くあり、0.8以上が3割あった。

今回検討した有機塩素系農薬類9種類と
PCB類に関して、いずれも乳がんリスクの上
昇と統計学的に有意に関連している物質は
見られなかった。むしろ高濃度群のオッズ比
は1よりも小さく、負の関連を示す物質が多く
見られた。有機塩素系農薬では、Mirexが乳
がんリスクの低下と有意に関連しており、最
低濃度群に対する最高濃度群の多変量調
整オッズ比(95%信頼区間)は0.42
(0.20-0.91)であり、傾向性の検定におけるp
値は0.02であった。またPCB類に関しては、
総濃度で検討した場合に統計学的に有意
な負の関連が観察された。最低濃度群に対
する最高濃度群の多変量調整オッズ比
(95%信頼区間)は0.31(0.13-0.74)であり、
傾向性の検定におけるp値は0.007であった。
さらに塩素数ごとに検討したところいずれも
負の関連が見られたが、統計学的に有意で
あったのはHxCBs、HpCBs、OCBs、NCBsで
あった。コンジェナー別の検討は、TrCBsを
除き検出頻度が99%以上の物質(29物質)
について行った。統計学的に有意な負の関
連が観察されたコンジェナーは、TeCB48/47、
PeCB90/101、PeCB114、HxCB146、
HxCB153、HxCB164/163、HxCB156、
HpCB182/187、HpCB177、HpCB180、
HpCB170、HpCB189、OCB202、

OCB198/199、OCB196、OCB203、OCB194、NCB208、NCB206であり、塩素数が多いコンジェナーに多くみられた。

2-2. 遺伝子多型のタイピング

今回の解析対象の40遺伝子60種類の遺伝子多型のうち、ESR2 (rs928554)とADH2 (rs1229984)は、Hardy-Weiberg平衡が $P < 0.05$ であった。

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19年2月時点で、前立腺がん症例200例、対照990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

316名の尿路上皮がん患者と361名の対照者について、XPD遺伝子多型と尿路上皮癌との関連性について検討した。解析したXPDの遺伝子多型サイトはExon 6、Exon 10、Exon 23の3箇所である。全体の解析では、尿路上皮がんといずれの多型サイト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、Exon 10 G/A 遺伝子型保有者のがん患者群における頻度は11.1%で、対照群における5.4%とのあいだに有意な差がみられた(オッズ比:2.22、95%信頼区間:1.02-4.84)。そこで、関連性が認められたExon 10 G/A 遺伝子型と喫煙との関連性をより詳細に解析するために、喫煙量によって両群を3群に層化し解析を試みた。その結果、40パック年以上のheavy smoker群において、がん患者群における頻度は11.1%で、オッズ比3.83(95%信頼区間:1.05-13.97)と統計学的に有意な上昇が観察された。

4. 子宮内膜症の症例対照研究

4-1. 尿中BPAと子宮内膜症の関連

子宮内膜症stage 0, Iを対照群とし、stage II-IVを症例群として、尿中BPA濃度分布の四分位点に基づいて対象者を4群に分けた。ロジスティック回帰分析を用いて最低濃度群に対する子宮内膜症のオッズ比を算出した。統計解析は、SAS 9.1.3のLOGISTプロシジャを用い、有意水準5%のもとで検定を行った。

尿中BPA濃度の実測値、クレアチニン補正值、平均一日摂取量推定値のいずれにおいても統計学的に有意なリスク上昇は観察されなかった。クレアチニンで補正したBPA濃度の第1四分位に対する第2、第3、第4四分位の多変量調整オッズ比(95%信頼区間)は、0.9(0.3-2.7)、2.5(0.8-7.4)、1.7(0.6-4.8)で、傾向性の検定のp値は0.19であった。

次に、結果の頑健さを確認するために諸条件を変更して再解析を行った。いずれにおいても多少オッズ比は変化しても少なくとも5%水準で有意な単調性で用量反応関係は観察されなかった。質問票のない人(n=9)を含めた場合、尿中BPA濃度測定値[$\mu\text{g/L}$]を曝露指標とし、尿中クレアチニン濃度を共変量として調整した場合、尿中BPA濃度測定値[$\mu\text{g/L}$]や平均一日BPA摂取量推定値[$\mu\text{g/kg/day}$]を曝露指標とした場合、子宮内膜症のstage 0を対照、stage III, IVを症例と定義した場合、そしてBPAの四分位数の代わりに三分位数を曝露変数とした場合でも同様であった。

4-2. 尿中フタル酸モノエステル類

DEHPの一次代謝物(MEHP)とその酸化代謝物(5OH-MEHP, 5oxo-MEHP, 5cx-MEPP)、DINPの二次代謝物(OH-MiNP, oxo-MiNP, cx-MiNP)、MiBPとMnBPのピーク形状と分離状況はクロマトグラムの通りである。各ピークの半値全幅は5-6秒程度であった。次に、尿中からフタル酸モノエステル類を固相抽出した試料を分析したところ、ピーク、形状とも良好なクロマトグラ

ムが得られた。

5. 健康影響に関する疫学研究の文献的検討

5-1. 喫煙の健康影響に関する1964年米国公衆衛生総監報告書に対するParascandolaらの検討

Parascandolaらは、報告書が検討している各種疾患の中から、判定規準を適用して評価を行うに足るだけの十分な研究の蓄積があると判断した4部位のがん(肺がん、喉頭がん、食道がん、膀胱がん)を取り上げ、個別の規準をどのように適用しているかを調査した。なおその際、他の判定規準と比べ多義的な要素を含む「整合性」の規準については、「量反応関係」「生物学的妥当性」「疫学的動向」の三要素に分割した上で、それぞれの要素の適用状況を検討した。このうち「生物学的妥当性」については、さらに「動物実験と基礎研究」「ヒト病理学」「がんの局在」の三項目に分けて調査した。また「疫学的動向」として、喫煙率の動向(経時変化、性差、社会階層差など)と疾病頻度の動向との一致に関する検討の状況を調査した。

その結果、4部位のがんのうち男性の肺がんと喉頭がんについて、喫煙との因果関係を認める結論的判断が行われていた。一方、食道がんと膀胱がんについては因果関係の存在を留保する結論だった。

これらの結論的判断を行う際の、5項目の判定規準に対する言及や考慮の状況を見ると、「一致性」「強固性」「整合性」の3項目に相当する事項については、4部位のがんの全てで言及され考慮されていた。ところが、「時間的前後関係」「特異性」の2項目については、肺がんで言及されるのみで、他の三部位のがんでは言及がなかった。

5-2. 喫煙の健康影響に関する2004年米国公衆衛生総監報告書に対する検討

Parascandolaらの検討と同様の方法を用いて、2004年報告書における判定規準の適

用状況を調査した。報告書が喫煙との関連を吟味している多数の疾患の中から、より以前に刊行された一連の公衆衛生総監報告書では因果関係の存在を認める判断が行われず、今回の報告書で初めて因果関係の存在を結論づけた5部位のがん(膵がん、急性骨髄性白血病、腎がん、子宮頸がん、胃がん)を、調査対象として選択した。

その結果だが、まず、報告書における判定規準の適用に関する記述の全般的な形式について述べる。2004年報告書では、個別疾患に関する記述の際に、「先行の公衆衛生総監報告書の結論」「生物学的基礎」「疫学的根拠」「科学的根拠の総合」「結論」「意義」という共通の項目立てを採用している。判定規準の吟味に相当する内容は、このうち主として「科学的根拠の総合」の項に記述されており、「疫学的根拠」や「生物学的基礎」などにも記述が見られる。ただし、今回調査した5部位のがんのいずれでも、5項目の判定規準を順番の一つずつ取り上げながら、その規準が満たされるか否かを判断するような形式の、系統的な記述は行われていなかった。むしろ、判定規準の吟味に相当する内容とその他の内容が混在し、個々の判定規準に関連する言及の順序や精粗も疾患ごとに異なるという、系統性に乏しい記述形式であった。

続いて、個々の判定規準に対する言及の有無を見ると、「特異性」については5部位のがんのいずれにもまったく言及がなかった。「時間的前後関係」については、膵がんで言及されるのみで、他の4部位のがんでは言及がなかった。一方、「一致性」「強固性」「整合性」の三規準については、5部位のがん全てで言及されていた。

もっとも、判定規準に該当する事項への言及が認められる場合でも、規準を満たす方向ばかりではなく、規準と矛盾する方向の記述が見られる場合もある。5つのがん部位のうち、この点で最も特徴的なのは胃がんで

ある。具体的には、5項目の判定規準の中で明瞭に条件を満たしているのは「一致性」のみに限られていた。「強固性」はむしろ薄弱で、「整合性」の構成要素にも矛盾や留保が存在し、「特異性」と「時間的前後関係」に至っては言及自体がなかった。にもかかわらず最終的には「因果関係の存在を結論する、十分な根拠がある」という結論が下されていた。つまり、判定規準と合致しない知見が多いにもかかわらず、因果関係を認める結論が導かれていた。

5-3. 内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する2002年IPCS報告書の検討

本報告書は、内分泌かく乱化学物質に関して、ヒト健康影響に限らず、ヒト以外の生物種に対する影響も含めて評価を行っている。報告書の提示する因果関係評価の方法論の枠組みを見ると、「仮説の言明」、「評価要因」、「全般的なエビデンスの強さ」の3部からなる。

このうち「評価要因」の構成要素として、判定規準に相当する次の5要因が示されている。すなわち、「時間性」「強固性」「一致性」「生物学的妥当性」「回復の知見」(Evidence of recovery)である。「回復の知見」とは、喫煙に関する報告書には存在しない判定規準であり、曝露要因の除去によって健康障害等の生体影響が回復することを示す知見である。また、喫煙に関する報告書に存在する「特異性」の基準は、除外されている。5項目の規準のそれぞれに対して、weak (*)からstrong(****)の5段階で評価がなされる。

総合評価にあたる「全般的なエビデンスの強さ」は、「関連性」(Relationship)と「機序」(Mechanism)の二つに分けられ、それぞれに対してweak, moderate, strongの3段階で評価がなされる。

報告書が提示する以上の方法論と、個別疾患の評価における評価の実際との一致程度を、子宮内膜症と乳がんを事例に取り上げて検討した。その結果、報告書の中でも

因果推論の方法論を提示した章では、2つの疾患に対して、5項目の規準全てに対する判定が付されていた。ところが、内分泌かく乱化学物質と個別の疾患との関連について詳細に論じた各論の章を見ると、5項目の規準を一つ一つ順番に取り上げて、規準がどの程度満たされているかを検証するような記述は見られなかった。

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、また検体量に限りがあるため微量化学分析法の検討が求められ、分析に時間を要した。乳がんのコホート内症例対照研究については、ようやく今年度に予定していた項目の分析がすべて終了し、乳がんリスクとの関連の検討を開始した。

乳がんの症例対照研究では、平成17年度に血清中有機塩素系化合物分析のための予備検討を開始し、今年度には808検体について、有機塩素系農薬9種類とPCB類41ピークの分析が終了した。操作ブランクの有無にかかわらずS/N=3となる濃度を検出下限値とした場合、HxCB128/162、PeCB123、OCB201、TeCB44、TeCB43/49、

HpCB174、TeCB51、PeCB126、HxCB169については、検出頻度が99%を下回った。

TeCB77はすべての検体から検出されなかった。通常検出されない珍しいPCBピークTeCB48/47が全検体から検出された。このピークは操作ブランクや容器ブランクからは検出されていない。3塩素化のTrCB17、TrCB28では操作ブランクが検出された。操作ブランク値がある場合、観察されたピークの大きさが $S/N \geq 3$ であったからといって、血清試料中にその物質があったのかなかったのか判断できない。操作ブランク値の大きさの変動と区別できるだけの大きさのピークが検出されているかどうかは別に検討を要する。

分析が終了した血清中有機塩素系化合物について、乳がんリスクとの関連を予備的に検討したところ、血清中有機塩素系化合物濃度が高い群ほど乳がんリスクが増加するような傾向は観察されなかった。むしろ物質によっては乳がんリスク低下と関連していた。閉経前後で層別解析した際も同様にオッズ比は増加しなかった。本研究で観察した血清 p,p' -DDEの濃度域(37~5,100 ng/g lipid)は先行研究の範囲内であった(4)。また、 p,p' -DDEと乳がんリスクの間には関連がない、とするメタアナリシスの結果に一致するものであった(4)。

今回の予備的な検討を通して改めて明らかになった解析上の問題点を以下に示す。測定対象項目が有機塩素系農薬9種類とPCB類41ピークと多項目にわたるため、乳がんリスクとの関連を検討する際には帰無仮説検定を繰り返すことになる。したがって、検定の多重性により偶然関連が見られるものもそれなりにあると考えるのが自然であり、5%有意水準は本研究においてはあくまでも目安と言える。また血清中有機塩素系化合物濃度同士は、多くが高度に相関していた。そして乳がんと強い関連を見せているものが多くあった。相互に相関の高い変数を同時に説

明変数として回帰式に入れても適切な結果が得られないことが知られており、過調整として避けるべきこととされている。残念ながら、現時点では相互に相関が高い多数の変数を考慮して適切にそれぞれの物質のリスクを解析・評価する方法はまだ存在しないようである。

今回の結果は予備的な解析によるものであり、今後、より詳細な検討を行う予定である。具体的には、年齢などの交絡要因による層別解析、乳がんが発現しているホルモンレセプターの状態別の解析、さらには遺伝子多型との交互作用の検討などである。遺伝子多型に関しては、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に、40遺伝子60種類の遺伝子多型の解析が終了した。これらのうち血清中有機塩素系化合物の生体内での作用を考慮し、関連する遺伝子多型との交互作用を検討する予定である。特にホルモンレセプターの状態別の解析や遺伝子多型との交互作用の検討により、有機塩素系化合物の乳がん発生に対するメカニズムを明らかにする上で重要な知見が得られる可能性がある。

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、進行状況をみると予想より登録数は少ない。しかし、今年度にはいり各施設のサンプリングシステムが確立されつつあり、今後は順調に登録がすすむことが期待される。

症例収集終了後の分析対象とする候補遺伝子選択を目的として、過去に収集され十分な症例数が確保された316名の尿路上皮がん患者と361名の対照者を用いパイロット研究を行った。今年度はDNA修復酵素について文献検索し、代表的なヌクレオチド除去修復酵素であるXPD遺伝子多型と尿路上皮がんとの関連性について検討した。その結果、喫煙者群、特にheavy smoker群にお

いて、*XPD Exon 10 G/A* 遺伝子型の尿路上皮がん罹患とのあいだに統計学的に有意な関連性が認められた。日本人における*XPD* 遺伝子と尿路上皮がんとの研究は本研究が初めてであるが、海外からはこれまでに5つの報告がある。そのなかで、Schabathら報告のみ、*Exon 23*と女性罹患尿路上皮がんでオッズ比1.69 (95%信頼区間:1.12-2.58) の有意な関連性が報告されている(5)。一方、本分担研究で収集している前立腺がんとの関連性については、USAと中国から2つのみの報告である(6,7)。コケージアンを対象としたUSAの症例対照研究では、*Exon 6*との有意な関連性が報告されている。

今回の研究結果から、喫煙者において*XPD Exon 10* の遺伝子多型は、尿路上皮がんの発癌感受性に関与していることが示された。日本人における*XPD* 遺伝子と尿路上皮がんとの研究は本研究が初めてであり、前立腺がんに関する報告にいたっては世界的みでも2報のみである。前立腺がんのサンプル収集終了後、前年度検討したEDCの代謝酵素に加え、EDCによって引き起こされるDNAダメージを修復機構に関与する蛋白質・酵素の遺伝子解析も進めていきたい。

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*AhR* 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。さらに環境要因と遺伝要因の交互作用に焦点を当てた解析を行い、ゲニステイン曝露とER

β Rsa I 遺伝子多型、ダイオキシン類曝露とCYP1A1 Ile462Val 遺伝子多型の間に交互作用を示唆する結果が得られている。

今年度はあらたに尿中BPAとの関連を検討したが、少なくとも5%有意水準下では、単調に直線的傾向を持った用量反応関係は見られず、尿中BPA濃度と子宮内膜症リスクとの間に関連はみられなかった。本研究で観察した尿中BPA濃度は平均一日経口BPA摂取量に換算すると2.8-192 ng/kg/dayであった。ちなみに動物実験ではラット経口投与200 mg/kg/day以上で子宮重量増加としてエストロゲン様作用が観察されている。

本研究は、グルクロン酸抱合体のみならず硫酸抱合体BPAの存在を考慮している点、交差反応が心配されるELISA法ではなく正確な機器分析法で測定している点、また、腹腔鏡検査によって症例・対照を確実に同定している点、断面調査(Consecutive sampling)によって選択バイアスを回避している点など、先行研究とは異なる研究手法上の利点が上げられる。一方、小標本ゆえに小さな効果は検出できない点、尿中BPA排泄量は短期曝露を反映し(8,9)、個人内変動が大きいことが知られている点(10)、曝露評価の測定誤差が相応の誤分類(nondifferential)を引き起こしていることが考えられ、それがひいてはnull resultにつながった可能性がある点などを考慮すると、結果の解釈には注意が必要である。また研究対象者が不妊外来受診者である点は、結果の一般化についても注意が必要であることを示唆している。

尿中フタル酸モノエステル類の分析においては、先行研究そのままのLC-MS/MS条件で良好な分離とピーク形状を得ることができた。DEHP代謝物のうち5cx-MEPPとDiNP代謝物の標準物質は市販されていないため現在は入手困難であるが、将来入手可能になった際に本研究の一斉分析法は利用可能である。尿から抽出した試料の分析時もピ

ークは形状・分離とも良好であった。効果的な試料前処理によって選択的に精製でき、低分子量域ながら標準溶液と同様の尿中夾雑物ピークの妨害を受けないクロマトグラムを得ることができた。今後、再現性を検討し、分析条件を確立する予定である。

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。また、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。平成17年度は、その後2004年10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のレビューを行った。今年度は、内分泌かく乱化学物質の健康影響を評価する際の因果関係評価の方法論を検討した。

喫煙の健康影響に関する2004年米国公衆衛生総監報告書と内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する2002年IPCS報告書における、因果関係の判定規準の適用状況を、Parascandolaらの方法を援用して検討した。その結果、1964年報告書と類似の判定規準が二つの報告書でも採用されているが、個別疾患における因果関係の判断に際しては、これらの判定規準は必ずしも系統的に使用されていなかった。すなわち、因果関係の方法論と実際の適用状況との間に、乖離が認められることが明らかになった。さらに、2004年報告書における喫煙と胃がんの事例のよ

うに、判定規準と矛盾する知見が支配的であるにもかかわらず因果関係が肯定される場合もあることが明らかになった。

内分泌かく乱化学物質や喫煙のような曝露要因と健康障害との因果関係を適切に判断するためには、①方法論の明示と、②明示された方法論の系統的な適用という二つの要素が満たされる必要がある。二つの報告書を見ると、このうち①については(判定規準そのものの妥当性は別にして)概ね満足されていたものの、②については十分満たされてはいなかった。内分泌かく乱化学物質のヒト健康影響を明らかにするためには、個別の疫学研究の積み重ねに加えて、因果関係評価の方法論を整備し、その方法論を系統的に適用することの重要性が示唆された。

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、予定していた項目の分析がすべて終了し、乳がんリスクとの関連の検討を開始した。また前立腺がんのコホート内症例対照研究は、症例対照のデータセットを作成し、内因性ホルモンの分析を開始した。乳がんの症例対照研究は、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終えた。また血清中有機塩素系農薬類とPCB類について乳がん罹患リスクとの関連を予備的に解析したところ、統計学的に有意な乳がんリスクの上昇は観察されなかった。子宮内膜症の症例対照研究では、尿中BPAとの関連を検討したが、統計学的に有意なリスク上昇は観察されなかった。因果関係評価の方法論を検討により、内分泌かく乱化学物質のヒト健康影響を明らかにするためには、個別の疫学研究の積み重

ねに加えて、因果関係評価の方法論を整備し、その方法論を系統的に適用することの重要性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

Iwasaki M, Yamamoto S, Otani T, Inoue M, Hanaoka T, Sobue T, Tsugane S for the JPHC Study Group. Generalizability of the relative-risk estimates for a health-conscious study group to the general population. *Eur J Epidemiol*. 2006;21:253-62.

Tsukino H, Hanaoka T, Sasaki H, Motoyama H, Hiroshima M, Tanaka T, Kabuto M, Turner W, Patterson DG Jr, Needham L, Tsugane S. Fish intake and serum levels of organochlorines among Japanese women. *Sci Total Environ*. 2006;15;359:90-100.

Pan G, Hanaoka T, Yoshimura M, Zhang S, Wang P, Tsukino H, Inoue K, Nakazawa H, Tsugane S, Takahashi K. Decreased serum free testosterone in workers exposed to high levels of di-n-butyl phthalate (DBP) and di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP): a cross-sectional study in China. *Environ Health Perspect*. 2006;114:1643-8.

Iwasaki M, Otani T, Inoue M, Sasazuki S, Tsugane S; for the Japan Public Health Center-Based Prospective Study Group. Body Size and Risk for Breast Cancer in

Relation to Estrogen and Progesterone Receptor Status in Japan. *Ann Epidemiol*. 2006 Dec 14; [Epub ahead of print]

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*. 2007;16:116-23.

Kurahashi N, Iwasaki M, Sasazuki S, Otani T, Inoue M, Tsugane S. Soy Product and Isoflavone Consumption in Relation to Prostate Cancer in Japanese Men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007 Mar 2; [Epub ahead of print]

Tsuchiya M, Miura T, Hanaoka T, Iwasaki M, Sasaki H, Tanaka T, Nakao H, Katoh T, Ikenoue T, Kabuto M, Tsugane S. Effect of soy isoflavones on endometriosis: interaction with estrogen receptor 2 gene polymorphism. *Epidemiology* (in press)

Iwasaki M, Mameri CP, Hamada GS, Tsugane S. Secular Trends in Cancer Mortality among Japanese Immigrants in the State of São Paulo, Brazil, 1979-2001. *Eur J Cancer Prev*. (in press)

Tsuchiya M, Tsukino H, Iwasaki M, Sasaki H, Tanaka T, Katoh T, Patterson DG Jr, Turner W, Needham L, Tsugane S. Interaction between cytochrome P450 gene polymorphisms and serum organochlorine TEQ levels in the risk of endometriosis. *Mol Hum Reprod*. (in press)

Tsuchiya M, Iwasaki M, Otani T, Nitadori J, Goto K, Nishiwaki Y, Uchitomi Y, Tsugane S. Breast cancer in first-degree relatives and risk of lung cancer: assessing the existence of gene-sex interaction. *Jpn J Clin Oncol*. (in

press)

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.

坪野 吉孝. 疫学における因果関係の判定規準—喫煙の健康影響に関する米国公衆衛生総監二〇〇四年報告書の検討—. *法学*2006;70:513-545.

2. 学会発表

倉橋典絵、岩崎基、笹月静、大谷哲也、井上真奈美、津金昌一郎. Body Mass index(BMI)、身長と前立腺がんリスク:多目的のコホート研究. 第7回日本がん分子疫学研究会・第29回日本がん疫学研究会合同学術集会 広島市. 2006.5

土谷雅紀、大谷哲也、後藤功一、西脇裕、内富庸介、津金昌一郎. 肺がんの発症における乳がんの家族歴と性別の交互作用の検討-肺がん症例データベースを用いた case-only study-. 第7回日本がん分子疫学研究会・第29回日本がん疫学研究会合同学術集会 広島市. 2006.5

岩崎 基、山本精一郎、大谷哲也、井上真奈美、花岡知之、祖父江友孝、津金昌一郎. 特定の集団を対象とした疫学研究における相対リスクの外的妥当性について. 第17回日本疫学会学術総会 広島市. 2007.1

渡邊昌俊、広川佳史、鈴木啓悦、市川智彦、加藤貴彦、杉村芳樹、白石泰三. Methylenetetrahydrofolate Reductase 及び Methionine Synthase 遺伝子多型と前立腺癌における癌関連遺伝子のメチル化の解析. 第65回日本癌学会総会 横浜. 2006.9.

加藤貴彦、小宮康裕、黒田嘉紀. 感受性バイオマーカーの産業保健への応用. 第36回日本生物学的モニタリング・バイオマーカー研究会 東京. 2006.10.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

該当せず

参考文献

1. Phillips DL, Pirkle JL, Burse VW, et al. Chlorinated hydrocarbon levels in human serum: effects of fasting and feeding. *Arch Environ Contam Toxicol* 1989;18:495-500.

2. Itoh H. Analysis of human exposure and health risks of phthalates based on measuring their metabolites in human urine (in Japanese; Thesis). Yokohama National University, 2005.

3. Fujimaki K, Arakawa C, Yoshinaga J, et al. Estimation of intake level of bisphenol A in Japanese pregnant women based on measurement of urinary excretion level of the metabolite [in Japanese]. *Nippon Eiseigaku Zasshi* 2004;59:403-408.

4. Lopez-Cervantes M, Torres-Sanchez L, Tobias A, Lopez-Carrillo L. Dichlorodiphenyldichloroethane burden and breast cancer risk: a meta-analysis of the epidemiologic evidence. *Environ Health*

Perspect. 2004;112:207-14.

5. Schabath MB, Delclos GL, Grossman HB, Wang Y, Lerner SP, Chamberlain RM, Spitz MR, Wu X, Polymorphisms in XPD exons 10 and 23 and bladder cancer risk, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 878-884.

6. Rybicki BA, Conti DV, Moreira A, Cicek M, Casey G, JSWitte, DNA repair gene XRCC1 and XPD polymorphisms and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 23-29.

7. Rybicki JD, Huang WY, Chokkalingam AP, Gao YT, Deng J, Levine P, Stanczyk FZ, Hsing AW, Genetic variants of DNA repair genes and prostate cancer: a population-based

study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14: 1703-1709.

8. Tsukioka T, Terasawa J, Sato S, et al. Development of analytical method for determining trace amounts of BPA in urine samples and estimation of exposure to BPA. *Journal of Environmental Chemistry* 2004;14:57-63.

9. Volkel W, Colnot T, Csanady GA, et al. Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol* 2002;15:1281-1287.

10. Arakawa C, Fujimaki K, Yoshinaga J, et al. Daily urinary excretion of bisphenol A. *Environ Health Prevent Med* 2004;9:22-26.