

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 日常の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、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。また平成11年度から平成13年度の厚生労働科学研究費補助金によって収集し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。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。

研究協力者		物などの化学物質曝露がホルモン関連腫瘍
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	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。 また平成11年度から平成13年度の厚生労 働科学研究費補助金によって収集した子宮 内膜症の症例対照研究のデータを詳細に 解析する。
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 ゼント	

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、日常の生活環境における有機塩素系化合

今年度も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引き続き行う。また子宮内膜症の症例対

照研究については、平成17年度に分析をした尿中ビスフェノールAについて子宮内膜症との関連を検討し、さらに尿中カドミウムの分析、尿中フタル酸モノエステル類の分析法の検討を開始する。

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で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。血漿中インフラボン、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に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ない者から、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) 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、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。

(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。

(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(添付資料)、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。存在比の大きさを有利なイオン (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 (1) 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 (2) 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。

C. 研究結果

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)、Dichlorodiphenyldichloroethylene (*p,p'*-DDE)、Dichlorodiphenyltrichloroethane (*p,p'*-DDT) である。これらの検出頻度と分布は表1の通りである。

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類の分析に関する予備実験を開始した。

3. 子宮内膜症の症例対照研究

(1) 尿中ビスフェノールA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(表2)。統計解析は、SAS 9.1.3のLOGISTプロシジヤを用い、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(表2、図1)。

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。

(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図2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、図3のクロマトグラムが得られた。

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。

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。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ERβ 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法ではなく精密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(3,4)、個人内変動が大きいことが知られている点(5)、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。

E. 結論

有機塩素系化合物などの化学物質曝露と乳がん罹患の関連を検証するため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。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。

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)

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

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. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Arakawa C, Fujimaki K, Yoshinaga J, et al. Daily urinary excretion of bisphenol A. Environ Health Prevent Med 2004;9:22-26.

表1. 乳がんのコホート内症例対照研究における各分析項目の検出頻度と血漿中濃度の分布 (N=432)

	Unit	Proportion of detected samples (%)	Median	Interquartile range
Endogenous hormone				
Total estradiol	pg/ml	100	25.4	18.7-54.5
Bioavailable estradiol	%	100	41.4	37.0-46.7
Sex-hormone binding globulin (SHBG)	nmol/L	99.7	47.5	35.0-63.1
Isoflavone				
Genistein	ng/ml	96.1	140.1	75.4-229.3
Daidzein	ng/ml	78.7	17.6	6.25-37.1
Chlorinated organic compound				
Dichlorodiphenyltrichloroethane (<i>p,p'</i> -DDT)	ng/ml	100	1.11	0.694-1.90
Dichlorodiphenyldichloroethylene (<i>p,p'</i> -DDE)	ng/ml	100	6.47	3.87-10.1
Hexachlorobenzene (HCB)	ng/ml	90.5	0.287	0.172-0.511
β -hexachlorocyclohexane (β -HCH)	ng/ml	72.7	0.499	0-0.942

表2. BPA曝露の四分位数に対する子宮内膜症発生のオッズ比(OR)と95%信頼区間(CIs)(n = 125*)

BPA Quartile	No. of controls	No. of cases	Crude OR	95% CI	Adjusted OR [†]	95% CI
Unadjusted urinary concentration [$\mu\text{g/L}$]						
< 0.30-0.6914 [†]	22	9	1.0		1.0	
0.6936-1.497	19	12	1.5	0.5-4.5	1.5	0.5-4.6
1.514-2.593	14	17	3.0	1.04-8.5	3.1	1.02-9.1
2.730-19.79	16	16	2.4	0.9-6.9	2.4	0.8-6.9
<i>P</i> for trend				0.06		0.08
Creatinine-adjusted concentration [$\mu\text{g/g creatinine}$]						
0.105-0.449 [†]	19	12	1.0		1.0	
0.458-0.782	21	10	0.8	0.3-2.1	0.9	0.3-2.7
0.810-1.265	14	17	1.9	0.7-5.3	2.5	0.8-7.4
1.27-9.382	17	15	1.4	0.5-3.8	1.7	0.6-4.8
<i>P</i> for trend				0.29		0.19
Daily intake [$\mu\text{g/kg/day}$]						
0.002281-0.009408 [†]	20	11	1.0		1.0	
0.009624-0.01596	20	11	1.0	0.4-2.8	1.0	0.3-3.0
0.01618-0.02602	14	17	2.2	0.8-6.1	2.6	0.9-7.8
0.02653-0.1919	17	15	1.6	0.6-4.4	1.9	0.7-5.4
<i>P</i> for trend				0.22		0.13

* 質問票の有効回答が欠落していた対象者を解析対象から除外したため標本サイズが減少。

[†] 参照カテゴリ。

‡ 調整した変数は年齢 (24-29, 30-33, 34-43 歳), 月経周期が規則的かどうか (規則的 または不規則の二値), 平均月経周期日数 (連続変数)。

図1. 尿中BPA濃度(クレアチニン補正值)の四分位数に対する子宮内膜症の多変量調整オッズ比と95%信頼区間。年齢・月経周期の規則性・平均月経周期日数で調整済。

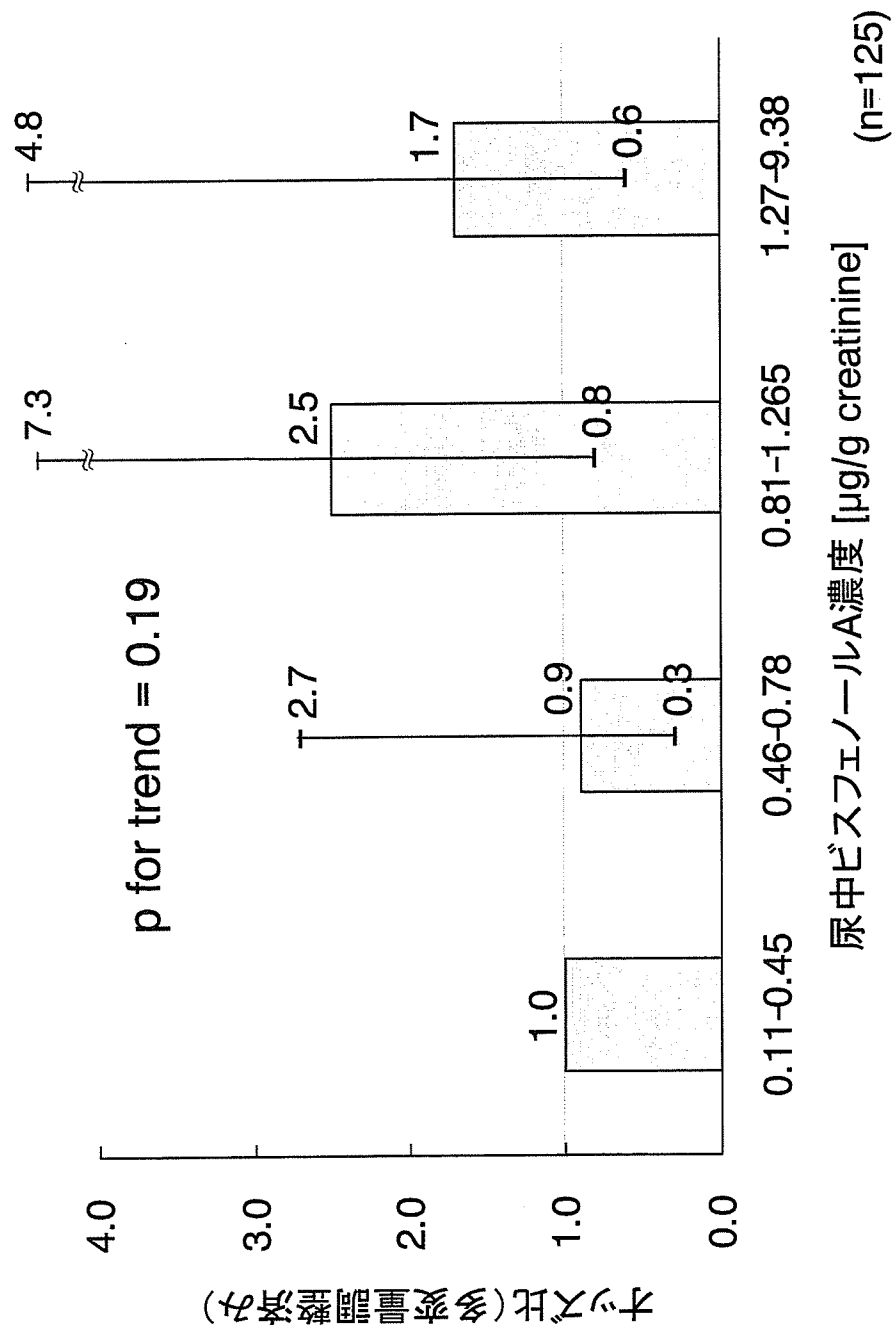
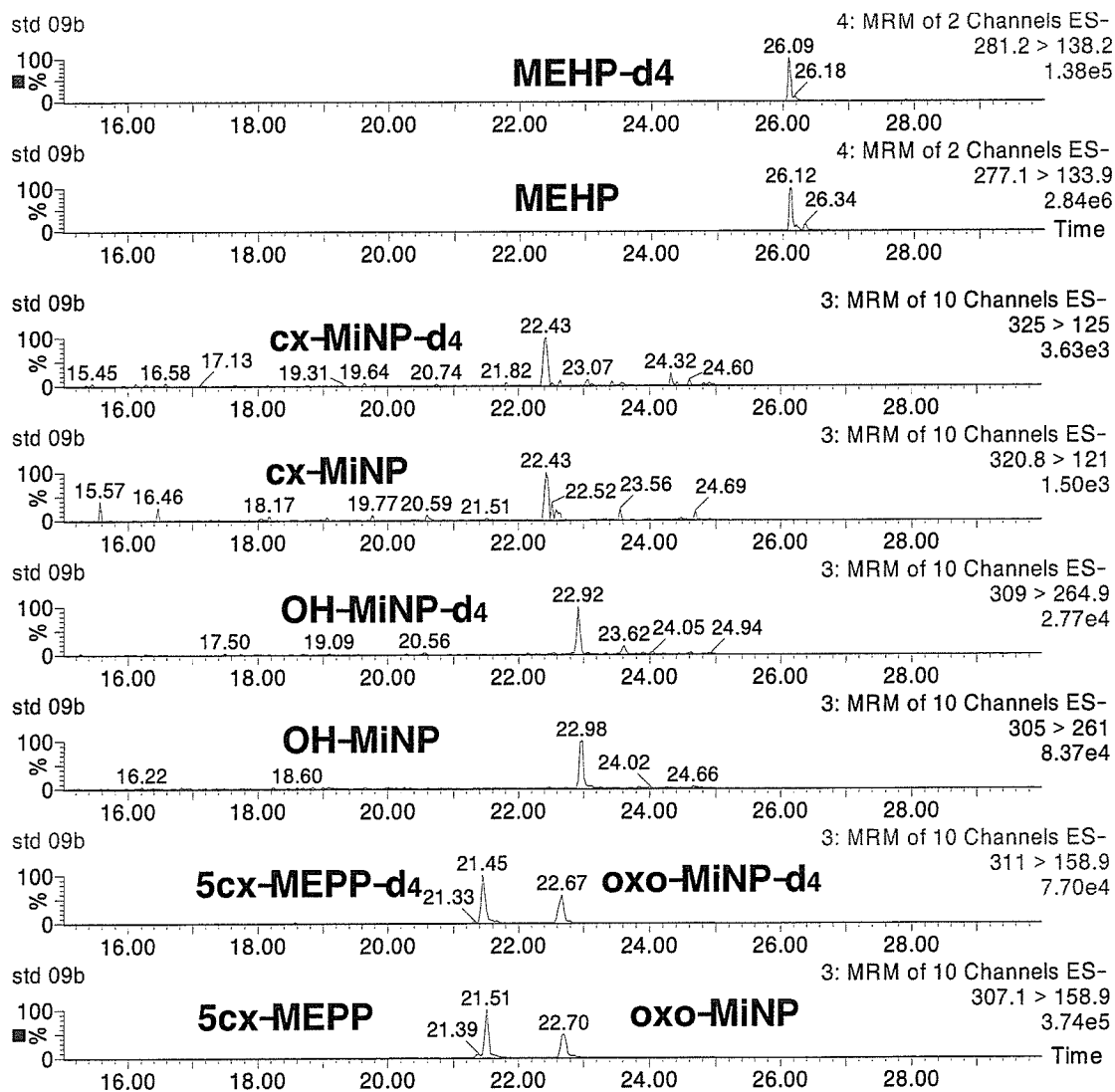


図2. フタル酸モノエステル類標準溶液を一斉分析した場合のMRMクロマトグラム。ピーク上の数字はカラム保持時間 [min.] を表す。各プリカーサイオンとプロダクトイオンの組み合わせは右端の値を参照(例 281.2 > 138.2)。



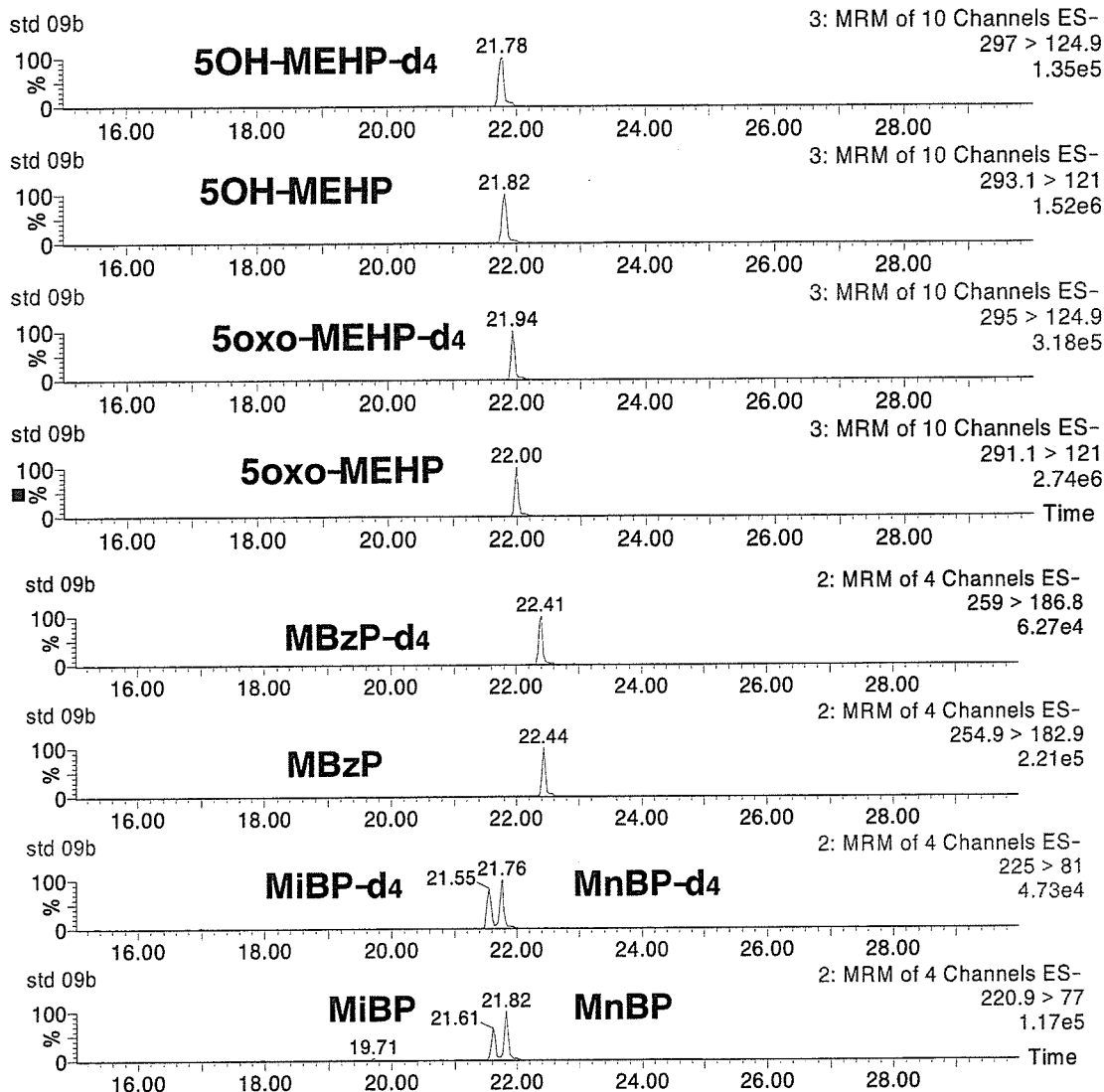
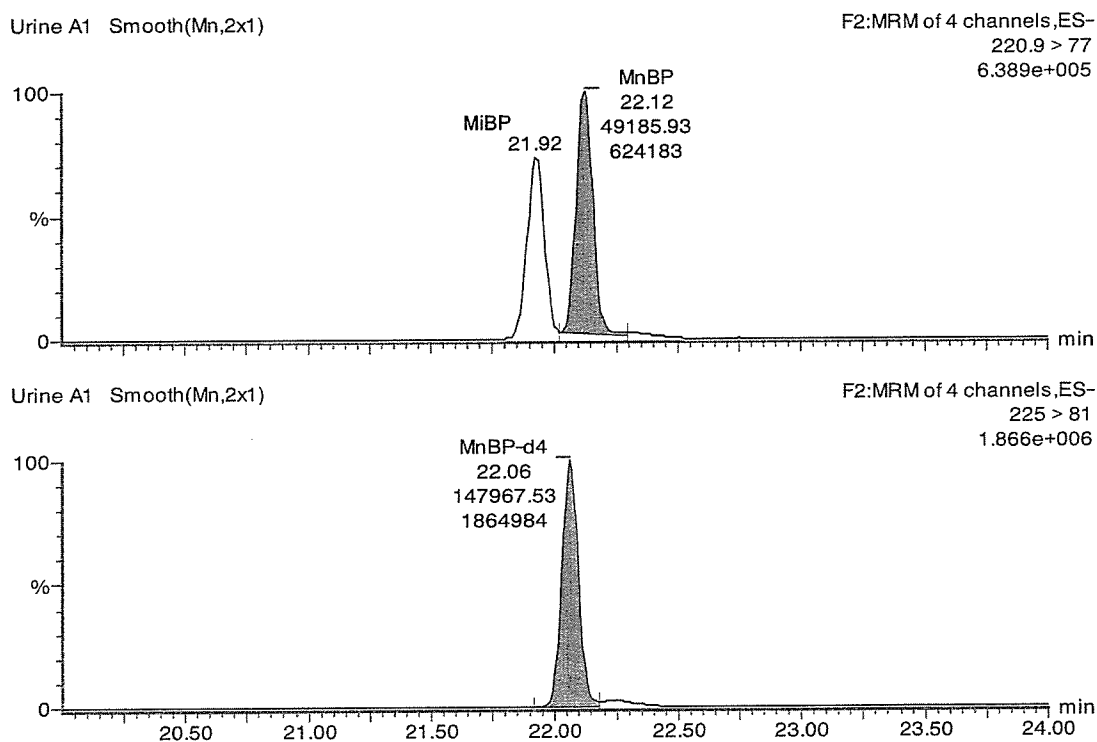


図3. 尿中フタル酸モノブチルのMRMクロマトグラム。上段(m/z 220.9 → 77.0)ではMnBPとその構造異性体MiBPで生成するプロダクトイオンの質量数が同じであるためクロマトグラフィーの保持時間で分離した。下段はMnBPの重水素置換体MnBP-d₄。MnBP-d₄濃度は50 μg/L。5 μL注入時。ベースラインは装置付属の定量計算ソフトQualLynxが自動的に作成したもの。



(様式6)

試験研究等の変更申請書

平成18年 8月 7日

国立がんセンター総長 殿

所 属 がん予防・検診研究センター
 申請者 職 名 予防研究部部長
 氏 名 津金昌一郎 印

国立がんセンター倫理審査取扱規程第7条に基づき下記のとおり申請いたします。

受付番号 12-6

研究課題	子宮内膜症と内分泌攪乱物質に対する調査		
研究期間	自平成 年 月 日～至平成 年 月 日	結果報告書 提出時期	平成 年 月 日 末日
<p>近年カドミウム・砒素などの重金属の内分泌かく乱作用が注目されているために、重金属の健康影響に関する調査・研究で実績のある（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て、“内分泌攪乱化学物質と子宮内膜症との関連”について一層の知見を得ることとした。そのため、調査期間として、今回の倫理審査承認後さらに2年間を追加することとした。</p> <p>測定項目・研究協力機関・調査期間の追加に伴い、研究計画書の「4. 調査研究者及び協力者の役割」および「5. 対象と方法」の「(4) 調査項目；」「(7) 調査期間；」に下記のように記述を追加した。変更後の欄に下線を引いて示した。</p> <p>なお、今回のカドミウム・砒素などの測定は当時の目的の範囲内であり、保存されたサンプルが化学物質の分析に使われることについては参加者からすでに同意を得ている（研究計画書の添付資料 A「サンプルの保存」の項を参照）。</p> <p>また、退職や組織改組により所属機関名や研究者が現在と異なる部分があるが、本研究の主たる部分は終了しているため、所属機関名および研究者は当時のままとした。</p> <p>【変更前】</p> <p>4. 調査研究者及び協力者の役割</p> <p>本研究は、厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）の中の「内分泌かく乱化学物質の人の生殖機能等への影響に関する研究（H11-生活-021）」（主任研究者：津金昌一郎、国立がんセンター臨床疫学研究部長）において実施されるものである。</p> <p>また、本研究は、わが国の3研究機関と米国 Centers for Disease Control and Prevention National Center for Environmental Health との共同研究である。</p> <p>東京慈恵会医科大学産婦人科（佐々木（研究代表者）、許山、広島、田中）：</p>			

5-(1)-5

症例、対照例の収集。質問票調査。生体試料の採取。診断情報の収集。

国立環境研究所（兜）：

内分泌攪乱物質（血清中フィトエストロゲン、尿中農薬類）の測定。生体試料の分析・測定（LH, FSH, TSH, T3, T4 などのホルモン、シトクローム P450 代謝酵素遺伝子末梢血白血球中 mRNA 量）。

国立がんセンター研究所支所臨床疫学研究部（花岡、津金）：

研究総括。内分泌攪乱物質の測定（尿中ビスフェノール A、フタル酸エステル）。生体試料の分析・測定（シトクローム P450 代謝酵素遺伝子多型および末梢血白血球中 mRNA 量）。データ管理・解析。

Health Studies Branch, Division of Environmental Hazards and Health Effects, National Center for Environmental Health (Amanda Niskar, Carol Rubin) :

本研究のプロトコール、研究デザイン、質問票および疫学的方法の原型作成。疫学的方法、データ解析、報告書作成に関する助言。これらは Atlanta study の Approved IRB Protocol #1833 と同じものである。

Division of Environmental Health Laboratory Sciences, National Center for Environmental Health (Don Patterson) :

血清中内分泌攪乱物質の測定（ダイオキシン類 22 項目、農薬類 13 項目、PCB 類 36 項目）。これらは Atlanta study の Approved IRB Protocol #1833 中のリストに挙げられているものと同じ測定を行う。

5. 対象と方法

(4) 調査項目；

尿：

ビスフェノール A、フタル酸エステル類など尿中の内分泌攪乱物質。

（国立がんセンター研究所支所）

農薬類。

（国立環境研究所）

(7) 調査期間；

調査期間は 2 年間で予定とする。対象者の収集に 18 ヶ月程度、研究所における測定・分析に 3-6 ヶ月程度、統計学的解析と論文作成に 4 ヶ月間程度を要する。インタビューとデータ入力は、研究参加者の収集と同時に行う。

【変更後】

4. 調査研究者及び協力者の役割

本研究は、厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）の中の「内分泌かく乱化学物質の人の生殖機能等への影響に関する研究（H11-生活-021）」（主任研究者：津金昌一郎、国立がんセンター臨床疫学研究部長）において実施されるものである。

また、本研究は、わが国の 3 研究機関と米国 Centers for Disease Control and Prevention National Center for Environmental Health との共同研究である。

東京慈恵会医科大学産婦人科（佐々木（研究代表者）、許山、広島、田中）：

症例、対照例の収集。質問票調査。生体試料の採取。診断情報の収集。

国立環境研究所（兜）：

内分泌攪乱物質（血清中フィトエストロゲン、尿中農薬類）の測定。生体試料の分析・測定（LH, FSH, TSH, T3, T4 などのホルモン、シトクローム P450 代謝酵素遺伝子末梢血白血球中 mRNA 量）。

国立がんセンター研究所支所臨床疫学研究部（花岡、津金）：

研究総括。内分泌攪乱物質の測定（尿中ビスフェノール A、フタル酸エステル）。生体試料の分析・測定（シトクローム P450 代謝酵素遺伝子多型および末梢血白血球中 mRNA 量）。データ管理・

解析。

Health Studies Branch, Division of Environmental Hazards and Health Effects, National Center for Environmental Health (Amanda Niskar, Carol Rubin) :

本研究のプロトコール、研究デザイン、質問票および疫学的方法の原型作成。疫学的方法、データ解析、報告書作成に関する助言。これらはAtlanta studyのApproved IRB Protocol #1833と同じものである。

Division of Environmental Health Laboratory Sciences, National Center for Environmental Health (Don Patterson) :

血清中内分泌攪乱物質の測定 (ダイオキシン類 22 項目、農薬類 13 項目、PCB 類 36 項目)。これらはAtlanta studyのApproved IRB Protocol #1833 中のリストに挙げられているものと同じ測定を行う。

研究協力機関 :

労働者健康福祉機構 産業中毒センター (圓藤) :

尿中カドミウム・砒素などの金属類やその化合物の分析・測定

5. 対象と方法

(4) 調査項目 ;

尿 :

ビスフェノール A、フタル酸エステル類など尿中の内分泌攪乱物質。

(国立がんセンター研究所支所)

農薬類。

(国立環境研究所)

カドミウム・砒素などの金属類やその化合物

(労働者健康福祉機構 産業中毒センター)

(7) 調査期間 ;

調査期間は 2 年間で予定とする。対象者の収集に 18 ヶ月程度、研究所における測定・分析に 3-6 ヶ月程度、統計学的解析と論文作成に 4 ヶ月間程度を要する。インタビューとデータ入力、研究参加者の収集と同時に行う。研究計画変更承認後さらに二年間を追加して尿中化学物質の測定を行う。

(様式8)

迅速審査希望理由書

平成18年 8月 7日

国立がんセンター総長 殿

所 属 がん予防・検診研究センター
申請者 職 名 予防研究部部长
氏 名 津金昌一郎 印

1. 課 題 名	子宮内膜症と内分泌攪乱物質に対する調査
2. 迅速審査の対象となる理由（該当欄□にレ印を記載すること）	
<input checked="" type="checkbox"/> 研究計画の軽微な変更	
<input type="checkbox"/> 共同研究であって、既に主たる研究機関において倫理審査委員会の承認を受けた研究計画の審査	
<input type="checkbox"/> 研究対象者に対して最小限の危険（日常生活や日常的な医学的検査で被る身体的、心理的、社会的危害の可能性を超えない危険であって、社会的に許容される種類のものをいう。）を超えない研究計画の審査	
<input type="checkbox"/> その他（上記と同等な研究）の審査 ※下記に迅速審査を請求する理由を記載すること	
（理由が記載しきれない場合は別途自由様式にて記載すること）	

revised2006. 08. 07

子宮内膜症と内分泌攪乱物質に関する調査 調査プロトコール

1. 調査名

子宮内膜症と内分泌攪乱物質に関する調査

2. 背景

子宮内膜症は良性疾患であるが、女性に疼痛と妊孕性の低下をもたらすことにより、個人的にも社会的にも重大な影響をおよぼす疾患であり、近年増加傾向にあると言われている。わが国の医療機関 10469 施設より施設規模別に無作為に 787 施設を抽出し、本疾患の罹患状況等を調べた研究によると、平成 9 年時点のわが国の子宮内膜症受療患者は 128187 人と推定され、10-60 歳の女性における平均受療率は人口 10 万対 298 人である。このうち不妊を訴える者は 30% である (武谷, 1997)。

近年、環境に存在する多くの化学物質がホルモンに似た作用あるいは拮抗作用を示すものであることがわかってきた。これらの物質は内分泌機構と相互作用があることから、内分泌攪乱物質と称され、それが野生動物やヒトの健康に悪影響を与えるといった証拠も提示されている (Wolff et al, 1993; Kavock et al, 1996)。これらの物質はエストロゲン様物質と考えられている。子宮内膜はエストロゲンの影響によって増殖するために、エストロゲン様物質は子宮内膜症の増悪要因と考えられる。このような化学物質と子宮内膜症との関与が近年 2 つの調査で示された。Gerhard と Runnebaum (1992) は子宮内膜症患者の血中の PCB 量が増加していることを、そして Rier ら (1993) はダイオキシン含有食餌のアカゲザルは投与量に比例して子宮内膜症を発症し、重症度が増すことを見出した。PCB とダイオキシンはエストロゲン様活性をもち (Kavlock et al, 1996)、一方、外因性エストロゲンの臨床使用は子宮内膜症に関係があることがわかってきている (Cohen et al, 1994; Goh and Hall, 1992)。これらの研究は内分