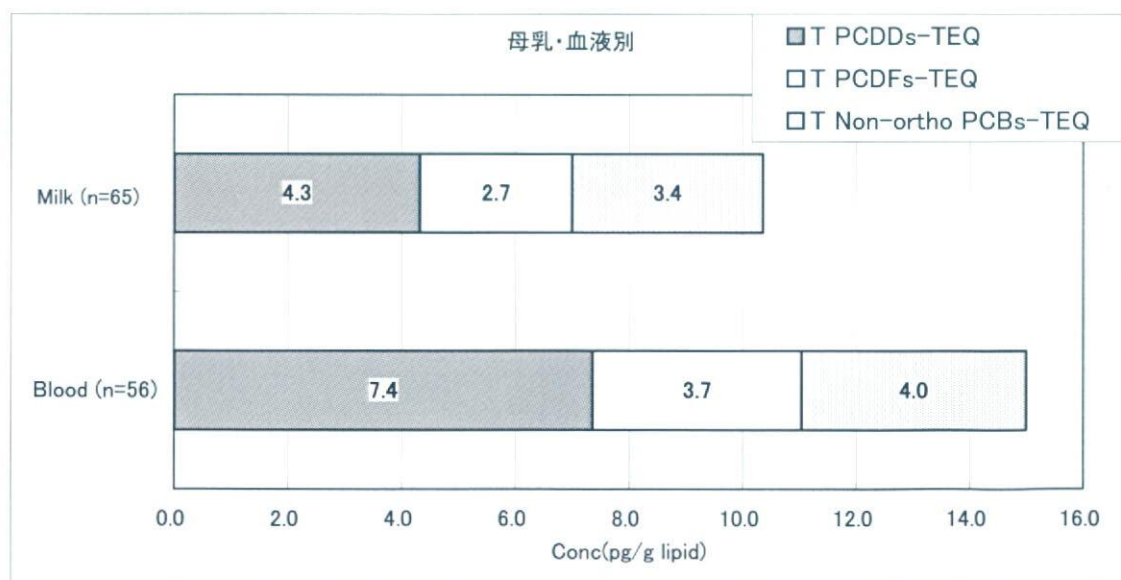


厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

表1. 妊婦血液及び母乳中ダイオキシン類測定結果(2007年)

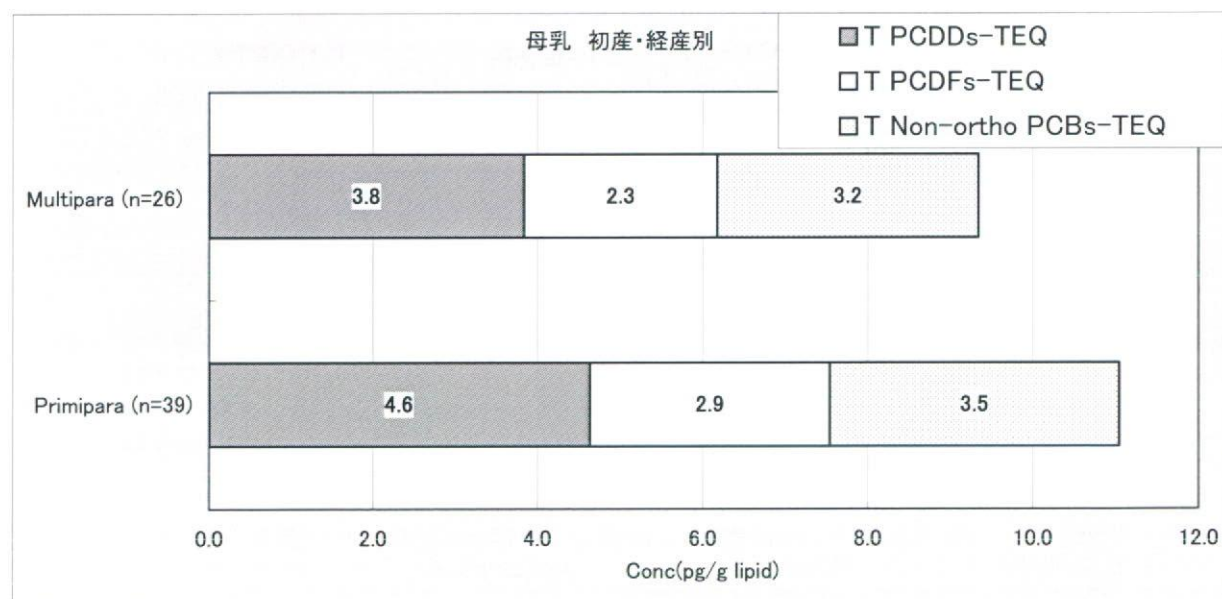
	Dioxin concentration (pg/g lipid)							
	Blood (n=56)				Milk (n=65)			
	Mean	SD	Min.	Max.	Mean	SD	Min.	Max.
2,3,7,8-TCDD	0.9	0.6	ND	2.7	0.6	0.2	ND	1.9
1,2,3,7,8-PeCDD	4.2	2.3	ND	13	2.6	1.2	ND	7.6
1,2,3,4,7,8-HxCDD	1.5	0.9	ND	4.9	1.1	0.4	ND	2.9
1,2,3,6,7,8-HxCDD	16	15	3.3	110	8.3	3.9	2.1	21
1,2,3,7,8,9-HxCDD	2.5	3.4	ND	25	1.2	0.5	ND	3.8
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	28	12	8.3	60	5.9	4.0	2.1	24
OCDD	430	180	75	830	48	41	13	250
Total PCDDs	480	200	93	940	67	49	26	310
2,3,7,8-TCDF	0.8	1.2	ND	8.4	0.5	0.1	ND	1.4
1,2,3,7,8-PeCDF	0.6	0.5	ND	3.8	0.5	0.1	ND	1.1
2,3,4,7,8-PeCDF	5.8	3.2	1.2	17	4.3	2.1	1.1	14
1,2,3,4,7,8-HxCDF	1.8	1.2	ND	4.8	1.1	0.5	ND	3.3
1,2,3,6,7,8-HxCDF	2.3	1.7	ND	7.7	1.2	0.6	ND	3.9
2,3,4,6,7,8-HxCDF	1.1	0.3	ND	2.5	ND			
1,2,3,7,8,9-HxCDF	ND				ND			
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	2.4	2.3	ND	13	1.3	1.0	ND	6.8
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	ND				ND			
OCDF	2.2	1.0	ND	8.2	ND			
Total PCDFs	19	8.4	10	42	14	3.3	11	30
344'5-TCB(#81)	ND				ND			
33'4'4'-TCB(#77)	7.5	3.6	ND	17	5.0	0.6	ND	5.0
33'44'5-PenCB(#126)	37	21	ND	95	32	19	ND	85
33'44'55'-HxCB(169)	25	13	ND	76	19	10	ND	55
Total Non-ortho PCBs	75	33	ND	180	61	27	ND	150
◆【WHO-05】◆								
T PCDDs-TEQ	7.4	4.5	1.6	29	4.3	1.8	1.4	12
T PCDFs-TEQ	3.7	1.9	1.1	10	2.7	1.1	1.0	7.9
T Non-ortho PCBs-TEQ	4.0	2.2	0.6	10	3.4	1.9	0.6	8.7
Total TEQ	15	7.9	3.7	43	10	4.4	3.0	29
Total-TEQ rate								
T PCDDs-TEQ	49.0%				41.6%			
T PCDFs-TEQ	24.6%				25.9%			
T Non-ortho PCBs-TEQ	26.4%				32.5%			
Total TEQ	100%				100%			



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

表2. 母乳中ダイオキシン類測定結果(2007年)

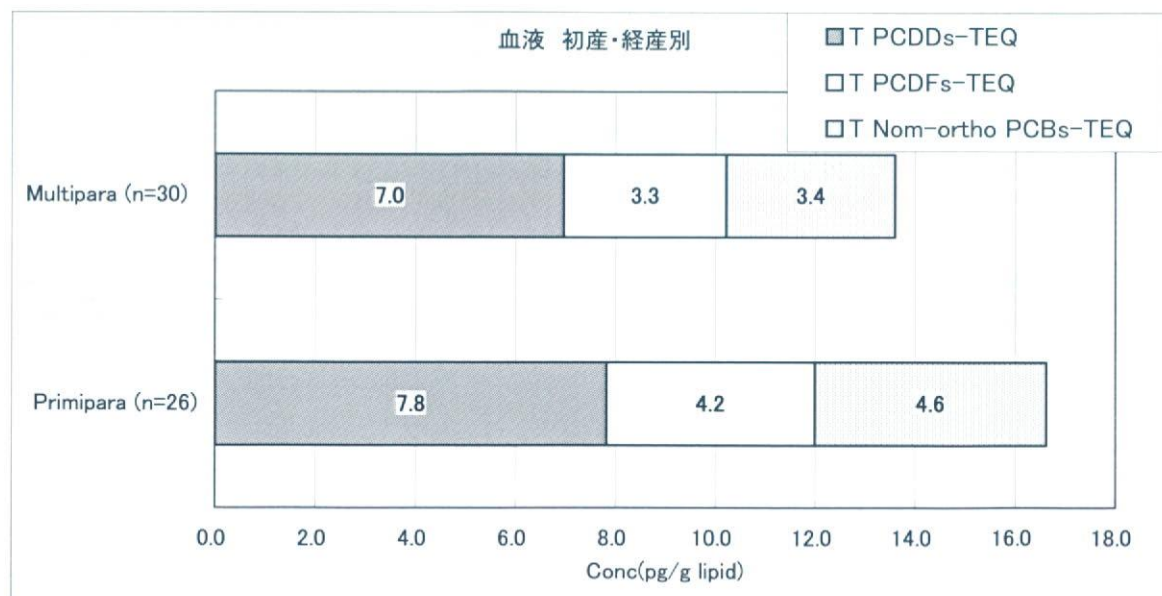
	Dioxin concentration in Breast Milk(n=65, pg/g lipid)									
	Primipara (n=39)					Multipara (n=26)				
	Mean	SD	Min.	Max.	Median	Mean	SD	Min.	Max.	Median
2,3,7,8-TCDD	0.6	0.3	ND	1.9	ND	ND				
1,2,3,7,8-PeCDD	2.8	1.3	1.4	7.6	2.4	2.3	1.0	ND	4.6	2.2
1,2,3,4,7,8-HxCDD	1.1	0.4	ND	2.9	ND	1.1	0.3	ND	2.5	ND
1,2,3,6,7,8-HxCDD	8.7	4.2	3.9	21	7.1	7.7	3.5	2.1	15	6.8
1,2,3,7,8,9-HxCDD	1.2	0.6	ND	3.8	ND	1.1	0.4	ND	3.0	ND
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	6.0	4.2	2.1	23	5.0	5.6	3.8	2.3	22	4.8
OCDD	50	43	12	250	37	13	37	16	220	36
Total PCDDs	70	51	28	300	52	62	44	25	270	53
2,3,7,8-TCDF	0.5	0.1	ND	1.4	ND	0.5	0.1	ND	1.1	ND
1,2,3,7,8-PeCDF	0.5	0.1	ND	1.1	ND	ND				
2,3,4,7,8-PeCDF	4.7	2.3	2.4	13.0	4.3	3.7	1.4	1.1	6.6	3.9
1,2,3,4,7,8-HxCDF	1.2	0.6	ND	3.3	ND	1.0	0.2	ND	2.1	ND
1,2,3,6,7,8-HxCDF	1.3	0.7	ND	3.9	ND	1.1	0.3	ND	2.3	ND
2,3,4,6,7,8-HxCDF	ND					ND				
1,2,3,7,8,9-HxCDF	ND					ND				
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	1.4	1.3	ND	6.8	ND	ND				
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	ND					ND				
OCDF	ND					ND				
Total PCDFs	15	3.9	11	29	13	13	1.6	10	18	13
344'5'-TCB(#81)	ND					ND				
33'44'-TCB(#77)	ND					ND				
33'44'5'-PenCB(#126)	32	20	ND	84	27	30	15	ND	66	30
33'44'55'-HxCB(169)	20	10	ND	55	17	16	9	ND	41	15
Total Non-ortho PCBs	63	29	28	140	56	56	23	ND	100	55
◆【WHO-05】◆										
T PCDDs-TEQ	4.6	2.0	2.7	12	4.0	3.8	1.4	1.4	7.5	3.7
T PCDFs-TEQ	2.9	1.2	1.7	7.9	2.6	2.3	0.7	1.0	3.9	2.4
T Non-ortho PCBs-TEQ	3.5	2.1	0.6	8.7	3.0	3.2	1.6	0.6	6.9	3.2
Total TEQ	11	4.9	5.8	28	9.6	9.3	3.3	3.0	16	9.4
Total-TEQ rate										
T PCDDs-TEQ	42.0%					41.1%				
T PCDFs-TEQ	26.4%					25.0%				
T Non-ortho PCBs-TEQ	31.7%					33.9%				
Total TEQ	100%					100%				



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

表3. 妊婦血液中ダイオキシン類測定結果(2007年)

	Dioxin concentration in Blood (n=56, pg/g lipid)									
	Primipara (n=26)					Multipara (n=30)				
	Mean	SD	Min.	Max.	Median	Mean	SD	Min.	Max.	Median
2,3,7,8-TCDD	1.0	0.7	ND	2.7	ND	0.8	0.5	ND	2.5	ND
1,2,3,7,8-PeCDD	4.5	2.3	ND	10	3.9	3.9	2.3	ND	12	3.7
1,2,3,4,7,8-HxCDD	1.7	1.1	ND	4.9	ND	1.4	0.7	ND	3.4	ND
1,2,3,6,7,8-HxCDD	15	7.6	3.4	31.0	14	15	19	3.3	110	12
1,2,3,7,8,9-HxCDD	2.5	1.6	ND	5.8	2.2	2.5	4.4	ND	25	ND
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	30	13.0	8.4	60.0	30	26	11	8.3	55	23
OCDD	440	180	75	830	440	410	170	79	790	400
Total PCDDs	490	200	92	940	480	460	190	99	880	440
2,3,7,8-TCDF	1.0	1.6	ND	8.4	ND	0.6	0.5	ND	3.1	ND
1,2,3,7,8-PeCDF	0.7	0.7	ND	3.8	ND	0.6	0.3	ND	2.3	0.5
2,3,4,7,8-PeCDF	6.6	3.5	1.5	17	6.2	5.1	2.8	1.2	12	5.0
1,2,3,4,7,8-HxCDF	2.1	1.2	ND	4.8	2.0	1.5	1.1	ND	4.6	ND
1,2,3,6,7,8-HxCDF	2.7	1.7	ND	7.7	2.4	2.1	1.6	ND	6.0	ND
2,3,4,6,7,8-HxCDF	1.1	0.4	ND	2.5	ND	1.1	0.3	ND	2.2	ND
1,2,3,7,8,9-HxCDF	ND					ND				
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	2.7	2.6	ND	13	2.2	2.0	2.0	ND	11	ND
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	ND					ND				
OCDF	2.2	0.8	ND	ND	ND	2.2	1.1	ND	8.2	ND
Total PCDFs	21	8.9	10	41	19	17	7.7	10	42	14
344'5-TCB(#81)	ND					ND				
33'44'-TCB(#77)	8.0	3.8	ND	16	ND	7.1	3.4	ND	14	ND
33'44'5-PenCB(#126)	43	25	ND	95	38	31	15	ND	61	29
33'44'55'-HxCB(169)	26	14	ND	76	24	23	11	ND	45	26
Total Non-ortho PCBs	82	38	ND	180	80	67	25	25	120	68
◆【WHO-05】◆										
T PCDDs-TEQ	7.8	4.0	1.6	17	6.7	7.0	4.9	1.8	29	6.3
T PCDFs-TEQ	4.2	2.1	1.3	10	3.9	3.3	1.7	1.1	7.6	3.0
T Non-ortho PCBs-TEQ	4.6	2.7	0.6	10	4.1	3.4	1.6	0.6	6.5	3.3
Total TEQ	17	8.2	4.4	37	17	14	7.5	3.7	43	14
Total-TEQ rate										
T PCDDs-TEQ	47.0%					51.2%				
T PCDFs-TEQ	25.1%					24.0%				
T Non-ortho PCBs-TEQ	27.9%					24.8%				
Total TEQ	100%					100%				



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

表4. 妊婦195名の血液中ダイオキシン類濃度(2003-2005年)

Congeners	Concentration (pg/g lipid)										p values
	Primipara (n=101)					Multipara (n=94)					
	Mean	Median	SD	Max.	Min.	Mean	Median	SD	Max.	Min.	
2,3,7,8-TCDD	1.2	1.1	0.7	3.4	0.5	0.9	0.5	0.5	3.4	0.5	<0.001
1,2,3,7,8-PeCDD	4.7	4.5	1.9	10	1.5	3.7	3.6	1.4	7.9	0.5	<0.001
1,2,3,4,7,8-HxCDD	1.9	1.0	1.0	5.1	1.0	1.6	1.0	1.4	14	1.0	0.004
1,2,3,6,7,8-HxCDD	16	14	7.4	39	5.6	13	12	5.6	42	2.4	<0.001
1,2,3,7,8,9-HxCDD	2.5	2.3	1.5	9.0	1.0	2.0	2.0	1.1	5.0	1.0	0.016
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	29	26	13	71	9.2	26	24	9.4	59	13	0.230
OCDD	530	480	244	1500	160	500	480	181	1400	230	0.875
Total PCDDs	570	510	266	1600	190	550	510	189	1400	270	0.972
2,3,7,8-TCDF	0.8	0.5	0.5	3.8	0.5	0.7	0.5	0.4	2.5	0.5	0.759
1,2,3,7,8-PeCDF	ND					ND					
2,3,4,7,8-PeCDF	6.8	6.0	3.1	20	0.5	5.4	5.4	2.3	14	1.2	0.002
1,2,3,4,7,8-HxCDF	2.9	2.7	1.4	7.7	1.0	2.4	2.3	1.5	12	1.0	0.002
1,2,3,6,7,8-HxCDF	3.4	2.9	1.7	10	1.0	2.6	2.6	1.2	6.8	1.0	0.003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	ND					ND					
1,2,3,7,8,9-HxCDF	ND					ND					
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	3.5	2.8	3.1	20	1.0	4.7	2.2	18	160	1.0	0.001
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	ND					ND					
OCDF	ND					ND					0.512
Total PCDFs	23	21	8.7	53	11	22	18	21	190	10	0.003
344'5-TCB(#81)	ND					ND					
33'44'-TCB(#77)	18	13	46	470	5.0	12	13	5.3	27	5.0	0.270
33'44'5-PenCB(#126)	45	39	28	160	10	38	36	20	110	5.0	0.075
33'44'55'-HxCB(169)	32	29	15	86	5.0	27	26	12	71	5.0	0.027
Total Non-ortho PCBs	99	86	63	550	30	81	78	31	200	27	0.042
2'344'5-PenCB(#123)	140	120	81	430	41	110	100	61	300	5.0	0.043
23'44'5-PenCB(#118)	7300	6200	4086	20000	2400	6000	5500	3014	16000	1300	0.039
2344'5-PenCB(#114)	440	391	259	1700	100	350	320	186	1100	79	0.004
233'44'-PenCB(#105)	1800	1500	1025	5400	500	1500	1400	742	3800	260	0.023
23'44'55'-HexCB(#167)	860	739	468	2400	290	740	720	375	1900	160	0.121
233'44'5-HexCB(#156)	2200	2000	1156	6400	660	2000	1800	1044	6000	440	0.171
233'44'5'-HexCB(#157)	560	500	288	1500	120	490	430	259	1400	88	0.088
233'44'55'-HpCB(#189)	250	220	126	630	5.0	250	210	137	800	70	0.766
Total Mono-ortho PCBs	13000	12000	7119	36000	4400	11000	11000	5166	28000	3200	0.060
◆【WHO-05】◆											
PCDDs-TEQ	8.5	7.5	3.4	18	3.2	6.6	6.4	2.4	14	1.7	<0.001
PCDFs-TEQ	3.0	2.7	1.3	7.8	0.6	2.5	2.4	0.9	6.5	0.9	0.002
PCDDs/PCDFs-TEQ	11	10	4.6	26	4.6	9.1	8.7	3.1	18	2.6	<0.001
Non-ortho PCBs-TEQ	5.5	4.7	3.1	17	1.4	4.6	4.3	2.2	13	0.7	0.062
Mono-ortho PCBs-TEQ	0.4	0.4	0.2	1.1	0.2	0.3	0.3	0.2	0.8	0.1	0.037
Coplanar PCBs-TEQ	5.9	5.1	3.2	18	1.6	4.9	4.7	2.4	14	0.8	0.055
Total TEQ	17	16	7.4	43	6.6	14	14	5.1	28	3.4	0.002
Total-TEQ rate											
PCDDs-TEQ	49.8%					47.3%					
PCDFs-TEQ	17.8%					17.6%					
PCDDs/PCDFs-TEQ	67.6%					64.9%					
Non-ortho PCBs-TEQ	32.3%					32.6%					
Mono-ortho PCBs-TEQ	2.4%					2.4%					
Coplanar PCBs-TEQ	34.7%					35.1%					
Total TEQ	100%					100%					

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

表5.初産婦及び経産婦の年齢とダイオキシン類濃度のSpearman順位相関係数

	Primipara (n=101)		Multipara (n=94)	
	$\rho$	<i>p</i> values	$\rho$	<i>p</i> values
PCDDs	0.449	<0.001	0.336	0.001
PCDFs	0.370	<0.001	0.282	0.006
Non- <i>ortho</i> PCBs	0.283	0.004	0.368	<0.001
Mono- <i>ortho</i> PCBs	0.457	<0.001	0.405	<0.001
Total TEQ	0.395	<0.001	0.366	<0.001

尿道下裂形成術後の下部尿路機能

分担研究者 野々村 克也 北海道大学大学院医学研究科外科治療学分野教授

研究要旨

【目的】

尿道下裂症例の長期予後について排尿機能、下部尿路症状に注目して検討した。

【対照と方法】

検討1：当科で6歳以下で初回手術を施行し、現在10歳以上となった尿道下裂症例55例を対象とし、尿流量測定、残尿測定を施行した。（平均年齢：15.5歳、平均術後経過観察期間：12.7年、尿道下裂の程度：遠位型23例、近位型32例）

検討2：下部尿路症状に関するアンケートに回答のあった尿道下裂症例21例（平均年齢：14.3歳、平均術後経過観察期間：11.5年、尿道下裂の程度：遠位型13例、近位型8例）と対照症例15例（尿道下裂既往のない男性、平均年齢16.3歳）に対して、国際前立腺スコア（IPSS）、過活動膀胱症状スコア（OABSS）を検討した。

【結果】

検討1：尿流量測定において、Toguriらのノモグラムより尿流量率をnormal（N）：>25パーセントイル値、equivocal（E）：5-25パーセントイル値の間、obstruction（O）：<5パーセントイル値、の3つに分類すると、Oは10例（18%）で認められたが、E15例（27%）、N30例（55%）であり、正常と考えられるE+Nは45例（82%）であった。残尿量（正常：20ml以下または残尿率が25%以下）は、46例（84%）で正常であった。遠位型、近位型に分けて検討を行ったが、尿流量率、残尿量ともに両群間に有意差を認めなかった。

検討2：IPSS、OABSSにおける下部尿路症状は、尿道下裂症例と対照症例の間に有意な差を認めなかった。

【結論】

尿道下裂術後の排尿機能における長期予後は遠位型、近位型に関わらず8割程度の症例で良好であり、下部尿路症状も対照症例と同等であった。

研究協力者 三井 貴彦  
北海道大学病院 泌尿器科 助教

A. 研究目的

尿道下裂は尿道口の位置異常や索変形などにより、立位排尿や性行為が困難となり、陰茎

の外観へのコンプレックスのために精神心理的な発達にも影響が懸念されるといわれている。しかし、術後の外観はもとより機能的評価の長期予後に関する報告は散見されるのみである。

今回の検討では、尿道下裂症例における術後の排尿機能および下部尿路症状の有無に着目し、それらの長期予後について検討した。

## B. 研究方法

検討1：北海道大学病院泌尿器科にて6歳以下で初回手術を施行し、現在10歳以上となった尿道下裂症例で尿流量測定、残尿測定を施行した55例を対象とした。

対象症例の平均年齢は15.5歳(10-23歳)で、平均術後経過観察期間は12.7年(4.3-20.7年)、尿道下裂の程度は遠位型23例、近位型32例であった。

評価は、尿流量測定において、Toguriらのノモグラムより尿流量率をnormal(N):>25パーセントイル値、equivocal(E):5-25パーセントイル値の間、obstruction(O):<5パーセントイル値、に分類し、評価した。残尿量は、正常を20ml以下または残尿率が25%以下と定義し、評価を行った。

検討2：下部尿路症状に関するアンケートに回答のあった尿道下裂症例21例と対照症例15例(尿道下裂既往のない男性)に対して、国際前立腺スコア(IPSS)、過活動膀胱症状スコア(OABSS)の下部尿路症状に関するアンケートを郵送し、下部尿路症状の有無について検討した。

尿道下裂症例21例の患者背景は、平均年齢は14.3歳(10-19歳)で、平均術後経過観察期間：11.5年(6.0-17.7年)、尿道下裂の程度は遠位型13例、近位型8例であった。一方、対照症例15例の平均年齢16.3歳(11.0-24歳)であった。

(倫理面への配慮)

本研究の結果や個人識別情報は厳重に管理・保存し、研究成果を公表に際しては、個人名を公表したり、個人を特定できる形にはせず、患者のプライバシーは厳重に保護されている。

## C. 研究結果

検討1：尿流量測定において、Oは10例(18%)で認められたが、E15例(27%)、N30例(55%)であり、正常と考えられるE+Nは45例(82%)であった。残尿量(正常：20ml以下または残尿率が25%以下)は、46例(84%)で正常であった。

遠位型、近位型に分けて検討を行ったが、尿流量率は、遠位型でO3例(13%)、E5例(23%)、N15例(65%)であり、近位型ではO7例(22%)、E10例(31%)、N15例(47%)で両群間に有意差を認めなかった。残尿量についても、遠位型2例(9%)、近位型7例(22%)で異常を呈したが、両群間に有意差を認めなかった。

検討2：IPSSは、尿道下裂症例で1例(5%)中等度の下部尿路症状を認めたのみで、他の症例は軽度の下部尿路症状のみであった。対照群は、全例軽度の下部尿路症状のみであった。

OABSSでは、尿道下裂症例の1例(5%)に過活動膀胱を認めるのみで、その他の症例には認めなかった。対照群では、全例過活動膀胱は認めなかった。

## D. 考察

尿道下裂は1000人に3-4人の割合でみられる疾患であり、尿道下裂に対する外科的治療法も数多くある。尿道下裂に対する外科的治療法の代表的な合併症の一つに形成尿道の狭窄があり、術後の排尿機能、下部尿路症状の評価が重要である。そのため、尿道下裂術後の尿流量測定、残尿測定による排尿機能の評価の報告はいくつかあるものの、排尿機能の長期予後に関する報告は散見されるのみである。また、尿道下裂後の下部尿路症状についても、ほとんど報告がないのが現状である。

今回の排尿機能に関する長期予後の検討では、平均 12.7 年の経過観察期間で尿流量測定における尿流率が異常を呈したのは 18%であり、残りの 82%の症例では排尿障害は認められなかった。残尿についても 16%でのみ異常を呈した。これらの結果は今まで報告されている結果とほぼ同等の成績であり、長期にわたる経過観察にもかかわらず、当科における手術成績が良好であることがわかった。さらに、今回の検討では、近位型と遠位型に分けて検討を行ったが、両群間に有意な差を認めなかった。この結果から、形成した距離に関係なく形成尿道が尿道として十分に機能していると考えられた。

一方、尿流量測定または残尿測定で異常が認められた症例では、再現性の問題もある。そのため、再度排尿機能検査を行い同様に異常を認める場合には、形成尿道の狭窄などを認める可能性を考慮して精査・治療が必要であると考えられる。

下部尿路症状については、アンケートの回答が尿道下裂 21 例、対照症例 15 例と少なかつたために、細部にわたる検討ができなかったものの、今回の検討では両群間に有意差を認められなかった。今回用いたアンケートの内容は、一般的な下部尿路症状の評価に用いるものであるため、以前に当科より報告したような尿道下裂特有の症状（尿の切れの悪さ、など）は評価が行われていない。しかし、術後は尿道下裂症例も対照群と同様に下部尿路症状をほとんど呈していないことから、下部尿路症状の有無についても尿道下裂の長期予後は良好であると考えられた。今後もさらに症例を増やし、検討していく必要があると考えている。

## E. 結論

尿道下裂術後の排尿機能における長期予後は遠位型、近位型に関わらず 8 割程度の症例で良好であり、下部尿路症状も対照症例と同等であった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Moriya K, Kakizaki H, Tanaka H, Mitsui T, Furuno T, Kitta T, Higashiyama H, Sano H, Nonomura K. Long-term patient reported outcome of urinary symptoms after hypospadias surgery: norm related study in adolescents. J Urol. 178 : 1659-1662, 2007

### 2. 学会発表

なし

## H. 知的所有権取得

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



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

バイオマーカーcytochrome P450に関する研究

分担研究者 藤田 正一 北海道大学・大学院獣医学研究科毒性学分野教授

研究要旨

cytochrome P450 (P450、CYP) は細菌、植物から哺乳類まで多くの生物種に存在し、ステロイドホルモンやビタミン、エイコサノイドなどの生理活性物質の生合成・代謝を行うと同時に、医薬品や環境汚染物質など、多くの外来異物代謝も担っている一酸素添加酵素である。P450には様々な分子種が存在し、哺乳類では数百に及ぶ分子種が報告されている。P450はダイオキシン類やPCB、フタル酸エステルなどの外来異物によって発現が誘導される。従って、広範なP450分子種のmRNA発現量、蛋白量、酵素活性を測定することにより、鋭敏に外来化学物質が引き起こす初期の生体反応を検出できるだけではなく、PCB、DDTなど比較的知られている物質以外の、未知の環境化学物質の影響も評価できる可能性がある。そこで、胎盤、母体血中の異物代謝酵素P450をバイオマーカーとして、環境汚染のヒトへの影響を評価することを本研究の目的とした。

昨年度までの研究により、人の血液中のCYP1A1、CYP2A、CYP2E1、CYP1B1、CAR、AhRなどの発現とダイオキシン類の蓄積との間に、CYP1A1以外では相関がないことが明らかとなった。しかしながら、CYP1A1の発現量は非常に低く、血液において発現をしていない個体も多くみられた。従って、血液におけるCYP発現量が低いことから、胎盤など他の組織を用いたCYPについても調べる必要があると考えられた。一方で、通常、人は複合汚染に曝されており、CYP1A1を誘導するダイオキシン類だけではなく、複合汚染の曝露についても検討する必要があると考えられた。

そこで、本年度は、胎盤のCYP発現とともに、人の生活圏に密接に生活するドブネズミに蓄積する汚染物質を網羅的に調べ、複合汚染に対してどのようなバイオマーカーが有効なのかを野生のネズミをモデルとして調べた。

研究協力者 石塚真由美  
北海道大学・大学院獣医学研究科  
准教授

A. 研究目的

cytochrome P450 (P450、CYP) は細菌、植物から哺乳類まで多くの生物種に存在し、ステロイドホルモンやビタミン、エイコサノイドなどの生理活性物質の生合成・代謝を行うと同時に、医薬品や環境汚染物質など、多くの外来異物代謝も担っている一酸素添加酵素である。P450には様々な分子種が存在し、哺乳類では数百に及ぶ分子種が報告されている。P450の中でも、CYP1、CYP2、CYP3、CYP4ファミリーは様々な外来異物によってその発

現量が変動することが知られているが、それらのレギュレーターとして、AhR (aryl hydrocarbon receptor) や PXR (pregnane X receptor ; NR1I2) 、 CAR (constitutive androstane receptor; NR1I3) 、 PPAR ( peroxisome proliferator-activated receptor) が知られている。これらの受容体群は、ダイオキシン類やPCB、DDT、フタル酸エステルなどのリガンドと結合あるいは活性化され、プロモーター領域に応答配列を持つ異物代謝酵素を誘導する。従って、広範なP450分子種のmRNA発現量、蛋白量、酵素活性を測定することにより、鋭敏に外来化学物質が引き起こす初期の生体反応を検出できるだけではなく、PCB、DDTなど比較的知られている物質以外の、未知の環境化学物質の影響

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

も評価できる可能性がある。そこで、胎盤、母体血中の異物代謝酵素 P450 をバイオマーカーとして、環境汚染のヒトへの影響を評価することを本研究の目的とする。

昨年度は、人の血液に発現する CYP 分子種と蓄積するダイオキシン類の関係について調べた。ラットを用いた実験から、血液では、脂肪酸やステロイドホルモンなどの生理的基質を代謝する P450 分子種が主に発現しており、CYP2E1 や CYP3A、CYP1A など外来化学物質を代謝する P450 分子種の発現は少ないことが分かった。

ステロイドホルモンや外来化学物質を代謝的に活性化する CYP2A は、ラットおよびヒトの血液でも発現していた。その発現量は CYP1A1 よりも多く、すべてのサンプルで検出することが出来た。また、ヒトリンパ球での発現が報告されている CYP1B1 について、ラットの血液サンプルでは発現は確認できなかったが、ヒトの母体血サンプルでは、CYP1A1 よりも高レベルでその発現が検出できた。しかし、CYP2A6 や CYP1B1 の mRNA は、CYP1A1 の mRNA に比べると、血液での発現とダイオキシン類との間の相関は低かった。

一方で、通常人はダイオキシン類だけではない複合汚染に曝露されている。従って、ダイオキシン類のバイオマーカーである CYP1A1 だけではなく、複合汚染の観点から、網羅的にバイオマーカーについて調べる必要もあると考えられた。

そこで、本研究では、血液よりも CYP 発現量の多い胎盤に発現する CYP を調べるとともに、複合汚染下でどのようなバイオマーカーが有効であるのか、人と同じ汚染物質に曝露されている野生のドブネズミをモデルとして調べた。

## B. 研究方法

### 1. 人の胎盤に発現する CYP1A1

札幌市内病院より妊婦の母体血を採集した。母体血は液体窒素によって凍結し、分析

まで -80℃ にて保存した。TotalRNA は TriReagent (Sigma-Aldrich) を用いて抽出した。) real-time RT-PCR および DNA マイクロアレイ法によって、P450 やその発現調節因子の mRNA 発現レベルを測定した。

なお、RNA を抽出した血液サンプルに蓄積するポリ塩素化ジベンゾダイオキシン (PCDD: polychlorinated dibenzo-p-dioxins)、ポリ塩素化ジベンゾフラン (PCDF: polychlorinated dibenzofurans)、コプラナー PCB (cp-PCB: coplanar polychlorinated biphenyls) のダイオキシン類は、福岡県保健環境研究所によって測定された。

### 2. 複合汚染下でのバイオマーカー

野生のドブネズミは大阪、東京から採集した。汚染亢進地区としてごみ埋立場、汚染の進んでいない地域として北海道離島より溝鼠を採集した。肝臓の脂肪画分から GC-MS を用いて、PCDD、PCDF、co-PCB、DDT などの有機塩素系農薬、ジフェニルエーテルなどの臭素系難燃剤の蓄積濃度を調べた。

また、肝臓より RNA を抽出し、DNA マイクロアレイを用いて、汚染域で変動する遺伝子について検索した。

#### (倫理面への配慮)

遺伝子解析に関する本研究は、北海道大学大学院医学研究科倫理委員会および遺伝子解析審査小委員会に従って実施し、インフォームドコンセントは「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」およびヘルシンキ宣言に基づいて行った。

## C. 研究結果

### 1. 人の胎盤に発現する CYP1A1

人の胎盤では、CYP1A1 は検出されたが、その発現は低く、検出できない個体もあった。また、蓄積するダイオキシン類との相関性は得られなかった。マイクロアレイなどについて

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

ては、現在解析中である。

2. 人生活圏の複合汚染下でのバイオマーカー

人生活圏に密着して棲息するドブネズミからは高濃度の残留性有機汚染物質が検出された。特に、ドブネズミの肝臓におけるダイオキシン類は、1300~21,000pg-TEQ/g(lipid)の範囲で蓄積してした。非汚染域の対照用としたラットは 16~23pg-TEQ/g(lipid)と低かった。有機塩素系農薬は、その殆どを DDT が占めた。

また、今回の分析により、ドブネズミの肝臓では新規 POPs であるポリ臭素化ジフェニルエーテルの濃度が高いことが分かった。

3. 複合汚染下でのバイオマーカー

肝臓に発現する遺伝子群では、CYP 分子種は棲息域によって以下のような発現レベルの違いを示した。下記の表に、マイクロアレイに搭載されている遺伝子で有意に変化があったもののうち肝臓での異物代謝酵素の遺伝子発現の変動を示した。表内の( )の数字は実験室ラットと比較した発現量比を示した。また、表において“—”は実験室ラットの発現量と比較して有意に変化がなかったが、参考までに記載した。

		Landfill	Tokyo	Osaka
CYP1	CYP1A1	↑(×3.7)	↑(×26.0)	↑(×17.1)
	CYP1A2	↑(×2.1)	↑(×1.9)	↑(×1.6)
CYP2	CYP2A1	-	-	-
	CYP2A3	-	-	-
	CYP2B15	↓(×0.1)	↓(×0.3)	↓(×0.1)
	CYP2E1	-	-	-
CYP3	CYP3A	-	↓(×0.8)	↓(×0.4)
CYP4	CYP4F	↓(×0.3)	↓(×0.2)	↓(×0.4)
CYP7	CYP7B1	↑(×19.7)	-	-
CYP8	CYP8B1	↑(×3.2)	-	-

上の表に示すように、多くの CYP 分子種の中でも、汚染亢進域で唯一共通して発現増加を示したのは CYP1A1 および CYP1A2 のみであった。

一方、重金属や活性酸素種などによって発現が上昇するいわゆるストレスタンパク質の遺伝子群は、複合汚染下のラットにおいて、酸化ストレスなどで発現が上昇する熱ショックタンパク質 (HSP) やヘムオキシゲナーゼ

-1(HO-1)に増加が見られた。抗酸化酵素 (スーパーオキシドディスムターゼ (SOD)、カタラーゼ (Catalase)、グルタチオンパーオキシダーゼ (GPx)) 以外はいずれも発現が上昇していることが明らかとなった。

		Landfill	Tokyo	Osaka
HSP	HSP60	—	—	—
	HSP70	↑(×1.6)	↓(×0.7)	↑(×1.6)
	HSP90	↑(×1.3)	↓(×0.7)	—
HO-1		↑(×3.7)	↑(×3.2)	↑(×8.0)
metallothionein	MT-1	↑(×3.0)	↑(×3.5)	↑(×3.7)
	MT-2	↑(×5.7)	↑(×7.5)	↑(×8.6)
NQO1		↑(×3.2)	↑(×3.0)	↑(×3.5)
SOD		—	—	—
Catalase		—	—	—
GPx		—	—	—

D. 考察

今回、胎盤における CYP1A1 の発現は非常に低かった。通常、胎盤では、CYP11 や CYP19 の発現が認められるが、CYP 発現量は胎児の肝臓に比べてさらに低い。さらに、dexamethasone や PCN の妊娠ラットへの投与では、胎盤における CYP3A1 発現は低く、この CYP に関しては胎盤では誘導能がほとんどないことが分かっている。また smoking による CYP2B サブファミリーの誘導も、ラットおよびヒトの胎盤においては認められていない。CYP 以外のバイオマーカーとして、smoking などによって発現する遺伝子がどのように変動するのか、そのプロファイルは現在解析中である。

一方、人の複合汚染のモデル動物を用いた今回の結果では、環境化学物質に曝露されている野生ドブネズミ個体の全ての試料において CYP1A1 や、これらの P450 分子種と同じく AhR で発現調節される NQO1 の発現増加が確認され、これらの遺伝子の発現の増加がダイオキシンなど汚染物質への曝露によるものであることが示唆された。また、本研究では、CYP1A サブファミリーの他、NQO1 や、さらに、活性酸素や重金属への曝露によって発現が上昇する HO-1 や metallothionein の発現も増加し、人の生活圏において、重金属への曝露に

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

よる可能性が考えられた。

E. 結論

人の胎盤においても CYP1A1 の発現は非常に低い。また、複合汚染下では肝臓における遺伝子プロファイルの分析は環境汚染を反映していることが明らかとなった。

F. 健康危険情報  
なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Nahla A.G. Ahmed Refat, Zein Shaban Ibrahim, Gihan Gamal Moustafa, Kentaro Q Sakamoto, Mayumi Ishizuka, and Shoichi Fujita. The Induction of Cytochrome P450 1A1 by Sudan Dyes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* (in press)

Sasaki N, Sakai N, Ikenaka Y, Kamiya T, Heewon M, Sakamoto K, Ishizuka M, Fujita S. Antibiotic Furazolidone Induces CYP1A But Not CYP2E1 Subfamily in Rat Liver. *The Journal of Veterinary Medical Science* (in press)

Moustafa GG, Ibrahim ZS, Hashimoto Y, Alkelch AM, Sakamoto KQ, Ishizuka M, Fujita S. Testicular toxicity of profenofos in matured male rats. *Arch Toxicol.* 81(12):875-81(2007)

Kim HS, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Di-(2-ethylhexyl)phthalate suppresses tamoxifen-induced apoptosis in GH3 pituitary cells. *Arch. Toxicol.* 81:27-33 (2007)

Ban S, Kondo T, Ishizuka M, Sasaki S, Konishi K, Washino N, Fujita S, Kishi R.

Using Microarray Analysis to Evaluate Genetic Polymorphisms Involved in the Metabolism of Environmental Chemicals. *Fukuoka Acta Medica* 89; 208-214 (2007).

Ishizuka M, Nagai S, Sakamoto KQ, Fujita S. Plasma pharmacokinetics and CYP3A12-dependent metabolism of c-kit inhibitor imatinib in dogs. *Xenobiotica.* May;37(5):503-13(2007).

2. 学会発表

Fujita S, Sakamoto M, Ishizuka M. Environmental impact of persistent toxic substances on wildlife 第13回毒性評価国際シンポジウム (2007)

N. Sakai, K. Q Sakamoto, M. Ishizuka, S. Fujita Mechanism of low expression of CYP2D2 mRNA in Dark Agouti rats International Congress of Toxicology (2007)

Mayumi ISHIZUKA Environmental impact of toxic substances on wildlife 韓国毒性学会 (2007)

川合 佑典, 石塚 真由美, 山本 秀明, 坂本 健太郎, 藤田 正一 野生動物の CYP1A サブファミリーの種差とキャラクタライゼーション 第34回日本トキシコロジー学会学術年会 (2007)

田中和之, 谷川力, 石塚真由美, 坂本健太郎, 藤田正一 ワルファリン耐性ドブネズミ及びクマネズミにおける新規耐性機構の解明 第34回日本トキシコロジー学会学術年会 (2007)

Sobhy Wageh, 石塚真由美, Zein Shaban Ibrahim, 坂本健太郎, 藤田正一

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

Characterization of cytochrome P450 1A  
in Ungulates 第 144 回日本獣医学会  
(2007)

田中和之、谷川力、石塚真由美、坂本健太  
郎、藤田正一 青森由来ワルファリン耐性  
ドブネズミにおける耐性機構の解明 第  
143 回日本獣医学会 (2007)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

新生児に対するフタル酸エステルの曝露に関する検討

分担研究者 水上尚典  
北海道大学大学院医学研究科  
産科・生殖医学分野教授

要旨

【目的】

フタル酸エステル(主にフタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP))は、塩化ビニル樹脂(PVC)を中心としたプラスチックに柔軟性を与える可塑剤である。近年、医療器具より溶出したフタル酸エステルが人体に影響をおよぼす可能性が指摘されている。今回我々は、新生児に対するフタル酸エステルの曝露を評価するため後方視的検討を行った。

【対象】

2001年から2005年の5年間に当院NICUに入院した児のうち、妊娠35週未満で出生し、出生時から生後1か月まで栄養チューブを必要とした62名を対象とした。

【方法】

塩化ビニル製栄養チューブを使用していた2003年4月以前の児A群:39名、それ以降のPVCフリーの栄養チューブを使用していた児B群:23名に分け、臍帯血、生後1か月の凍結保存血清を用い、GC-MSによりDEHPの代謝産物であるフタル酸モノ-2-エチルヘキシル(MEHP)濃度を測定した。Mann-WhitneyのU検定、Fisherの直接法を用いてA群とB群間でMEHP濃度、臨床的背景を比較した。また線形回帰解析を用いて生年月日とMEHP濃度の関係、Wilcoxonの符合付順位和検定を用いて臍帯血と生後1か月のMEHP濃度の関係を検討した。最後に多因子解析を用いて生後1か月MEHP濃度に影響する因子の選択を行った。 $p < 0.05$ を有意とした。

【まとめ】

1. 検査した全ての児においてMEHPが検出された。2. 臍帯血MEHP濃度は経年的に低下していた。3. B群で経産婦の割合が有意に高かったが、初産婦と経産婦との間で臍帯血MEHP濃度に差はなかった。4. 臍帯血MEHP濃度に比べ生後1か月MEHP濃度は高かった。(0.012 vs 0.135  $\mu\text{g/ml}$ )(中央値)5. 母乳栄養児では、非母乳栄養児にくらべ生後1か月MEHP濃度が高かったが、2群間で母乳栄養児の割合に差はなかった。6. 塩化ビニル製の栄養チューブを使用していた児は、PVCフリーチューブを使用していた児に比べ生後1か月MEHP濃度が高値であった。(0.185 vs 0.079  $\mu\text{g/ml}$ )7. 多因子解析の結果、生後1か月MEHP濃度に影響する因子として、栄養チューブの種類が選択された。

(研究協力者)

岸 玲子

北海道大学大学院

医学系研究科公衆衛生学

那須民江、伊藤由起

名古屋大学大学院医学系

研究科環境労働衛生学

長 和俊、小西祥平

北海道大学病院

周産母子センター

A. 研究目的

フタル酸エステルは、主に塩化ビニル樹脂(PVC:ポリビニルクロライド)を中心としたプラスチックの柔軟性を与える可塑剤として使用されており、その柔軟性、透明性、熱接着性など多くの優れた特性を持つため、様々なものに使用されている。用途として電線被覆材、壁紙、玩具、家具などの他、医療器具では点滴や輸血用のバック、経鼻栄養チューブなどに使用されている。しかし、近年そのフタル酸エステ

ルの人体への曝露による影響が懸念されている。曝露経路としては、移行、揮散、溶出により人体に曝露し、栄養チューブに関しては、熱を加える、チューブ内に脂質や血液を通すなどの条件によりフタル酸エステルがチューブ内に溶出すると報告されている。新生児領域では、経口哺乳ができない新生児に栄養チューブを使用するが、そこへ温めた母乳あるいは人工乳を注入することによりフタル酸エステルが溶出し、新生児に曝露する可能性が示唆される。

日本では、フタル酸エステルが含まれる医療用具の使用についての指導・規制が、2002年に厚生労働省より出された。そのため当院NICUでは、2003年4月を境に塩化ビニル製の栄養チューブからPVCフリーの栄養チューブに変更した。そこで今回我々は、PVCフリーの栄養チューブ使用前後で、新生児に対するフタル酸エステルの曝露量を後方視的に検討した。

## B. 対象

2001年から2005年までの5年間に当院NICUに入院した児1613名のうち、妊娠35週未満で出生した265名を対象に、出生時から生後1ヵ月まで持続的に経鼻あるいは経口より栄養チューブを必要とした児62名で検討した。なお生後1ヵ月までに輸血を行った児および消化管手術を行った児は除外した。

## C. 研究方法

2003年4月以前に塩化ビニル製の栄養チューブを使用していた児をA群(n=39)、それ以降PVCフリーの栄養チューブを使用していた児をB群(n=23)に分け、臍帯血および生後1か月の凍結保存血清を用いて、フタル酸ジエチルヘキシル(DEHP)の代謝物であるフタル酸モノ2エチルヘキシル(MEHP)濃度を測定し比較検討した。

検査は名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学のご協力で、GC-MS6890/5973N(Agilent technologies社

製)を用いた。

測定条件は以下の通りであった。

HP-5MS 5%phenyl methyl siloxane キャピラリーカラム (長さ 30m×内径 0.25mm×膜厚 0.25 μm) キャリアーガス: 高純度ヘリウム、初期流量 1ml/分、注入 1min-split、カラム温度 80°C 2分→20°C/分→260°C 5分、注入口 Split ratio 50:1、スプリットレス、SIM mode

検体は血清 60 μl を用い、酢酸エチルによる抽出およびシリル化誘導を行い GC/MS にて特定のイオンのみを拾うSIMモードで測定した。内部標準液として MEHP を重水素置換体したものを用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は北海道大学大学院医学研究科の倫理委員会にて承認を得た。

## D. 統計学的方法

A,Bの2群間比較、および母乳とMEHP濃度の関係の検討にはMann-WhitneyのU検定を用いた。また線形回帰解析を用いて生年月日とMEHP濃度の関係を検討し、Wilcoxonの符合付順位和検定を用いて臍帯血と生後1か月のMEHP濃度の関係を検討した。生後1か月のMEHP濃度に影響する因子は、重回帰解析を行い検討した。

なお、 $p < 0.05$ を有意とした。

## E. 結果

臨床的背景では、妊娠週数、出生体重等でA群、B群間に有意差を認めなかったが、唯一母体の分娩既往において、B群で経産婦が多く有意差を認めた。(表1-1、表1-2)

MEHP濃度の比較では、臍帯血および生後1か月のA群がB群に比べ高く有意差を認めた。(表2)

臍帯血のMEHP濃度の経年的変化を、縦軸にMEHP濃度、横軸に生年月日を取り検討した。結果、臍帯血および生後1か月のMEHP濃度で、有意な経年的減少を認めた。しかしA群、B群に分け、同様に回帰解析を行

った結果、有意な減少は認めなかった。（図 1-1、図 1-2）

臍帯血と生後 1 か月の MEHP 濃度の関係を検討した結果、臍帯血に比べ生後 1 か月の MEHP 濃度は高く、有意差を認めた。（図 2-1）また、A 群、B 群に分け同様に検定を行い、両群とも有意差を認めたが、明らかに A 群は B 群に比べ生後 1 か月の MEHP 濃度が高く検出された。（図 2-2）

最後に A、B 群に関係なく、生後 1 か月の MEHP 濃度と母乳栄養との関係性を評価した。結果、人工栄養に比べ母乳を使用していた児では、MEHP 濃度は高く有意差を認めた。（図 3）

以上の結果をもとに、生後 1 か月の MEHP 濃度に影響する因子を評価するため重回帰解析を行った。結果、塩化ビニル製チューブの使用の有無のみが、MEHP 濃度に影響を与える因子として抽出された。

## F. 考案

今回の結果を整理し、その結果から考えられることを以下にまとめた。

1. 検査した全ての児において MEHP が検出された。

児は胎児期から出生後少なくとも生後 1 か月の間、フタル酸エステルに曝露されていることになる。つまり、胎児期は経胎盤的に、出生後は環境因子によりフタル酸エステルに曝露され続けていると考えられる。

2. 臍帯血および生後 1 か月の MEHP 濃度は、A 群が B 群に比べ高かった。

2 群間で経産の有無に有意差を認めた以外に臨床的背景に差を認めなかった。臍帯血における両群間の差は次の経年的変化を反映しているものと考えられた。

3. 臍帯血および生後 1 か月の MEHP 濃度で、有意な経年的減少を認めた。

臍帯血に関しては、環境中のフタル酸エステルによる母体への曝露が経年的に減少している可能性が挙げられる。

生後 1 か月の MEHP 濃度に関しては、何らかの環境因子の変化により、出生後のフタル

酸エステル曝露が、減少したものと考えられる。今回の研究を行った 5 年間での NICU の環境変化として、栄養チューブを PVC フリーチューブに変更したことがあり、原因として考えられた。すなわち、A 群が B 群に比べ MEHP 濃度が高いことを反映した結果と考えられた。

4. 母乳を使用している児のほうが有意に生後 1 か月の MEHP 濃度は高値であった。

母体へのフタル酸エステルの曝露が、母乳を介して児に移行したと考えられる。文献でも、母乳あるいは人工ミルクからフタル酸が検出されているとの報告がある。人工ミルクより母乳で高いということは、母体へのフタル酸エステル曝露が多かったことが示唆される。

5. 臍帯血の MEHP 濃度に比べ生後 1 か月の MEHP 濃度は高値であった。

A 群、B 群とも環境因子や医療器具、栄養からの曝露が考えられるが、塩化ビニル製の栄養チューブを使用していた A 群は、PVC フリーチューブを使用していた B 群に比べ生後 1 か月の MEHP 濃度が高値であったこと、また多因子解析の結果、生後 1 か月の MEHP 濃度に影響する因子として、栄養チューブの種類が選択されたことより、塩化ビニル製の栄養チューブからフタル酸エステルが溶出し、新生児に曝露していたと考えられる。

今回の結果より、栄養チューブを PVC フリーに変更することにより新生児へのフタル酸エステルの曝露がなくなるわけではないが、暴露量を減らすことが証明された。現在もフタル酸エステル含有の栄養チューブを新生児に使用している施設はあるが、児の将来のことを懸念するのであれば、PVC フリーチューブに変更すべきではないのだろうか。

現在使用されている PVC フリーチューブは、塩化ビニル性ではなくポリブタジエンやポリエチレンなどを材質としている。また non-DEHP チューブは塩化ビニル製であるが、可塑剤は DEHP を使用せず、主に TOTM（トリメット酸トリ-2-エチルヘキシル）が使用されている。このように代替品を用いることにより新生児に対し過量のフタル酸エステル曝露を回避することが可能であると考えられる。



G. 健康危険情報

特になし

H. 研究発表

第 43 回 日本周産期・新生児医学会学術集  
会 平成 19 年 7 月 8 日

I. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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

ヒト無精子症と化学物質に関する研究

分担研究者 千石 一雄 旭川医科大学医学部産婦人科学講座 教授

研究概要

無精子症に代表される男性不妊症は近年の先進国における生活レベルの向上とともに増加傾向にあり、またいくつかの化学物質もその原因のひとつと考えられている。また男性不妊症の原因として遺伝学的素因が示唆されているものの、そのほとんどがいまなお明らかにされていないのが現状である。近年、我々は新たなヒト無精子症原因遺伝子としてヒト SYCP3 遺伝子 (Miyamoto et al., Lancet 2003)、MEI1 遺伝子 (Sato et al., J Hum Genet 2006) 及び MEISEZ 遺伝子の同定に成功した (論文作成中)。今後更にヒト無精子症と化学物質の関連の上でも解析を進め、今日の最も深刻な日本の社会問題の一つである少子化問題の解決に、新たな不妊治療を駆使することにより貢献することを本研究の目的とする。

(1) ヒト無精子症原因候補遺伝子であるヒト FKBP6 遺伝子に関する研究

A. 研究目的

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 領域の欠失が報告されている。しかしながら、今日までこの領域においてヒト無精子症の原因遺伝子として同定されたのは、DAZ, RBMY 及び USP9Y のわずか 3 つにすぎない。世界的には今なお多くの研究者が無精子症原因遺伝子の検索を AZF 領域において行っているが、最後に同定された原因遺伝子は実に 8 年前までさかのぼる。加えて最近の知見ではヒト無精子症患者のうち、その Y 染色体に微小欠失を伴うものは 10% 以下であろうと推定されている。近年、我々はその遺伝子変異により無精子症を引き起こす新たな遺伝子ヒト SYCP3 を同定した (Miyamoto et al., Lancet 2003)。特筆すべき点はこの SYCP3 はヒト 12 番染色体上に位置している点である。ヒト SYCP3 は AZF 領域以外で同定された最初の無精子症原因遺伝子である。加えて昨年我々は新たにヒト無精子症原因候補遺伝子であるヒト MEI1 遺伝子の同定に成功した (Sato et al., J Hum Genet 2006) 以上より、我々はヒト常染色体上にも多数の無精子症原因遺伝子が存在すると確信している。近年、Fkbp6 遺伝子のノックアウトマウスが報告され、homo-mutant のオスは成熟精子を全く有していなかった。詳細な解析の結果ノックアウトマウスのオスは減数分裂過程における異常により、濃縮した核をもつ特徴的な pachytene spermatocyte を有し、pachytene stage を超える細胞は全く観察されなかった。そこで我々はヒト FKBP6 遺伝子のヒト無精子症への関与を解析した。

B. 研究方法

1. ヒト FKBP6 の発現様式を解析するために、我々は Clontech 社のヒト成人 cDNA パネル (15 臓器) を鋳型として PCR 法を施行した。
2. 対象は組織学的に減数分裂停止による無精子症と診断された患者 19 名及び正常コントロール 40 名である。本研究に参加したすべての患者及び正常コントロールは全て文章による同意を得た後に血液を採取し、DNA を抽出した。また本研究は大学の倫理委員会の承認後、開始された。全ての患者は染色体異常がないことまたその Y 染色体の微小欠失が存在しないことが確認されている。
3. ヒト FKBP6 の coding region である Exon1 から Exon8 までの隣接するイントロンにプライマーを各々設定し、PCR 法を施行し、ダイレクトシーケンス解析した。
4. 3 にて検出された single nucleotide polymorphism (SNP) において正常コントロール群でも同様に PCR 及びダイレクトシーケンス解析を施行した。
5. 検出された 2 つの SNP において genomic imprinting の有無を解析するために患者精巣及び正常精巣組織から各々 RNA を抽出し、RT-PCR 法を施行し、それぞれダイレクトシーケンス解析を施行した。

(倫理面への配慮)

本研究に参加したすべての患者及び正常コントロールは全て文章による同意を得た後に血液を採取し、DNA を抽出した。また本研究は大学の倫理委員会の承認後、開始された。

C. 研究結果

ヒト FKBP6 はマウス同様その精巣に特異的な発現パターンを呈した。また mutation 解析を施行したところ、患者 19 名中 4 名において Exon3 においてシトシンからグアニンへの変換をヘテロに認めた。このシトシンからグア

ニンへの変換により早期にストップコドンが出現し、コードされるアミノ酸は正常では327個であるが、わずか60個となり不完全なFKBP6 binding domainが形成される。そこで正常コントロールでも同様にシーケンス解析したところ、40名中4名において同様なヘテロの配列を認めた。しかしながら、このグアニンがRNAレベルで発現し、不完全なアミノ酸をコードしているとは考えにくい。そこで、ヒトFKBP6はgenomic imprintingを受けているのではないかと仮説のもとに解析を進めた。ヘテロを認めた患者1名のみを精巣からのRNAを得ることができ、解析したところ、RNAレベルで発現しているのはシトシンのみであった。また同様に解析した正常コントロール4名でもRNAレベルではシトシンのみが発現していた、さらに、Exon6でヘテロを検出した多型部位での解析でもRNAレベルではmono allelicな発現を呈した。

#### D. 考察

ヒトFKBP6はマウス同様ヒト精巣特異的に発現していた。この結果はヒトFKBP6がヒト精子形成に重要な役割を担うことを示唆するものである。Mutation解析により、我々はExon3において新規のSNPを同定することができた。このSNPおよびExon6におけるSNPを用いた解析により、ヒトFKBP6がmono allelicに発現していることが明らかになった。しかしながら、本研究においてはいずれの両親からもDNAを得ることが出来なかったため、どちらのアレルが発現しているのかは不明のままである。よって、本研究は、ヒトFKBP6遺伝子がgenomic imprintingを受けている可能性を示唆するものである。Imprinting遺伝子はclusterを形成する傾向があるため、今後隣接する遺伝子の解析さらにはマウスFkbp6遺伝子のimprintingの有無の検討が望まれる。またヒトFKBP6とヒト無精子症との関連は今回解析された患者数が19名であったため、今後更に解析数を増やした検討が必要と考えられる。

#### E. 結論

本研究により、ヒトFKBP6遺伝子とその精巣においてgenomic imprintingを受けている可能性が示唆された。

(2) ヒトMEI1遺伝子の同定及びヒト精子形成過程ことにその減数分裂におけるヒトMEI1遺伝子に関する研究

#### A. 研究目的

今日までに、ヒト男性不妊の遺伝学的な素因としてY染色体の微小欠失に代表される染

色体異常及びY染色体上のAZF (azoospermia factor) 領域に存在するDAZ, RBMY及びUSP9Yさらには12番染色体上に局在するSYCP3遺伝子の異常などが報告されているものの(1)、その原因のほとんどは今なお謎のままである。

精子形成過程における減数分裂の異常は無精子症の重要な原因の一つであるが、そのメカニズムはほとんど明らかにされていない。しかしながら、マウスにおいてはいくつかの減数分裂において重要な役割を担う遺伝子(Dmcl, Fkbp6, Scp3 (Sycp3), Spo11, Msh4とMsh5)が報告されてきた。近年、胚性幹細胞に抗癌剤を投与し生み出された不妊マウスのスクリーニングにより、減数分裂異常に起因する無精子症を呈するmeil (meiosis defective 1) マウスが同定され、さらにポジショナルクローニング法により、マウスMeil遺伝子のmutationが染色体のシナプスの欠損に起因する減数分裂停止による無精子症を引き起こすことが明らかにされた(2)。

今回我々は、マウスMeil cDNAをもとにヒトMEI1 cDNAを単離し、その発現パターンを解析し、さらにヒトMEI1遺伝子の異常とヒト無精子症の関係を明らかにするために、組織学的に減数分裂停止による無精子症と診断された患者のgenomic DNAを用いて解析を行った。

#### B. 材料・方法

##### 1. ヒトMEI1 cDNAの単離及びヒト成人組織におけるその発現様式の解析

マウスMeil遺伝子のアミノ酸配列およびヒトGenome databaseを利用して、マウスmeil遺伝子とアミノ酸レベルで相同性を有するヒトゲノムシーケンス領域にプライマーを2組設定し、ヒト精巣cDNAライブラリーを鋳型としてFirst PCR及びNested PCRを施行した。Nested PCR産物をT Easyベクターにサブクローニングしシーケンス解析を行った。その後、full length cDNAを単離すべく5,RACE及び3,RACE法を施行しPCR産物をそれぞれシーケンス解析した。

単離された遺伝子のエクソン内にイントロンをはさむ形でプライマーを設定し、15のヒト成人組織から構成されたClontech社のMultiple Tissues cDNA Panelsを用いてPCRを施行した。本研究において全てのPCRはClontech社のAdvantage 2 PCR Enzyme Systemを使用した。PCR反応は95°C150秒後、95°C15秒68°C90秒をFirst PCRで32サイクル、Nested PCRでは20サイクルそれぞれ施行された。

##### 2. 対象患者群と正常コントロール群

対象患者は組織学的に減数分裂停止による無精子症と診断された27名であり、ヨーロッパ

系アメリカ人患者13名、イスラエル人13名及び日本人1名である。全ての患者は染色体異常がないこと、またY染色体の微小欠失が存在しないことが確認されている。正常コントロールとしてヨーロッパ系アメリカ人61名及びイスラエル人60名が同様に解析された。全ての患者及びドナーは文章によるインフォームドコンセントを得た後、血液を採取しDNAを抽出した。また本研究はアメリカ、イスラエル及び日本の各大学の倫理委員会の承認を得た後に開始された。

### 3. ヒト無精子症患者におけるヒト MEI1 の遺伝子変異解析

ヒト MEI1 遺伝子における coding region 内の全てのエクソンに隣接するイントロン部位にプライマーをそれぞれ設定し、組織学的解析で減数分裂停止による無精子症と診断された27名の患者の genomic DNA を用いて PCR 及びダイレクトシーケンス解析を行った。妊孕能の確認されている正常コントロール群の genomic DNA を用いて同様に PCR 及びダイレクトシーケンス解析を施行し、同定された4つの coding single-nucleotide-polymorphism (cSNP) において genotype およびアレルの出現頻度を比較検討した。さらに expectation-maximization (E-M) algorithm をもちいて近似的に頻度を計算してハプロタイプに対しても比較検討を行った。

## C. 成績

単離された full length cDNA は2つの転写体からなり、ヒトゲノムシーケンスとの比較によりヒト MEI1 遺伝子は16個のエクソンから構成され、短い cDNA は alternative splicing によりエクソン7を欠いていた。コードされるアミノ酸はそれぞれ642個及び607個でマウスとの相同性はアミノ酸レベルで77%、核酸レベルで61%であった。

発現パターンの解析では、ヒト MEI1 は精巣にほぼ特異的に強く発現していたが、脾臓と胸腺にもわずかに発現が検出された。

無精子症患者のシーケンス解析により open reading frame (ORF) 内に4箇所 single nucleotide polymorphism (SNPs) が検出された。genotype、アレル解析を行ったところ、SNP3 及び SNP4 においてコントロール群に対して統計学的な有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。さらに人種別に genotype、アレル解析を同様にを行ったところアメリカ人の SNP3 及び SNP4 においては有意差が認められたがイスラエル人では有意差が認められなかった。さらに、ハプロタイプ解析を SNP3-SNP4 において行ったところアメリカ人でやはり有意差が認められ、イスラエル人にも同様に有意差が検出された。

## D. 考察

我々はヒト MEI1 cDNA を単離した。単離された cDNA は2つの転写体を有しており、2つのアミノ酸をコードしている。これはマウス Meil 遺伝子と一致する。またその発現はマウス同様ヒト精巣に特異的なものであり、精子形成への関与を示唆するものである。

meil マウスはマウス Meil 遺伝子のエクソン12の部分的欠失もしくは完全欠失によりフレームシフトが起こることにより生じる。近年、マウスにおいて Meil 遺伝子と DNA 修復遺伝子 Dmcl1 遺伝子の関係が報告され Meil はマウス減数分裂において Dmcl1 の上流に位置していることが明らかとなった(3)。今後ヒト MEI1 遺伝子と DMC1 遺伝子の関係を明らかにするために、さらなる解析が必要とされている。

本研究においてヒト MEI1 の coding region において新たに4つの SNP を同定することが出来た。それらの SNP の解析では、SNP3 と SNP4 においてその出現頻度がアメリカ人患者群ではコントロール群に対して統計学的有意差を認められたことにより、そのメカニズムは不明なもの今回同定された SNP がヒト精子形成過程、特にその減数分裂において深く関与している可能性が示唆された。

## E. 結論

本研究はヒト MEI1 遺伝子とヒト精子形成との関係を示唆した最初の報告である。我々の研究成果は今後のヒト減数分裂の分子メカニズムの解明に何らかの貢献をする可能性がある。ヒト MEI1 遺伝子において今後、より多くの症例数を用いた解析及び他の民族における解析が強く望まれる。

(3) ヒト無精子症原因候補遺伝子であるヒト HOP2, CDK2, MEISEZ 遺伝子に関する研究

### A. 研究目的

近年、マウス Hop2, Cdk2 及び Meisez 遺伝子のノックアウトマウスが報告された。これらのマウスは全て生殖能力を全く有していなかった。詳細な解析の結果、これらのマウス全てが精子形成過程における減数分裂異常に起因する無精子症を呈することが判明した。そこで我々はこれら3つの遺伝子がヒトでもヒト無精子症の原因遺伝子となりうるのではないかと仮説をもとに解析を行った。

### B. 研究方法

対象となる患者はアメリカ人、イスラエル人及び日本人の計55名である。すべての患者及び正常コントロール群は文章によるイン