

## B. 研究方法

北海道大学病院泌尿器科にて経過観察中の尿道下裂既往のある症例のうち、15歳以上で二次性徴を迎え、評価可能であった30症例を対象とした。

評価は内分泌学的評価(LH, FSH, テストステロン)およびオルキオメーターを用いての精巣容積の測定を行い、尿道下裂の程度と思春期の内分泌環境、さらに精巣容積との関係を検討した。

(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・保管し、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

### 1. 患者背景

対象症例の年齢は15.1～39.1歳（平均19.4歳）で、尿道下裂の程度は遠位型8例、近位型18例、不明4例であった。思春期以降の内分泌環境に影響を与えたと考えられる陰嚢内容異常は、停留精巣4例、vanishing testis1例、精索捻転1例であった。

### 2. 尿道下裂の程度と内分泌の関係

遠位型尿道下裂8例中、低LHを1例、低テストステロンを2例に認めた。近位型18例では、低LH1例・高LH6例、低FSH1例・高FSH6例、低テストステロンを5例に認め、尿道下裂の程度が不明な4例では高LH1例・高FSH2例・低テストステロンを1例に認めた(図1a、1b、1c)。

### 3. 精巣サイズと尿道下裂の程度の関係

精巣サイズは両側精巣が認められる症例では大きい側のサイズを用いた。精巣サイズは10ml未満が9例(近位型7例、不明2例)、10

～15mlが3例(遠位型1例、近位型2例)、15ml以上が18例(遠位型7例、近位型9例、不明2例)であった。

思春期以後の正常精巣サイズは15ml以上といわれているが、遠位型尿道下裂8例中7例(88%)が15ml以上であったのに対し、近位型尿道下裂18例では9例(50%)が15ml以上であったものの7例(39%)が10ml未満であった。

### 4. 精巣サイズと内分泌の関係

精巣サイズが10ml未満であった9例中7例(78%)で高LH、8例(89%)で高FSHを呈した反面、精巣サイズが10ml以上で高LH/高FSHを呈した症例は認めず、精巣サイズと高gonadotrophin状態には明らかな相関が認められた。また、低LHを呈した症例は10～15mlであった3例中1例(33%)、15ml以上の18例中1例(6%)、低FSHは5ml以上の18例中1例(6%)で認めるのみであった。

他方、高テストステロン値を示した症例は認められず、精巣サイズが10ml未満であった9例中4例(44%)、10～15mlであった3例中1例(33%)、15ml以上の18例中3例(17%)で低テストステロンを認め、精巣サイズが大きくなるとともに低テストステロンを呈する症例の割合が減少していた(図2a、2b、2c)。

## D. 考察

尿道下裂の原因は十分に判明していないもののこれまでの報告から妊娠早期の内分泌学的異常が一因となっていることが知られている。思春期以前に行われた内分泌学的検索では、hCG負荷試験でのテストステロンの低反応やLH-RH負荷試験によるFSHの異常反応などからLeydig細胞や精細管の機能異常といった内因性の性腺機能異常が示唆される報告が見られるものの、実際に性ホルモンが活性化する思春期以降の内分泌学的検索の報告はごくわずかである。

今回の思春期以降の内分泌学的検討では、遠位型尿道下裂症例では近位型の症例に比較して内分泌異常を呈する頻度が低く、精巣の発育も良好なこと、尿道下裂の程度が高度になるにつれて内分泌学的異常の頻度が高くなること、精巣サイズが小さいと高 gonadotrophin を呈しやすいことが明らかとなった。これらの結果は、内因性の内分泌異常が一部の尿道下裂発生に関与していることを強く示唆しており、従来の報告と矛盾しない。しかしながら近位型尿道下裂であっても内分泌学的スクリーニングにおいては明らかな異常を認めない症例が存在していたことから、一部の症例では単に内因性の内分泌異常だけではなく内分泌かく乱物質や妊娠中の女性ホルモン剤の投与などの外因性の内分泌学的影響や内分泌とは別の原因に起因している可能性が考えられる。このことは従来より指摘されている尿道下裂の発生原因の多様性を示していると考えられ、非常に興味深い。

さらに、精巣サイズが内分泌学的異常を反映していることは現在思春期以前の尿道下裂症例をフォローしてゆく上で非常に重要な所見である。すなわち、思春期以前に侵襲的な内分泌学的検査を行わなくとも定期的な精巣サイズの測定により内分泌学的異常をスクリーニングできる可能性があり、より簡便に重要な情報を与えてくれる可能性がある。

精巣の発育が不良である症例や内分泌学的異常を呈する症例では、将来的に妊孕性が問題となってくることは想像に難くない。尿道下裂の長期的予後は不明な点が多く、今後も長期的なフォローアップが必要となってくるであろう。

## E. 結論

尿道下裂症例の思春期以後の内分泌学的検討では、尿道下裂が高度であるほど高頻度に内分泌異常が認められた。また、精巣サイズと

gonadotrophin との強い相関が見られた。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Moriya K, Kakizaki H, Tanaka H, Furuno T, Higashiyama H, Sano H, Kitta T and Katsuya Nonomura Long-term cosmetic and sexual outcome of hypospadias surgery: Norm-related study in adolescent. *J Urol*, 176: 1889-1992, 2006
2. Moriya K, Kakizaki H, Tanaka H, Furuno T, Higashiyama H, Sano H, Kitta T and Katsuya Nonomura. Long-term patient-reported outcome of urinary symptoms after hypospadias surgery: Norm-related study in adolescent. *J Urol*, in press.
3. 守屋仁彦、田中 博、三井貴彦、野々村克也 内分泌症候群(第2版) II -その他の内分泌疾患を含めて- VII性分化、発育 その他尿道下裂と類縁疾患. 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.2 610-613、2006

### 2. 学会発表

1. 第15回日本小児泌尿器科学会総会  
2005.07.20-22 新潟  
尿道下裂修復術の長期排尿予後 -質問表を用いた症例対照研究-  
守屋仁彦、古野剛史、橘田岳也、佐野 洋、東山 寛、三井貴彦、田中 博、柿崎秀宏、野々村克也
2. The 8th meeting of Asia Pasific Association of Pediatric Urologist  
2006.09.01-03 Singapore

Long-term patient-reported outcome of urinary symptoms after hypospadias surgery: Norm-related study in adolescent.

Moriya K, Kakizaki H, Tanaka H, Mitsui H, Furuno T, Kitta T, Higashiyama H, Sano H, Nonomura K.

3. 2006 National Conference and Exhibition American Academy of Pediatrics section on Urology 2006.10.07-10 Atlanta Long-term patient-reported outcome of urinary symptoms after hypospadias surgery: Norm-related study in adolescent.

Moriya K, Kakizaki H, Tanaka H, Mitsui H, Furuno T, Kitta T, Higashiyama H, Sano H, Nonomura K.

4. 28th Congress of the SIU 2006. 11. 12-16 Cape Town, South Africa Long-term patient-reported outcome of urinary symptoms after hypospadias surgery: Norm-related study in adolescent.

Moriya K, Kakizaki H, Tanaka H, Mitsui H, Furuno T, Kitta T, Higashiyama H, Sano H, Nonomura K.

#### 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

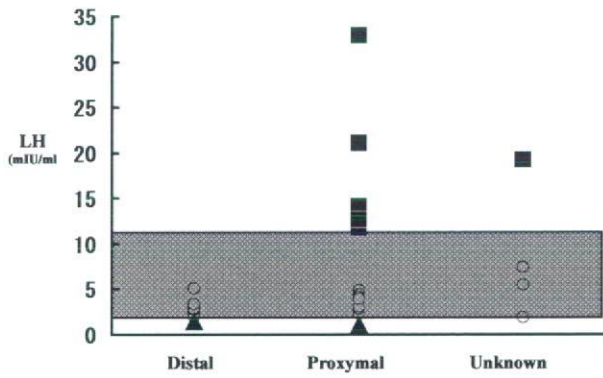


図 1a：尿道下裂の程度と LH の関係  
 ■：高 LH ▲：低 LH

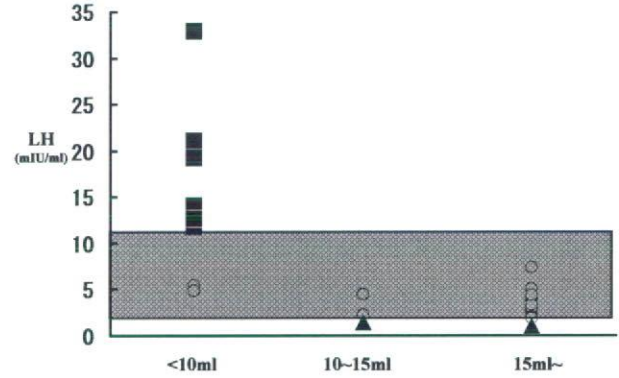


図 2a：精巣サイズと LH の関係  
 ■：高 LH ▲：低 LH

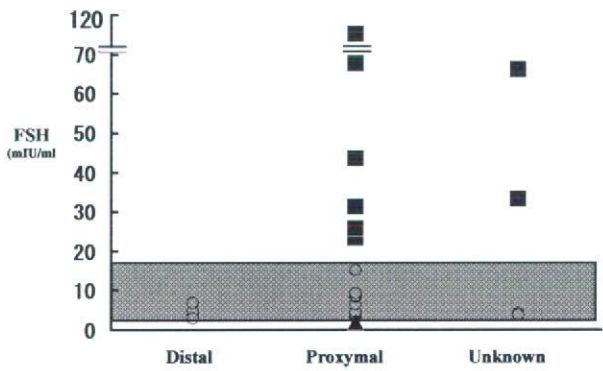


図 1b：尿道下裂の程度と FSH の関係  
 ■：高 FSH ▲：低 FSH

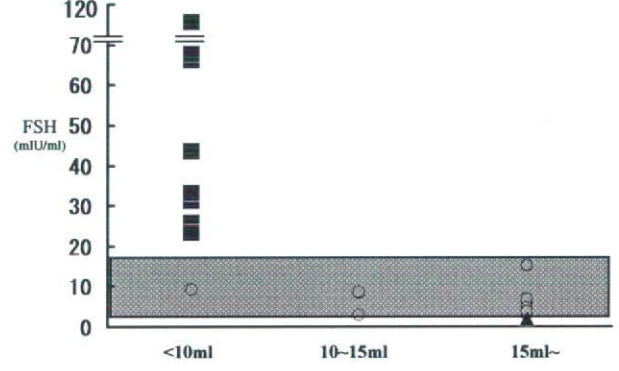


図 2b：精巣サイズと FSH の関係  
 ■：高 FSH ▲：低 FSH

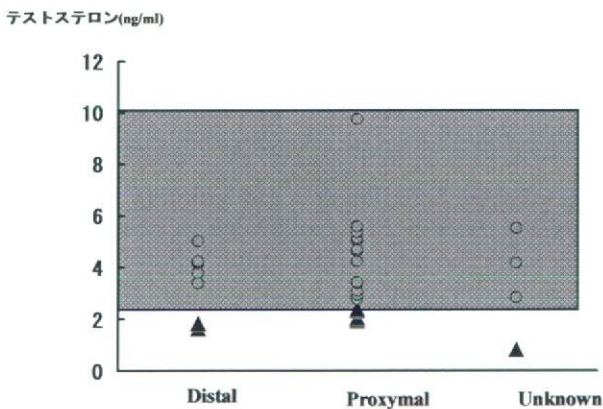


図 1c：尿道下裂の程度とテストステロンの関係  
 ▲：低テストステロン

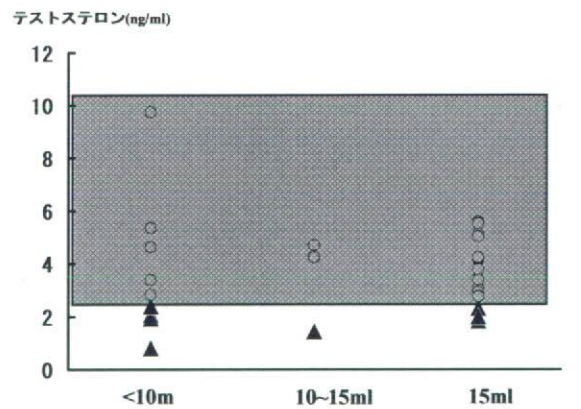


図 2c：精巣サイズとテストステロンの関係  
 ▲：低テストステロン

## 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講座腎泌尿器外科学分野 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パーセンタイル値、equivocal（E）：5-25パーセンタイル値の間、obstruction（O）：<5パーセンタイル値、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パーセンタイル値、equivocal (E) : 5-25パーセンタイル値の間、obstruction (O) : <5パーセンタイル値、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人の割合で見られる疾患であり、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例と少なかったために、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

1. 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

## バイオマーカーcytochrome P450に関する研究（CYP1ファミリー）

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。今年度は採集したサンプルの中で、ダイオキシン類の分析を行った母体血サンプルについて、CYP1ファミリーのmRNA発現量の定量を行い、その相関性について明らかにした。

### 【研究協力者】

石塚真由美

北海道大学・大学院獣医学研究科助教授

Gihan Gamal El Sayed Moustafa

北海道大学・大学院獣医学研究科研究生

(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する。

今年度は、採集したサンプルの中で、ダイオキシン類の分析を行った母体血サンプルについて、CYP1ファミリーのmRNA発現量の定量を行い、その相関性について明らかにした。

### 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



## B. 研究方法

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 $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存した。

TotalRNAはTriReagent (Sigma-Aldrich) を用いて抽出した。) および TaqMan Probe (ABI: Applied Biosystem, Inc) を用いて、real-time RT-PCRによってCYP1A1のmRNA発現レベルを測定した。Internal standardとしてGAPDHmRNAを用いた。

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 bi-phenyls) 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。

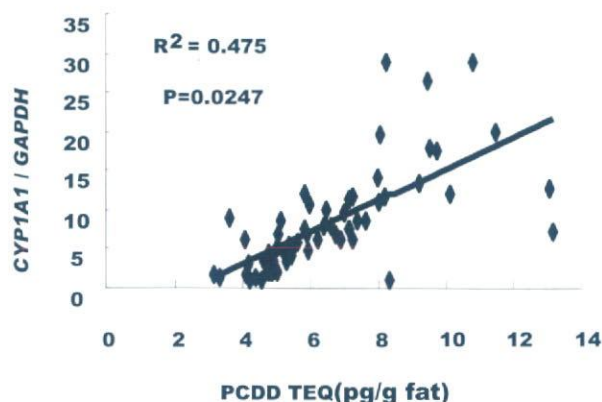
(倫理面への配慮)

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

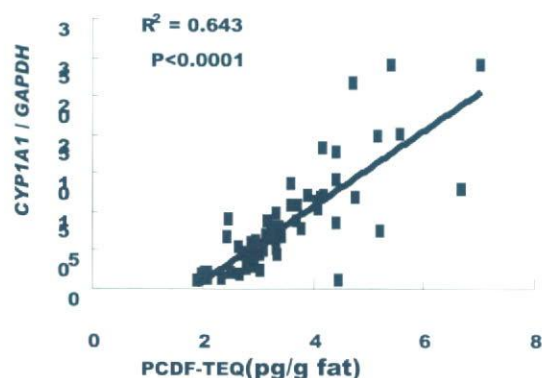
妊婦61人の血液に発現するCYP1A1mRNA発現レベルとPCDDのTEQ値を示す(図1)。直線回帰で、相関係数 $R=0.689$ 、 $P=0.0247$ であった。

図 1. PCDD TEQ and CYP1A1 expression in blood



また、PCDFのTEQ値とCYP1A1mRNA発現レベルについては図2に示す。直線回帰で相関係数 $R=0.802$ 、 $P<0.0001$ であった。

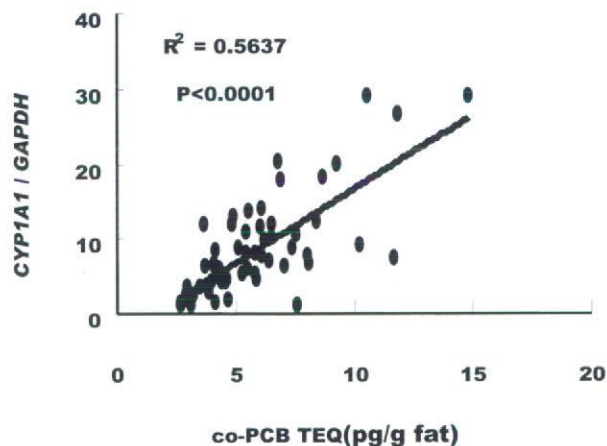
図 2. PCDF TEQ and CYP1A1 expression in blood



図には示さないが、PCDDおよびPCDFの合計TEQ値とCYP1A1mRNAレベルとの関係は、直線回帰で $R=0.746$ であった。

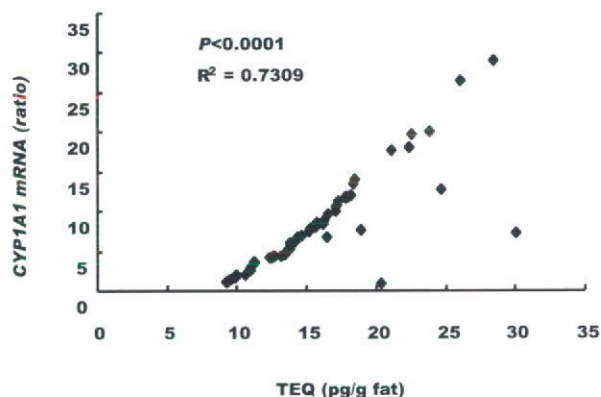
また、ノンオルソ及びモノオルソco-PCBのTEQ値とCYP1A1mRNA発現レベルについては図3に示す。直線回帰で、相関係数 $R=0.751$ 、 $P<0.0001$ であった。

図 3. Co-PCB TEQ and CYP1A1 expression in blood



PCDD、PCDF、co-PCB の総 TEQ 値と CYP1A1 mRNA の相関を図 4 に示す。直線回帰で、相関係数  $R=0.855$ 、 $P<0.0001$  であった。

図 4. Total TEQs and CYP1A1 expression in bloods



#### D. 考察

個々のダイオキシン類（PCDD、PCDF、co-PCB）の TEQ 値と CYP1A1 発現レベルは、直線回帰で  $R^2=0.475-0.643$  であった。一方、総 TEQ 値と CYP1A1 mRNA は、非常に高い相関性を示した ( $R^2=0.7309$ )。

これまで、血液中に CYP1A1 mRNA は発現しないという報告がある (Toide et al. 2003)。また、ヒトリンパ球を培養し、ダイオ

キシン類を曝露した結果、CYP1A サブファミリーの誘導率が異なることから、CYP1A サブファミリーはバイオマーカーとしてふさわしくないとの報告がある (Majorie et al. 2005)。しかし、今回の結果から、fresh なヒト血液サンプルにおいて、総和 TEQ と CYP1A 発現レベルに相関が見られたことから、P450 のバイオマーカーとしての有用性が考えられた。

#### E. 結論

血液中のダイオキシン類の TEQ 値と CYP1A1 発現レベルとの間に相関が得られた。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ishizuka M., Lee, J.J., Masuda, M., Akahori F., Kazusaka A., Fujita, S. CYP2D related metabolism in animals of the CYP2D super family — The species difference. Vet Res Comm. (In press)
- 2) Jinno A, Maruyama Y, Ishizuka M, Kazusaka A, Nakamura A, Fujita S. Induction of cytochrome P450-1A by the equine estrogen equilenin, a new endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand. J Steroid Biochem Mol Biol. (2006) 98(1):48-55.
- 3) Sakai N, Saito K, Kim HS, Kazusaka A, Ishizuka M, Funae Y, Fujita S. Importance of CYP2D3 in polymorphism of diazepam p-hydroxylation in rats. Drug Metab Dispos. (2005) 33(11):1657-60

- 4) Muzandu K, Shaban Z, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Nitric oxide enhances catechol estrogen-induced oxidative stress in LNCaP cells. *Free Radic Res.* (2005) 39(4):389-98.
  - 5) Nikaidou S, Ishizuka M, Maeda Y, Hara Y, Kazusaka A, Fujita S. Effect of components of green tea extracts, caffeine and catechins on hepatic drug metabolizing enzyme activities and mutagenic transformation of carcinogens. *Jpn J Vet Res.* (2005) 52(4):185-92.
  - 6) Ishizuka M, Takasuga T, Senthilkumar K, Tanikawa T, Fujita S. Accumulation of persistent organochlorine pollutants and polybrominated diphenyl ether in wild rats, and toxicogenomic analyses of their effects. *Organohalogen compound* (2005) 67:2435-2436
  - 7) Muzandu K, El Bohi K, Shaban Z, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Lycopene and beta-carotene ameliorate catechol estrogen-mediated DNA damage. *Jpn J Vet Res.* (2005) 52(4):173-84.
  - 8) El Bohi KM, Sabik L, Muzandu K, Shaban Z, Soliman M, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Antigenotoxic effect of *Pleurotus cornucopiae* extracts on the mutagenesis of *Salmonella typhimurium* TA98 elicited by benzo[a]pyrene and oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells. *Jpn J Vet Res.* (2005) 52(4):163-72.
  - 9) Shaban Z, Soliman M, El-Shazly S, El-Bohi K, Abdelazeez A, Kehelo K, Kim HS, Muzandu K, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. AhR and PPARalpha: antagonistic effects on CYP2B and CYP3A, and additive inhibitory effects on CYP2C11. *Xenobiotica.* 2005 Jan;35(1):51-68.
  - 10) Nikaidou S, Ishizuka M, Maeda Y, Hara Y, Kazusaka A, Fujita S. Effect of catechins on mutagenesis of *Salmonella typhimurium* TA 102 elicited by tert-butyl hydroperoxide (t-BuOOH). *J Vet Med Sci.* (2005) 67(1):137-8.
2. 学会発表（国際学会のみ記載）
- 1) Sakai et al. (2005) IMPORTANCE OF A DEFECT IN CYP2D3 GENE IN POLYMORPHISM OF DIAZEPAM P-HYDROXYLATION IN RATS. 13th North American ISSX Meeting/20th JSSX Meeting, Maui, Hawaii
  - 2) Okajima et al. (2005) NOVEL MECHANISM OF WARFARIN RESISTANCE IN ROOF RATS (*RATTUS RATTUS*) OF TOKYO. 13th North American ISSX Meeting/20th JSSX Meeting, Maui, Hawaii
  - 3) Ishizuka et al. (2005) Accumulation of persistent organochlorine pollutants and polybrominated diphenyl ether in wild rats, and toxicogenomic analyses of their effects. 25th International

Symposium on Halogenated  
Environmental Organic Pollutants and  
Persistent Organic Pollutants (POPs),  
Toronto, Canada

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

## バイオマーカーcytochrome P450に関する研究（CYP1ファミリー以外のP450分子種）

分担研究者 藤田 正一 北海道大学大学院獣医学研究科 環境獣医科学講座 毒性学分野 教授

### 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。

今年度は、ラットにダイオキシンが結合するAhR（aryl hydrocarbon receptor）のリガンドを投与し、血液を採集後、マイクロアレイを用いて、対象群と比べて発現が変動するP450分子種を同定した。さらに、人より採集したサンプルの中で、ダイオキシン類の分析を行った母体血サンプルについて、CYP1ファミリー以外のP450分子種のmRNA発現量の定量を行い、その相関性について明らかにした。同時に、P450の発現調節因子についても、測定を行った。

ラットを用いた実験では、CYP2CやCYP4Fなど、生理活性物質を代謝するP450分子種が主に血液中に発現していることが分かった。外来化学物質の代謝的活性化を起こすP450の発現は少なかったが、中でもCYP2A1は、ラットの血液にも高レベルで発現しており、AhRリガンド（ベンゾピレン）へのラットの曝露によって血液中の発現が上昇した。

一方、ヒトにおけるCYP2AサブファミリーであるCYP2A6はヒト血液でもCYP1A1に比べて高レベルに発現していた。しかし、CYP2A6、および、同じくヒトのリンパ球で発現することが報告されているCYP1B1mRNAレベルについて人の血液を用いて測定したところ、ダイオキシン類の蓄積量と相関は得られなかった。これらの分子種は、AhR以外の転写調節因子の関与も報告されている。従って、CYP1A以外のP450分子種では、ダイオキシン類との相関は弱く、複合汚染の曝露について検討する必要があると考えられた。

### 【研究協力者】

石塚真由美

北海道大学大学院獣医学研究科  
環境獣医科学講座 毒性学分野  
助教授

### 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する。

昨年度は、新鮮なヒト血液サンプルにおいて、総和TEQとCYP1A発現レベルに相関が見られた。しかし、CYP1A1は血液における恒常的な発現レベルは低く、サンプルの状態によっては血液では発現が検出されないものもあった。そこで、今年度は、血液に恒常的に発現し、AhRリガンドで発現が変動するP450分子種の探索を行った。さらに、ダイオキシン類の分析を行った母体血サンプルについて、これらP450の発現を測定し、新規バイオマーカーの探索を行った。

## B. 研究方法

### 1. ラット血液で変動するP450分子種

Wistar ラット、7週齢のオスにベンゾピレンを20mg/kgを3日間連続で経口投与した。

4日目にと殺し、ラットの血液を採集して、Isogen（日本ジーン）を用いてtotal RNAを抽出し、血中の各P450分子種のmRNA発現レベルの変動を、cDNAアレイ(クロンテック)を用いて調べた。

### 2. CYP2A6の発現調節

CYP2A6の上流域をin silicoでサーチし、その転写に関与する因子を調べた。また、ヒト肝癌由来細胞HepG2にAhRリガンドであるベンゾピレンを曝露し、24時間後のCYP2A6mRNAレベルの変動をreal-time RT-PCR (ABI: Applied Biosystem, Inc.)によって調べた。Internal standardとしてGAPDHmRNAを用いた。

### 3. 母体血に発現する薬物代謝酵素関連遺伝子とダイオキシン類

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。およびTaqMan Probe (ABI)を用いて、real-time RT-PCR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。Internal standardとしてGAPDHmRNAを用いた。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 bi-phenyls)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。

(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. ラット血液で変動する P 450 分子種

ラットの血液を用いて 27 種類の P 450 分子種の発現の有無や、AhR リガンド投与による発現量の変動を解析した。ラットの血液に発現していた P 450 mRNA は CYP19、CYP2C7、CYP4A3、CYP4A8、CYP2C22、CYP4A1、CYP4F5、CYP4F6、CYP2A1 であった(表 1)。この中で、mRNA レベルが上昇したのは CYP19、CYP4A8、CYP2A1 であった。

CYP19 および CYP4 ファミリーは、環境化学物質以外の生理的要因(エストロゲンなどの性ホルモンや脂肪酸)によって、その発現が調節を受けることが報告されている。そこで、今回は、外来化学物質の代謝を行っている CYP2A サブファミリーに注目した。

表 1 ラット血液に発現する P450 と AhR リガンド曝露による発現変動

CYP 分子種	コントロール群 に対する発現比
CYP2C7	0.01
CYP4A3	1.01
CYP4A8	1.43
CYP2C22	0.71
CYP19	2.20
CYP4A1	0.33
CYP4F5	0.10
CYP4F6	0.46
CP2A1	1.57
CYP2C7	0.01

### 2. ヒトの CYP2A6 発現調節

CYP2A サブファミリーはげっ歯類では、上流域に XRE (Xenobiotic response element)

を持ち、AhR リガンドでその発現が誘導を受けることが報告されている。しかし、人における CYP2A6 の発現調節はあまり報告が無く、AhR によって調節を受けているかどうか不明である。そこで、まず、ヒト CYP2A6 の上流域を *in silico* で検索したところ、10K 上流に XRE のコンセンサス配列 CACGC が存在した。エンハンサー配列は TATA 配列の 50K 上流まで機能するとの報告もある。

そこで、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞に AhR リガンドの 1 つベンゾピレンを曝露したところで、CYP2A6 の mRNA レベルが上昇した(図 1)。

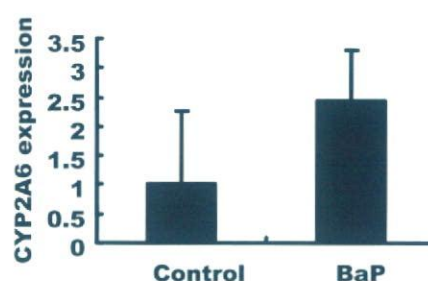


図 1 ベンゾピレンに曝露した HepG2 の CYP2A6 mRNA の発現変動

### 3. 母体血に発現する CYP2A6 とダイオキシン類

ヒト CYP2A6 が AhR リガンドによって発現誘導を受けることが明らかとなった。そこで、次に、AhR リガンドで発現が誘導される CYP2A6 について、その発現量と、血液のダイオキシン類との相関を調べた。ダイオキシン類は、PCDD、PCDF、coplanar-PCB を TEQ (Toxic Equivalent: 毒性等価量) 値に換算し、その総和を求めた。妊婦 40 人の血液に発現する P 450 分子種 CYP2A6 mRNA 発現レベルと TEQ 値を示す(図 2)。

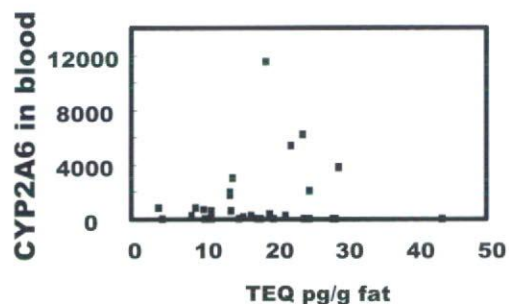


図2 ヒト血液の CYP2A6 mRNA 発現と TEQ 値

ダイオキシン類と CYP2A6 の発現量との間に有意な相関は得られなかった。さらに、AhR の mRNA の発現レベルを測定し、CYP2A6 との相関を調べたところ、有意な相関は得られなかった。

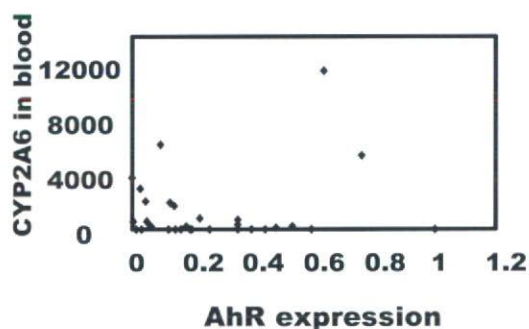


図3 ヒト血液の AhR mRNA と CYP2A6 mRNA の発現

#### 4. ヒト血液に発現するその他の P450

培養リンパ球では、ダイオキシン類の曝露によって CYP1B1 の発現が上昇することが報告されている。そこで、ダイオキシン類の測定を行った母体血サンプルを用いて CYP1B1 の発現量を測定した。図には示さないが、AhR の発現量と CYP1B1 の発現量との間に、有意な相関は得られなかった。

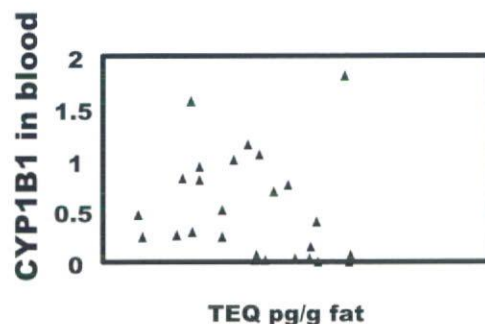


図4 ヒト血液の CYP1B1 mRNA 発現と TEQ 値

また、CYP1A1 以外に、ダイオキシン類で誘導が報告されている DT ジアホラーゼ (NQO1) についても測定を行ったが、ヒトの血液では、発現が低く、全てのサンプルでは検出することが出来なかった。

P450 の発現調節因子として、AhR 以外に、外来化学物質を代謝する CYP2B および CYP3A のレギュレーターである CAR についても測定を行ったが、同様に、発現シグナルが弱く、検出することが出来なかった。

#### D. 考察

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。

一方、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。最近では、CYP2A6 は



外来化学物質の受容体となっている PXR によってもその発現が調節されているとの報告があり、複合汚染の観点からは、他の環境化学物質との相関についても調べる必要があると考えられた。

#### E. 結論

血液では、他の P450 分子種に比べると CYP2A6 は比較的発現レベルが高かった。CYP2A6 および CYP1B1 は AhR によって発現制御を受けていることが我々の実験も含めて示唆されたが、CYP1A1 以外の P450 分子種では、mRNA の発現と血液に蓄積するダイオキシン類との間に、相関関係は得られなかった。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Ishizuka M, Nagai S, Sakamoto QK, Fujita S. Plasma pharmacokinetics and CYP3A12-dependent metabolism of c-kit inhibitor imatinib in dogs. *Xenobiotica*. (in press)
2. Kim HS, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Di-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses tamoxifen-induced apoptosis in GH3 pituitary cells. *Arch Toxicol*. (in press)
3. Ishizuka M, Okajima F, Tanikawa T, Min H, Tanaka KD, Sakamoto KQ, Fujita S. Elevated warfarin metabolism in warfarin-resistant roof rats (*Rattus rattus*) in Tokyo. *Drug Metab Dispos*. 35(1):62-6. (2007)
4. 谷川力、石塚真由美、藤田正一、ワルファリン抵抗性と感受性クマネズミに対するジフェチアロン製剤の効力 *衛生学会誌* 57(4): 355-359 (2006)
5. Muzandu K, Ishizuka M, Sakamoto KQ, Shaban Z, El Bohi K, Kazusaka A, Fujita S. Effect of lycopene and beta-carotene on peroxynitrite-mediated cellular modifications. *Toxicol Appl Pharmacol*. 215(3):330-40.(2006)
6. Ishizuka M, Lee JJ, Masuda M, Akahori F, Kazusaka A, Fujita S. CYP2D-related metabolism in animals of the CYP2D superfamily - species differences. *Vet Res Commun*. 30:505-12. (2006)
7. Jinno A, Maruyama Y, Ishizuka M, Kazusaka A, Nakamura A, Fujita S. Induction of cytochrome P450-1A by the equine estrogen equilenin, a new endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 98(1):48-55. (2006)
8. Sasaki S, Kondo T, Sata F, Saijo Y, Katoh S, Nakajima S, Ishizuka M, Fujita S, Kishi R. Maternal smoking during pregnancy and genetic polymorphisms in the Ah receptor, CYP1A1 and GSTM1 affect infant birth size in Japanese subjects. *Mol Hum Reprod*. 12(2):77-83. (2006)

## 2.学会発表

1. 神谷未知、高菅卓三、谷川力、石塚真由美、藤田正一 野生ドブネズミに蓄積する環境汚染物質と生体影響の解析 第33回日本トキシコロジー学会学術年会
2. 関姫、岡島史絵、谷川力、石塚真由美、藤田正一 ワルファリン耐性クマネズミにおける耐性機構の解明 第33回日本トキシコロジー学会学術年会
3. Gihan Moustafa, Zein Ibrahim, Kentaro Q Sakamoto, Yoshiharu Hashimoto, Mayumi Ishizuka, Shoichi Fujita. Down regulation of male specific Cytochrome P450 by Profenofos. 第142回日本獣医学会
4. 坂本健太郎 野外環境下における動物の行動生理学研究 第31回日本比較内分泌学会大会
5. 酒井紀彰、坂本健太郎、石塚真由美、藤田正一 Dark Agouti ラットにおけるCYP2D2mRNA 低発現機序の解析 第127回 日本薬学会年会

## 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

## バイオマーカーcytochrome P450に関する研究（複合汚染に対するバイオマーカー）

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 bi-phenyls) 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。