

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19年度 総合研究報告書

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

平成20(2008)年4月

目次

I. 総合研究報告書	
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. 研究成果の刊行に関する一覧表	—— 27
III. 研究成果の刊行物・別刷	—— 30

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
総合研究報告書

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。

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て乳がん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では、血漿中イソフラボンと乳がんリスクの関連を検討し、血漿中ゲニステイン濃度の高い女性において乳がんリスクの低下が示唆された。また前立腺がんのコホート内症例対照研究は、内因性ホルモンおよびイソフラボン類の分析を終え、有機塩素系農薬類とPCB類の分析を行っている。

平成13年度に開始した乳がんの症例対照研究は、平成18年度までに分析が終了した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検討したところ、いずれも血清中濃度の高い群における乳がんリスクの上昇は観察されなかった。また質問票から算出したイソフラボン摂取量とエストロゲン受容体遺伝子およびエストロゲン合成に関与する遺伝子の多型データを用いて乳がんリスクとの関連および交互作用を検討したところ、イソフラボン摂取と乳がんリスクの間には有意な負の関連が見られ、さらにエストロゲン受容体 β 遺伝子多型、17 β -HSD1遺伝子多型およびSHBG遺伝子多型との間に交互作用を示唆する結果が得られた。

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20年2月時点で、前立腺がん症例341例、対照953例を収集し、さらに継続中である。症例対照収集後に解析する候補遺伝子の検討では、喫煙者においてGSTA1およびGSTT1の遺伝子多型が前立腺がんの発癌感受性に関与していること、および喫煙者においてXPD Exon 10の遺伝子多型が尿路上皮がんの発癌感受性に関与していることを示唆する結果が得られた。またGSTと前立腺がんとの関連性についてレビューしたところ、研究のすべてが症例対照研究であり、現時点での結論としてはネガティブであった。

子宮内膜症の症例対照研究では、尿中ビスフェノールA、尿中カドミウムおよび尿中フタル酸モノエステル類との関連を検討したが、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。

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。2007年11月末までに出版された、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原著論文を同定しレビューを行った。日本人を対象にしたがんに関する報告は存在せず、日本人における実証的検討をさらに進めるとともに、国際的な研究成果を踏まえて情報提供を行うことの重要性が示唆された。

分担研究者

加藤貴彦 熊本大学大学院医学薬学研究部・公衆衛生・医療科学・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・乳腺・甲状腺外科部長
小沼 博 長野赤十字病院・乳腺・甲状腺外科副部長
西村秀紀 長野市民病院・外科部長
草間 律 北信総合病院・外科部長
黒田嘉紀 宮崎大学医学部・社会医学講座・助教授
中尾裕之 宮崎大学医学部・社会医学講座・助手
小宮康裕 宮崎大学医学部・社会医学講座・大学院生
大森久光 熊本大学大学院 公衆衛生・医療科学分野 准教授
辻 真弓 熊本大学大学院 公衆衛生・医療科学分野 助教
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がホルモン関連腫瘍の発生に関連するか否かを明らかにすることを目的とした疫学研究を行う。生殖器系及び乳腺の悪性新生物と化学物質曝露との関連については症例対照研究および既存の前向きコホート研究(厚生労働省研究班による多目的コホート研究)において収集された保存生体試料を用いたコホート内症例対照研究で検証する。子宮内膜症の症例対照研究では、既に収集したデータを用いて検証する。また、平成11年度から続けている疫学研究の文献的検討と情報公開を行う。

B. 研究方法

1. 既存の前向きコホート研究におけるコホート内症例対照研究

1-1. 乳がんのコホート内症例対照研究

1-1-1. 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)の時点で乳がんに罹

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。

1-1-2. 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。

1-1-3. 測定対象物質

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。

1-1-4. 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)を条件付ロジスティック回帰分析を用いて検討する。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。

血漿中イソフラボン濃度と乳がんリスクの検討では、対照群の血中濃度の四分位点に基づいて四群に分け、条件付ロジスティック回帰分析を用いて、出産数と出産年齢で調整したオッズ比を算出した。

(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。

1-2. 前立腺がんのコホート内症例対照研究

1-2-1. 対象者

岩手県二戸、秋田県横手、長野県佐久、沖縄県中部(以上、1990年開始のコホートI)、茨城県水戸、新潟県柏崎、高知県中央東、長崎県上五島、沖縄県宮古、大阪府吹田市(以上、1993年開始のコホートII)の10保健所管内に研究開始時点に在住していた男性地域住民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。

1-2-2. 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。

1-2-3. 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。

1-2-4. 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)を条件付ロジスティック回帰分析を用いて検討する。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。

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に近い1名とした。最終的に症例405例と同数の対照を収集した。

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 標識体のシリンジ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.社に委託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

有機塩素系化合物と乳がんの関連については、対照群の四分位点に基づいて四群に分け、条件付ロジスティック回帰分析で多変数調整済みオッズ比を計算した。また、乳がんはホルモンレセプター陽性・陰性でリス

ク因子が異なることが考えられるため、一般化ロジットモデルを用いて多項ロジスティック回帰分析を行い、ホルモンレセプター別の乳がんについてオッズ比を計算すると同時に効果の差を検定した。共変量として乳がん検診受診歴・初経年齢・初産年齢・産児数・授乳経験・閉経状態と閉経年齢・喫煙状況・乳がん家族歴・魚介類の粗一日摂取量・野菜の粗一日摂取量・血清中総脂質濃度・Body mass indexを調整した。

イソフラボン摂取と乳がんの関連を検討するために、食物摂取頻度調査票の回答をもとにゲニステインとダイゼニン摂取量を算出した。厚生労働省研究班による多目的コホート研究における食物摂取頻度調査票の妥当性研究では、食事記録と食物摂取頻度調査票から算出したエネルギー調整の摂取量のスピアマンの相関係数が、ゲニステインでは0.59、ダイゼニンでは0.60であった。今回の検討では、ゲニステインとダイゼニンの摂取量の和をイソフラボン摂取量として解析に用いた。

今回の検討に用いた遺伝子多型データは、エストロゲン受容体 α 遺伝子多型として、rs9340799、rs1913474、rs2234693、エストロゲン受容体 β 遺伝子多型として、rs4986938とrs1256049である。またエストロゲン合成に関与する遺伝子多型として、cytochrome P450c17 α (CYP17)遺伝子のrs743572、アロマトラーゼ(CYP19)遺伝子のrs10046、17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type I (17 β -HSD1)遺伝子のrs605059、sex hormone-binding globulin (SHBG)遺伝子のrs6259を用いた。いずれもハーディー・ワインバーグ平衡の条件を満たしていた。

統計解析は、エネルギー摂取量が極端な者(500kcal未満または4000kcal以上)を除外した390ペア、あるいは血液検体のない者をさらに除外した388ペアを対象とした。残差法によるエネルギー調整摂取量を用いて、

対照群の分布に基づき3群に分け、最小摂取群に対するオッズ比を条件付ロジスティック回帰分析により算出した。また受容体別の乳がんをエンドポイントとした解析は、多項ロジスティック回帰分析を用いた。交互作用の検討は、交互作用を含むモデルと含まないモデルの間のモデルカイ2乗値の差を用いてp値を算出した。調整変数として、マッチング要因である年齢、地域に加え、閉経状態、閉経年齢、出産数、乳がん家族歴、喫煙を用いた。

(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、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、ホルモンレセプター、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190名の前立腺がん患者と294名の対照者を用い、代表的な第2相薬物代謝酵素であるglutathione S-transferase (GST) A1、GSTT1、GSTM1、GSTP1の遺伝子多型の頻度を比較検討した。

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、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。

3-3. 分析対象候補遺伝子の検索

サンプル収集後に解析対象とする候補遺伝子について検索し整理することと、検索された候補遺伝子と前立腺がんとの関連性についての既存データの確認を目的とし、論文レビューを行った。

(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で研究が承認されている。また全研究対象者に文書と口頭で研究の説明を行い、文書によって研究参加の同意を得ている。

4. 子宮内膜症の症例対照研究

4-1. 調査対象者および調査方法

症例および対照は東京慈恵会医科大学産婦人科で収集した、不妊症治療を目的として受診した20～45歳の未経産婦で、腹腔鏡検査を行った全員を把握、登録し、研究参加に同意した者を研究対象者とした。症

例と対照の定義は、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 $\mu\text{g/L}$ 、検量線 (0.6-20 $\mu\text{g/L}$) の相関係数は $r = 0.995-0.999$ 、2.4 $\mu\text{g/L}$ の実尿の分析における同時再現性は $\text{CV} = 8.8\%$ 、同時再現性を含む五日間の日差再現性は $\text{CV} = 19\%$ 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に委託した。尿中カドミウム濃度はカドミウムの長期累積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した。カドミウムイオンには複数の同位体が存在する。存在比の大ききで有利なイオン (m/z 112) 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 および 114 とした。一酸化モリブデンの質量干渉に対しては、キレート樹脂による固相抽出で尿を精製し、一酸化モリブデンを事前に除去した。測定には尿 0.5-2 mL を使用し、内部標準物質としてロジウム (m/z 103) を尿に既知量添加して、回収率や感度の変化を補正した。本研究では採尿・保存容器は酸洗浄していない。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。本分析法の再現性は低濃度 (0.056 $\mu\text{g/L}$; $n=5$) で $\text{CV} = 5.4\%$ 、高濃度 (4.917 $\mu\text{g/L}$; $n=5$) で $\text{CV} = 1.4\%$ であった。定量下限値は 0.011 $\mu\text{g/L}$ であり全検体からカドミウムを検出することができた。

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。

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。

4.3. 解析方法

尿中 BPA と子宮内膜症の関連の検討では、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。

尿中カドミウムと子宮内膜症の関連の検討では、カドミウム濃度は酵素法で測定した尿中クレアチニン濃度で除して解析に供した。子宮内膜症の進行度によって stage 0, I

の対象者を対照 (n = 74)、stage II-IVを症例 (n = 54)と定義し、二群間の尿中カドミウム濃度の差をWilcoxonの順位和検定を用いて比較するとともに、対照群の分布の三分位点に基づいて群分けし、ロジスティック回帰分析でオッズ比を算出した。共変量として喫煙状況・月経周期日数・Body mass indexを用いた。

尿中フタル酸モノエステル類と子宮内膜症の関連の検討では、測定した尿中フタル酸エステル代謝物濃度はクレアチニン濃度で除して解析に供した。DEHP代謝物のMEHP, MEHHP, MEOHPについては、さらにそれらの和 (Σ MEHP)とそれに占める一次代謝物MEHPの割合 (%MEHP)という変数を作成して子宮内膜症との関連を検討した。子宮内膜症の進行度によってstage 0, Iの対象者を対照 (n = 80)、stage II-IVを症例 (n = 57)と定義し、二群間の尿中フタル酸モノエステル類濃度の差をWilcoxonの順位和検定を用いて比較するとともに、対照群の分布の四分位点に基づいて群分けし、ロジスティック回帰分析でオッズ比を算出した。共変量として月経の規則性・月経周期日数を用いた。

(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

5-1. 疫学研究論文のレビュー

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。平成17年度は、その後2004年1月から2005年12月の期間に出版された、内分泌かく乱化学物質のヒト健康影響に関する疫学論文のうち、がんと子宮内膜症に関する論文のレビューを行った。

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

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

なお、本研究班に関連する取り組みとして、平成17年3月厚生労働省医薬食品局化学物質安全対策室より、「内分泌かく乱化学物質の現状と今後の取組ー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ー」が刊行された。この報告書では、本分担研究課題と同じ方法で疫学論文を検索し、2004年10月までに出版された論文のレビューを行っている。そこで、今回検索された疫学文献から、すでにこの報告書で取り上げられた文献9件を除外した(がん9件、子宮内膜症0件)。これらの重複文献を除外し、残る26件の文献についてレビューを行った(がん20件、子宮内膜症6件)。

また平成19年度に、その後2006年1月から2007年11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原著論文のうち、がんと子宮内膜症に

関する論文のレビューを行った。

米国立医学図書館の医学文献データベースPubMedを用いた文献検索を、2007年12月1日に実施した。検索の際に用いたキーワードは、平成17年度に行った文献検索の際に用いたキーワードと同じものである。

検索によりヒットした候補文献は、がんが248件、子宮内膜症が20件だった。これらの候補文献のタイトルと抄録をもとに内容を調査し、26件の文献を選択した(がん19件、子宮内膜症7件)。

5-2. 因果関係評価の方法論の検討

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

1-1. 乳がんのコホート内症例対照研究

分析が終了した項目のうち、イソフラボン類(ゲニステイン、ダイゼイン)と乳がんの関連を検討した。

ゲニステイン濃度は症例群で131.8ng/mL、対照群で144.5 ng/mLであり、乳がんリスクとの間に有意な負の関連が観察された(傾向性の検定 $p=0.02$)。一方、ダイゼイン濃度は、症例群で16.7ng/mL、対照群で17.9 ng/mLであり、乳がんリスクとの間には負の関連は見られなかった(傾向性の検定 $p=0.54$)。最低濃度群に対する最高濃度群のオッズ比(95%信頼区間)は、ゲニステインが0.34(0.16-0.74)、ダイゼイン0.71

(0.35-1.44)であった。また対照群のゲニステイン濃度の中央値(ng/mL)は、最低濃度群が31.9、最高濃度群が353.9であった。さらにベースライン調査時の閉経状態で層別したところ、ゲニステイン濃度が最低群に対する最高群のオッズ比(95%信頼区間)は、閉経前が0.14(0.03-0.69)(傾向性の検定 $p=0.20$)、閉経後が0.36(0.12-1.12)(傾向性の検定 $p=0.10$)であり、明らかな違いは観察されなかった。

1-2. 前立腺がんのコホート内症例対照研究

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)とイソフラボン類(ゲニステイン、ダイゼイン、イコール)の分析を終えた。また、有機塩素系農薬類とPCB類は分析中である。

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

血清中濃度の中央値は総PCBsで170(症例群)、180(対照群) ng/g 脂肪、*p,p'*-DDEで360(症例群)、370(対照群) ng/g 脂肪であった。今回測定した物質では症例群の方が濃度が高い物質はなく、血清中濃度が高いほど乳がんリスクが増加しているという関連も見られなかった。むしろ、総PCBsや*cis*-ノナクロール、マイレックスの濃度との間に単調な負の関連が見られた。たとえば、PCBs総濃度のオッズ比は最低濃度群を参照カテゴリとして0.79、0.57および0.33(95%信頼区間0.14-0.78)であった(P for trend = 0.008)。

サブタイプ別や閉経前後の解析結果においても、ER+PR+乳がんを含め乳がんリスク上昇に関連している物質は見られなかった。総PCBsやマイレックスの血清中濃度はER+PR-乳がんとの間で、*trans*-ノナクロールや*cis*-ノナクロールはER-PR-乳がんとの間で有意に負に関連しており、それぞれ別のサブタイプの乳がんとは効果に差が見られた。

閉経前後で層別した場合、関連の傾向が異なっていた。年齢で層別した場合も同様であった。

2-2. イソフラボン摂取と乳がんの関連

イソフラボン摂取量(mg/day)の平均値は、症例群が43.5、対照群が46.1であった。イソフラボン摂取量の最小群を基準とした乳がん罹患に対する調整オッズ比(95%信頼区間)は、中間群が0.82(0.56-1.21)、最高群が0.85(0.56-1.29)であった。閉経前後で層別すると、閉経前では負の関連が見られなかったが、閉経後では最小群に対する最大群の調整オッズ比が0.59(0.37-0.96)、傾向性の検定は $p=0.04$ で有意なリスク低下が観察された。さらに乳がんをエストロゲン受容体とプロゲステロン受容体の組み合わせによって分類し、イソフラボン摂取との関連を検討したが、有意な違いは見られなかった。

次にエストロゲン受容体遺伝子及びエストロゲン合成に関与する遺伝子の多型と乳がんリスクの関連を検討したところ、エストロゲン受容体 α 遺伝子多型のうち、rs9340799のGアレルを持つ群とrs2234693のCアレルをもつ群で有意な乳がんリスクの低下が観察された。この関連は特に閉経後で顕著であった。その他の遺伝子多型については乳がんリスクとの間に関連は観察されなかった。

さらに遺伝子多型で層別してイソフラボン摂取と乳がんリスクとの関連を検討した。エストロゲン受容体 β 遺伝子のrs4986938で層別したところ、GGアレルを持つ群に限って負の関連が観察された(p for interaction = 0.12)。特に閉経後において有意な負の関連が見られたが(p for trend = 0.01)、交互作用の p 値は0.13であった。同様に17 β -HSD1遺伝子のrs605059で層別したところ、GA+AAの群に限って負の関連が観察された(p for interaction = 0.06)。特に閉経後において有意な負の関連が見られたが(p for trend = 0.02)、交互作用の p 値は0.35で

あった。またSHBG遺伝子多型のrs6259で層別したところ、閉経後に限ってGGアレルを持つ群で有意な負の関連が観察され(p for trend < 0.01)、交互作用のp値も0.04と有意であった。その他の遺伝子多型については、多型間による違いは観察されなかった。

3. 前立腺がんの症例対照研究

3-1. 症例、対照の収集

プロトコールに従って症例、対照を収集し、平成20年2月時点で、前立腺がん症例341例、対照953例を収集し、さらに継続中である。

3-2. 解析候補遺伝子検討のためのパイロット研究

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

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。

3-3. 分析対象候補遺伝子の検索

PubMedを活用し、これまでに前立腺がんを含めた様々ながんとの関連性が報告されている遺伝子、遺伝子多型を検索し、表としてまとめた。その分類は、1)薬物代謝酵素26種類 2)ホルモン代謝酵素2種類 3)核酸代謝1種類 4)栄養・嗜好品代謝8種類 5)レセプター遺伝子7種類 6)炎症・免疫反応関連8種類 7)DNA修復9種類 8)細胞周期調節2種類 9)酸化ストレス関連6種類 10)がん・がん抑制遺伝子3種類 11)細胞成長・増殖3種類の合計75種類である。

前立腺がんとグルタチオン S-トランスフェラーゼ(Glutathione S-transferase, GST)との関連性に関してレビューを行った。GSTは代表的な第2相薬物代謝酵素であり、前立腺がんに関連する食事等に含まれる化学物質の解毒代謝と同時にステロイドホルモンの代謝にも関連している(4)。GSTには8種類の分子種があることが知られ、現在までに多数の遺伝子多型の存在が明らかになっている(5)。GSTの分子種のなかでGSTM1*0 (null)、GSTT1*0 (null)、GSTP1*A313Gとの前立腺がんリスクとの関連性については多

数の報告があり、メタアナリシスの報告もあるが、現時点での結論としてはネガティブである。

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

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. 尿中カドミウムと子宮内膜症の関連

尿中カドミウム濃度の中央値(25, 75%点)は、症例群・対照群でそれぞれ0.53(0.40, 0.73)および0.54(0.34, 0.76) $\mu\text{g/g creatinine}$ であり、両群の間で有意な差は見られなかった(p=0.88)。多変数調整オッズ比(95%信頼区間)も最低濃度群を参照カテゴリとして中濃度群・最高濃度群でそれぞれ1.69(0.64, 4.44)および0.86(0.30, 2.49)(p for trend=0.79)であり、子宮内膜症との間に関連が見られなかった。なお、子宮内膜症Stage 0を対照、Stage III-IVを症例と再定

義した場合や、三分位点の代わりに四分位点で群分けして解析した場合も同様であった。

4-3. 尿中フタル酸モノエステル類と子宮内膜症の関連

本研究ではフタル酸エステル類(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フタル酸エステル類各物質の曝露の指標として用いた。

クレアチニン補正した尿中フタル酸モノエステル類濃度を症例対照間で比較したところ、いずれの物質においても統計学的に有意な濃度差はなかった(p for difference=0.11-0.75)。最低濃度群を参照カテゴリとしたオッズ比は、MEHPでは1.00、0.87、1.06、1.84(95%信頼区間0.65-5.20)(p for trend=0.14)であり、子宮内膜症との間に関連が見られなかった。

5. 健康影響に関する疫学研究の文献的検討

5-1. 疫学研究論文のレビュー

平成17年度のレビューでは26件の文献のうち、疾患別の内訳は、がんが20件、子宮内膜症が6件だった。がんに関する文献の部位別内訳は、乳がんが10件、前立腺がんが4件、全がんおよび複数部位が3件、その他の部位が3件だった。

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

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

平成19年度のレビューでは、疾患別では、がんが19件、子宮内膜症が7件だった。が

んに関する文献の部位別内訳は、乳がんが8件、前立腺がんが10件、精巣がんが1件だった。乳がんの1件は、全がん・子宮体がん・甲状腺がんに関する結果も報告していた。また、前立腺がんの5件は、全がんに関する解析を合わせて報告していた。

研究デザイン別の内訳は、コホート研究が9件(前向き8件、後向き1件)、症例対照研究が12件(コホート内1件、住民対照5件、病院対照6件)だった。また、地域相関研究が3件、断面研究が2件だった。

研究の行われた国を見ると、欧米が主体であった。日本で行われた研究は、がんについては存在しなかったが、子宮内膜症については1件あった。

5-2. 因果関係評価の方法論の検討

(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。

(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に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。

(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では、分析が終了した血漿中イソフラボンと乳がんの関連を検討した。これまでに大豆製品・イソフラボン摂取と乳がんの関連を検討した疫学研究では、負の関連が示唆されているが、動物研究では逆にリスク上昇を示唆する結果も報告されている。また生体指標を用いた疫学研究は欧米人を対象としたものしかなく、数も少ない上に結果も一致していない。そこで本研究は、大豆製品をよく食べる日本人を対象に、比較的高い濃度でのイソフラボンの乳がんリスクに対する影響を検討したところ、食事から摂取した範囲で到達しうる血中濃度においては、高い濃度でも乳がんリスクの上昇は見られず、むしろ血漿中ゲニステイン濃度の高い女性では、乳がんリスクの低下が示唆された。

今回の検討では、ゲニステインとの間に負の関連が観察されたが、ダイゼインとの間には関連が見られなかった。その理由としては、ゲニステインはダイゼインよりもエストロゲン受容体への結合力が強く、血中濃度が高く、半減期が長いことため、効果がよりはっきり観察された可能性が考えられる。またダイゼインは腸内細菌によって作用のより強いイコールに代謝されるが、その代謝は人によって異なり、実際に代謝できる人は30から50%程度と言われている。したがってダイゼイン濃度との関連では、イコールの影響で関連が弱められた可能性が考えられる。しかし、今回はイコール濃度が分析できなかったため、その影響を考慮することができなかった。

乳がんの症例対照研究では、平成18年度までに分析が終了した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検討したところ、いずれも血清中濃度の高い群における乳がんリスクの上昇は観察されなかった。これは乳がん罹患率が高い欧米諸国と同様の結果であった。また本研究のDDE

やPCBの結果は米国におけるアジア人を対象としたコホート内症例対照研究(6)の結果と一致していた。

本研究が観察した血清中 p,p' -DDEと乳がんリスクが関連していない結果は先のメタアナリシスの結果と一致している(7)。反対に o,p' -DDTとER+PR+乳がんリスクの減少との間には弱い関連が見られた。この o,p' -DDTと p,p' -DDEの間の結果の不一致は次のように部分的に説明されるかもしれない。まず、 p,p' -DDEはアンドロゲン様または弱エストロゲン様あるいはエストロゲン様作用なしであるが、 o,p' -DDTはDDT関連化合物の中で最もエストロゲン様作用が強い(8)。次に、 p,p' -DDTと o,p' -DDTは農薬として混合物であり物性も環境挙動も似通っていると考えられるため、血清中の p,p' -DDE濃度は p,p' -DDTのみならず o,p' -DDTの摂取量を反映しているとも考えられてきたが、実際にはヒト体内でのDDTからDDEへの代謝は非常に遅く、血中 p,p' -DDE濃度は p,p' -DDEそのものの曝露量を反映しているのかもしれない。血中 p,p' -DDE濃度が o,p' -DDT曝露量の代理指標となっていないことが考えられる。ただ、両者の血清中濃度は互いに高く相関しているため(Spearman順位相関係数0.57 ~ 0.86)、観察された関連も似ていた。本研究では先行研究よりも検出下限値がずっと低かったため o,p' -DDTをはじめとする有機塩素系農薬関連物質を100%検出し評価することができた。

本研究では血清中総PCB濃度と乳がんリスクの間に有意な負の関連が観察されたが、これは先行研究の大勢と一致していない(9)。この違いは本研究の対象集団の血中PCB濃度が先行研究に比べて低かったことも一因として考えられる。

本研究では血清中有機塩素系化合物濃度はエストロゲン関連要因に最も敏感と思われるER+PR+乳がんリスクの上昇と関連していなかった。また、必ずしも先行研究の結果

とは一致しないが、ある種の有機塩素系化合物はER+PR- またはER-PR-乳がんのリスク減少と関連していた。

閉経状態による層別解析では、血清中有機塩素系化合物濃度と乳がんリスクの関連が閉経前後で傾向が異なって観察された。さらに年齢の中央値で層別した場合も同様に似た結果が観察された。この原因としては内因性エストロゲンレベルの閉経状態による違いのほかに、年齢や時代背景の違いが考えられる。蓄積性有機塩素系化合物の体内負荷量は年齢と正に関連しているが米国やノルウェー同様日本でも経年的に減少してきている。年齢で層別した解析は蓄積性物質の健康影響を評価する際に重要である可能性が示唆された。

先行研究ではDDEや総PCB以外の物質の検出が困難で乳がんとの関連も評価されていないことが多かったが、本研究では低い検出限界で低濃度の o,p' -DDTやマイレックスを100%検出したことで乳がんリスクとの関連を十分評価することができた。

イソフラボン摂取と乳がんの関連では、閉経後女性において有意な負の関連が観察された。これは概ね先行研究と一致する結果である。しかし閉経状況別にリスクが異なるかどうかという点については、閉経前でより関連が強いという報告、閉経状況別にみてもリスクは同じという報告もあり、結果は一致していない。

イソフラボンが乳がんに対して予防的に作用するメカニズムとしては、エストロゲンに関与するものと関与しないものが想定されている。エストロゲンに関与するメカニズムとしては、エストロゲン受容体(特に β)を介して抗エストロゲン作用を示す可能性、 17β -HSD1、アロマターゼなどのエストロゲン合成に関与する酵素活性を抑制する可能性、SHBGの産生を刺激する可能性などが指摘されている。一方、エストロゲンには関与しないメカニズムとしては、アポトーシス誘導作用、チロシ

ンキナーゼ活性抑制作用、トポイソメラーゼ活性抑制作用、血管新生抑制作用、抗酸化作用などが指摘されている。

エストロゲンはエストロゲン受容体を介して乳腺細胞に作用することから、イソフラボンと乳がんの関連はホルモン受容体の発現の有無によって異なる可能性が考えられる。そこで乳がんをエストロゲン受容体とプロゲステロン受容体の組み合わせによって分類し、イソフラボン摂取との関連を検討したが、有意な違いは見られなかった。この結果はイソフラボンの作用が、エストロゲン受容体を介したものでなく、上記のようなエストロゲン合成に関与する酵素活性抑制やSHBGの産生刺激、そのほかエストロゲンには関与しないメカニズムも関与している可能性を示唆するものと考えられる。またイソフラボンとホルモン受容体別乳がんの関連を検討した先行研究は少なく、結果も一致しておらず、今後の検討課題の一つである。

イソフラボンと乳がんの関連において、遺伝環境交互作用に関する報告はほとんどなく、CYP17遺伝子のrs743572を用いた研究が1件あるのみである。これは閉経前女性を対象としたドイツの研究で、A2A2の群に限定して血漿中ゲニステイン濃度と乳がんリスクの間に負の関連を報告している。しかし摂取量との関連においてはA1A2の群で有意な負の関連が見られ、一致した結果は得られていない。今回は上記の先行研究と同じ遺伝子多型について検討したが、多型の間で関連が異なるという結果は得られなかった。

乳がん以外では、前立腺がんにおいて植物エストロゲン摂取(リグナン、イソフラボン)とエストロゲン受容体 β 遺伝子多型(rs2987983)の間に交互作用があるという報告、子宮体がんにおいてイソフラボン摂取と 17β -HSD1遺伝子多型(rs605059)の間に交互作用があるという報告がある。乳がんを含め、イソフラボン摂取と遺伝子多型の交互作用については、今後更なる検討が必要で

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おり、臨床現場の理解が得られるとともに軌道のとって収集ができるようになった。今後は順調に登録がすすむことが期待される。

症例収集終了後の解析対象とする遺伝子を検討するために、過去に収集された190名の前立腺がん患者と294名の対照者を用い症例対照研究を行った。EDCやホルモンを含めた環境中化学物質の代表的な第2相薬物代謝酵素であるglutathione S-transferase (GST) A1、GSTT1、GSTM1、GSTP1について検討した。喫煙と前立腺がんとの関連については未だ見解が分かれている。タバコ煙にはラットの膀胱癌に変異を起こす2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine (PhIP) などのGSTA1によって代謝される物質やジクロロメタンなどのGSTT1によって代謝活性化される物質も含まれる。本研究の結果、喫煙者においてGSTA1およびGSTT1の遺伝子多型が、前立腺がんの発癌感受性に関与していることが示された。これらの結果から、PhIP、ジクロロメタンなどの環境要因と遺伝要因との相互作用が前立腺がんの発生の一因となっている可能性が示唆された。

尿路上皮がん患者とその対照を用いたパイロット研究では、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(10)。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(11,12)。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、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。

分析対象とする候補遺伝子に関する情報を収集し、表としてまとめた。また、2007年8月までの論文を調査し、前立腺がんとGST遺伝子多型との関連性についてレビューを実施した。前立腺がんとの関連において、最も蓄積のあるGST遺伝子多型であるが、研究のすべてが症例対照研究であり、最大の症例数は590例であった(13)。このレビューの結果から我々の企画している研究は、十分に国際レベルであることが明らかとなった。

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、血清中PCB類36項目、血清中有機塩素系農薬類13項目との関連を検討し、これらの化学物質はいずれも子宮内膜症とは関連しておらず、子宮内膜症の発症にこれら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