

図5. 母体血清 (n=24), 臍帯血清 (n=26) 及び羊水 (n=15) 中のMEHP濃度の分布 (ボックスプロット図) 作図にあたっては、定量下限未満においても分析上の実測値を活用した。

化学物質の子どもへの健康影響に関するエピジェネティクス評価法の開発

周産期の母親の毛髪及び羊水中多元素一斉分析による
新たな暴露評価手法に関する研究

主任研究者	牧野恒久	有隣厚生会東部病院
分担研究者	中澤裕之	星薬科大学
研究協力者	林 留美子	愛知県衛生研究所
	近藤文雄	愛知医科大学
	杉野法広	山口大学

研究要旨

マイクロ波分解法を用いた前処理法と誘導結合プラズマ質量分析 (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry; ICP-MS) 法を組み合わせた毛髪及び羊水中の多元素一斉分析法を確立した。測定対象元素は、毛髪では 24 元素、羊水では 20 元素とした。毛髪及び羊水中に標準品を添加 (毛髪中濃度として 1~500 ppm、羊水中濃度として 0.0250~25.0 ppm) して行った回収試験では、毛髪 (n=5) では回収率が 91~110%、変動係数が 0.34~7.3%、羊水 (n=3) では回収率が 82~105%、変動係数が 0.43~3.5%と良好な結果を示した。

確立した毛髪中の多元素一斉分析法を用いて、愛知県衛生研究所職員 35 名 (男 23 名、女 12 名) の毛髪の分析を行った。その結果、分析を行った 24 元素の値は、これまでの ICP-MS 法による報告値と同程度であった。

A. 研究目的

平成 17 年度から 19 年度に実施した「化学物質による子どもへの健康影響に関する研究」において、一般人での暴露量が多い重金属類、フタル酸エステル類、揮発性有機化合物の生体試料中の分析法を確立した。さらに、確立した分析法を用いて生殖年齢女性 (東海大学医学部附属病院産婦人科受診患者) の血中及び尿中濃度を測定し、子宮内膜症との因果関係を比較検証した。血清中の重金属類濃度を、子宮内膜症有症群 (n=36) と子宮内膜症を認めない対照群 (n=48) で比較した結果、銅とセレンにおいて有症群が対照群より有意に低い ($p < 0.01$) 値を示した。

毛髪中には水銀、ヒ素、鉛などの重金属類が蓄積しやすい特徴があり、毛髪を試料とすることにより数ヶ月から数年という比較的長期間の情報を得ることができると期待される。また、胎児は子宮内

で羊水中に直接接しており、羊水は胎児の有害元素に対する暴露源になると考えられる。本研究では、マイクロ波分解法を用いた前処理法と誘導結合プラズマ質量分析 (Inductively Coupled Plasma; ICP-MS) 法を組み合わせた毛髪及び羊水中多元素一斉分析法の確立と、それを用いた周産期母子の重金属類を含む多元素に対する新たな暴露評価手法を検討する。

研究初年度は、マイクロ波分解法を用いた前処理法と ICP-MS 法を組み合わせた毛髪及び羊水中の多元素一斉分析法を確立する。2、3 年目は、周産期の母親の毛髪及び羊水中の分析と解析を実施する。

B. 研究方法

1. 対象者及び試料

研究目的の十分なインフォームドコンセントを行い、承諾の得られた山口大学医学部附属病院産科婦人科受診患者 (以下「患者」と省略する。) の毛髪、羊水、

及び愛知県衛生研究所職員の毛髪を使用した。

(倫理面への配慮) 試料の採取及びその取り扱い、山口大学医学部及び愛知県衛生研究所の倫理規定に従った。

2. 試薬及び材料

測定元素標準品は ICP Multi-Element Standard (AccuStandard)、内部標準元素のスカンジウム(Sc)、イットリウム(Y)、イリジウム(Ir)は ICP 標準液(メルク)を使用した。毛髪標準試料は CRM397 (COMMUNITY BUREAU OF REFERENCE-BCR) を使用した。

3. 測定項目

毛髪; リチウム、ホウ素、マグネシウム、アルミニウム、カルシウム、マンガン、鉄、コバルト、ニッケル、銅、亜鉛、ヒ素、セレン、ルビジウム、ストロンチウム、モリブデン、銀、カドミウム、スズ、アンチモン、バリウム、水銀、鉛、ビスマス (24 元素)

羊水; 毛髪の測定項目 24 元素からヒ素、銀、スズ、ビスマスを除いた 20 元素。

4. 器具の洗浄

ピペットチップ、サンプルカップ等の使用器具は、10 %硝酸槽に一夜浸漬し、水道水及びイオン交換蒸留水で十分に洗浄した。使用前に超純水で洗浄した。

5. 試料の前処理法

毛髪; はさみで細切し、中性洗剤で洗浄後水洗した。少量のアセトンで洗浄後、乾燥した。洗浄後の毛髪 70 mg をマイクロ波分解用容器(MV-7 専用 PFA 小容器、ジーエルサイエンス製)に入れ、硝酸 2.0 mL を添加後、電子レンジ(200 W)で 5 分、2 回加熱後、氷中で 1 時間冷却した。

羊水; 羊水 0.7 mL をマイクロ波分解用容器に入れ、毛髪と同様に分解操作を行った。

6. 試験溶液の調製法

前処理法に従って酸分解後、分解液を

ポリエチレン製遠沈管 (15 mL) に入れ、内部標準溶液(Sc, Y, Ir 各 200 ppb) 0.7 mL を添加後、超純水で 7 mL にメスアップした。

7. ICP-MS 条件

装置: ICP-MS (Agilent 7500i、横河アナリティカルシステムズ)

測定条件:

RF パワー; 1500 W

サンプリング位置; 8 mm

プラズマガス; Ar 15 L/min

ネブライザ; バビントン型

内部標準元素; Sc(45)、Y(89)、Ir(193)

干渉補正式;

$$\text{Se}(78) = (78) * 1 - (76) * 0.1869$$

8. 定量法

試験溶液を ICP-MS に導入し、各元素のカウント数を内部標準のカウント数で割った数値と、標準溶液のそれと比較して定量した。

C. 結果と考察

1. 毛髪中の多元素一斉分析法

毛髪試料に 24 元素の標準品を添加 (毛髪中濃度として 1~500 ppm) し、マイクロ波分解法で酸分解後分析を行った。その結果、各元素の回収率が 91~110%、変動係数が 0.34~7.3% と良好な結果を示した (表 1)。

2. 毛髪標準試料の分析

5 元素の表示値が示された毛髪標準試料(CRM397)を、マイクロ波分解法で酸分解後分析を行った。その結果、平均値はすべての元素で表示値とほぼ同じ値が得られ、また、標準試料に添付された 95% 信頼値範囲内に入っていた (表 2)。さらに、変動係数も 2.7~5.8% と良好な結果を示した (表 2)。

3. 成人の毛髪中多元素濃度レベル

愛知県衛生研究所職員 35 名 (男 23 名、女 12 名) の毛髪の分析を行った。その結

果、カルシウム濃度（中央値）が 950 ppm と最も高く、次いで、亜鉛が 150 ppm、マグネシウムが 61 ppm と高く、計 9 元素が ppm オーダーで検出された（表 3）。なお、分析を行った 24 元素の値は、これまでの ICP-MS 法による報告値と同程度であった。

4. 羊水中の多元素一斉分析法

羊水試料に 20 元素の標準品を添加（羊水中濃度として 0.0250～25.0 ppm）し、マイクロ波分解法で酸分解後分析を行った。その結果、各元素の回収率が 82～105 %、変動係数が 0.43～3.5 % と良好な結果を示した（表 4）。

D. 結論

1. マイクロ波分解法による前処理法と ICP-MS 法を組み合わせた毛髪中の多元素一斉分析法を確立した。本法により 24 元素の一斉分析が可能であった。

2. 上記分析法を用いて成人の毛髪を分析した結果、得られた値はこれまでの報告値と同程度であった。

3. マイクロ波分解法による前処理法と ICP-MS 法を組み合わせた羊水中の多元素一斉分析法を確立した。本法により 20 元素の一斉分析が可能であった。

E. 参考文献

1) 近藤ら、「化学物質による子どもへの健康影響に関する研究」平成 19 年度総

括・分担研究報告書 p54-62.

2) Rodushkin I. et al. Application of double focusing sector field ICP-MS for multielemental characterization of human hair and nails. Part II. A study of the inhabitants of northern Sweden, Sci. Tot. Environ. 2000; 262: 21-36.

3) Rodushkin I. et al. Application of double focusing sector field ICP-MS for multielemental characterization of human hair and nails. Part II. A study of the inhabitants of northern Sweden, Sci. Tot. Environ. 2000; 262: 21-36.

4) Yonei Y. et al. Research on toxic metal levels in scalp hair of Japanese, Anti-aging Medical Research 2005; 2: 11-20.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし

表1 毛髪からの24元素の回収率

元素	添加量 (ppm)	回収量 (ppm)	回収率 (%)	変動係数 (%)
Ca	500	500	100	0.39
Fe	50	50	99	4.3
Mg	25	23	91	0.62
Zn	25	23	92	1.3
Cu	10	10	102	1.9
Sr	10	9.8	98	0.50
Ag	5	4.7	93	2.2
Al	5	5.0	101	1.9
As	5	4.6	91	0.79
B	5	5.3	105	0.91
Ba	5	5.0	100	1.5
Cd	5	4.7	93	2.5
Co	5	4.9	98	0.57
Mn	5	5.0	99	1.2
Mo	5	5.2	103	2.6
Ni	5	5.0	100	2.0
Pb	5	5.0	99	0.34
Sb	5	5.5	110	0.96
Se	5	4.9	97	2.2
Hg	2.5	2.5	100	0.63
Li	2.5	2.5	98	7.3
Sn	2.5	2.7	108	0.83
Bi	1	1.1	110	1.2
Rb	1	0.98	98	0.56

n=5

表2 毛髪標準試料(CRM397)の分析

(ppm)

元素	平均値±標準偏差	変動係数(%)	表示値	95%信頼値範囲
Zn	200 ± 7.0	3.6	199	190 ~ 210
Pb	33 ± 1.9	5.8	33.0	31 ~ 35
Hg	11 ± 0.30	2.7	12.3	11 ~ 13
Se	2.0 ± 0.095	4.7	2.00	1.8 ~ 2.2
Cd	0.49 ± 0.027	5.4	0.521	0.47 ~ 0.57

n=5

表3 成人の毛髪中多元素濃度

(濃度単位: ppm*、ppb)

元素	中央値	範囲
Ca*	950	280 - 4000
Zn*	150	92 - 500
Mg*	61	19 - 300
Cu*	17	8.4 - 140
Fe*	7.8	5.5 - 25
Al*	4.6	1.4 - 16
Sr*	3.8	0.41 - 20
Hg*	3.1	0.63 - 7.4
Ba*	1.9	0.1 - 8.9
Pb	860	140 - 7600
Se	750	19 - 510
B	480	97 - 9500
Ni	260	100 - 3600
Ag	250	34 - 26000
Mn	180	97 - 750
Sn	160	67 - 770
Rb	62	5.8 - 420
Mo	43	28 - 110
As	33	6.6 - 88
Co	22	2.2 - 1600
Sb	18	7.0 - 82
Cd	16	4.1 - 89
Li	7.9	4.4 - 65
Bi	5.2	1.7 - 120

n=35[男23、女12]

表4 羊水からの20元素の回収率

元素	添加量 (ppm)	回収量 (ppm)	回収率 (%)	変動係数 (%)
Ca	25.0	25.7	103	3.5
Fe	2.50	2.51	100	1.3
Mg	1.25	1.25	100	0.97
Al	0.250	0.250	100	1.5
B	0.250	0.233	93	0.43
Ba	0.250	0.249	100	0.92
Cd	0.250	0.227	91	2.5
Co	0.250	0.256	102	0.83
Cu	0.250	0.253	101	1.4
Mn	0.250	0.247	99	0.94
Mo	0.250	0.263	105	1.5
Ni	0.250	0.255	102	1.0
Pb	0.250	0.204	82	1.9
Sb	0.250	0.263	105	1.3
Se	0.250	0.239	96	2.3
Sr	0.250	0.249	100	1.1
Zn	0.250	0.252	101	0.50
Li	0.125	0.107	86	0.97
Rb	0.125	0.128	102	1.2
Hg	0.0250	0.021	84	1.4

n=3

胎内環境中に存在する化学物質の把握に関する研究

主任研究者 牧野 恒久 有隣厚生会東部病院

研究要旨

本研究は、次代の社会の担い手である子どもを取りまく胎内環境中のどのような化学物質が児の健康に影響を及ぼすか、どの程度の暴露量が児の健康障害に結びつくのかを解明することを目的としている。まず本年度は、種々の化学物質（有機フッ素系化合物、ピレスロイド系殺虫剤、有機リン系農薬、ジエチルヘキシルフタル酸、ニコチン代謝物、重金属、など）の母体血、臍帯血、母体尿、母体毛髪、母乳、羊水、胎脂中での濃度を測定し暴露量を把握することを目的とした。そこで、本研究の分担として、我々は、37週0日から41週6日までの分娩予定の正常単胎妊婦につき、母体血と母体尿、羊水、臍帯血、胎脂、母乳、毛髪を採取した。また、生活習慣、住宅環境と生体内の化学物質濃度との関連を調べるためアンケート調査を行った。現状の試料採取法や保存法が概ね適切であり、試料中の上記化学物質が適切に測定できることが確認された。

A. 研究目的

本研究は、次代の社会の担い手である子どもを取りまく胎内環境中のどのような化学物質が児の健康に影響を及ぼすか、どの程度の暴露量が児の健康障害に結びつくのか等を新しいエピジェネティクスの手法を用いて解明することを目的としている。そのため、まず本年度は、種々の化学物質（有機フッ素系化合物、ピレスロイド系殺虫剤、有機リン系農薬、ジエチルヘキシルフタル酸、ニコチン代謝物、重金属など）の母体血、羊水、胎脂、臍帯血、母体尿、母乳、毛髪中での濃度を測定し暴露量を把握することを目的とした。

B. 研究方法

B-1. 本研究の倫理審査

山口大学医学部附属病院医薬品等治験・臨床研究等審査委員会に本研究を申請し承認を受けることとした。

B-2. 試料採取の器具生体試料採取に用いる種々の器材からの化学物質の混入の有無を調べた（図1参照）。

B-3. 生体試料

37週0日から41週6日までの分娩予定の正常単胎妊婦につき、分娩前の母体血と母体尿、分娩時の羊水、分娩後の臍帯から採取した臍帯血、出生後に児の体に付着している胎脂を採取した。また、分娩後に毛髪と母乳の提供をうけた。採取量は表1に示す。毛髪以外は-80度で保存した。

B-4. アンケート調査

生活習慣、住宅環境と生体内の化学物質濃度との関連を調べるためアンケート調査を行った。

（倫理面への配慮）

試料採取前に、同意説明書を対象者に渡し、文書および口頭による十分な説明を行い、自由意思によって参加し文書による同意が得られたものを対象とした。

C. 研究結果

C-1. 本研究の倫理審査

山口大学医学部附属病院医薬品等治験・臨床研究等審査委員会の承認を受けた。

C-2. 試料採取の器具と生体試料

胎脂採取に用いた舌圧子の包装紙と試料保存用試験管のキャップから比較的高い濃度のフタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) が検出された。その他の試料採取や保存に使用する器具による化学物質の混入はなかった。毛髪については、採取量が不十分であったため、測定感度以下である可能性がある。

C-3, 4. 採取状況

生体試料の採取は平成20年9月から開始した。採取効率については月ごとに増加している (図2参照)。本年度は54症例から試料採取と情報提供を得た。

D. 考察

・当院は周産期センターを有し、分娩の約1/3はハイリスク妊婦などの異常分娩であることを考えれば、正常単胎妊婦の多くの症例から効率よく試料が採取できるようにシステムが整ったと考えられる。

・胎脂採取に用いた舌圧子の包装紙と試料保存用試験管のキャップから比較的高い濃度のDEHPが検出されたため、代替品を検討する必要があると考えられた。

・その他の試料採取については、現状の試料採取法が適切であり、試料中の上記化学物質が適切に測定できることが確認された。

・毛髪については、採取量が増えるように採取法について対策が必要と考えられた。

E. 結論

来年度においても、上記の試料採取における問題点を解決した上で、多数検体の試料を採取する。

F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照。

G. 研究発表

1. 論文発表

Asada H, Yamagata Y, Taketani T, Matsuoka A, Tamura H, Hattori N, Ohgane J, Hattori N, Shiota K, Sugino N. Potential link between estrogen receptor- α gene hypomethylation and uterine fibroid formation. *Mol Hum Reprod* 14: 539-545, 2008.

Yamagata Y, Maekawa R, Asada H, Taketani T, Tamura I, Tamura H, Ohgane J, Hattori N, Shiota K, Sugino N. Aberrant DNA methylation status in human uterine leiomyoma. *Mol Hum Reprod* in press, 2009.

Yamagata Y, Asada H, Tamura I, Lee L, Maekawa R, Taniguchi K, Taketani T, Matsuoka A, Tamura H, Sugino N. DNA methyltransferase expression in the human endometrium: down-regulation by progesterone and oestrogen. *Hum Reprod* in press, 2009.

2. 学会発表

浅田裕美、山縣芳明、田村功、前川亮、谷口憲、竹谷俊明、松岡亜希、田村博史、杉野法広 ヒト子宮内膜における DNA methyltransferase の発現に関する検討
第 60 回日本産科婦人科学会学術講演会
2008 年 4 月 12 日～15 日 横浜市
日本産科婦人科学会雑誌 第 60 巻 第 2 号
P. 728 2008 年

浅田裕美、山縣芳明、田村功、谷口憲、前川亮、竹谷俊明、松岡亜希、田村博史、杉野法広 子宮筋腫の Estrogen receptor- α 遺伝子の DNA メチル化情報
第 81 回日本内分泌学会学術総会 2008 年 5 月 16 日～18 日 青森市
日本内分泌学会雑誌 第 84 巻 第 1 号
P. 221 2008 年

Hiromi Asada, Ken Taniguchi, Hiroshi Tamura, Norihiro Sugino
Uterine Leiomyomas Associate with DNA Hypomethylation of Oestrogen Receptor- α Gene
The 24th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, Barcelona, Spain 6-9 July 2008
Human Reproduction vol. 23 supplement 1 P. 1196 2008.

浅田裕美、山縣芳明、李理華、木塚文恵、田村功、谷口憲、前川亮、竹谷俊明、松岡亜希、田村博史、杉野法広 ヒト子宮内膜における DNA methyltransferase の発現に関する検討

第 45 回日本生殖医学会中国・四国支部学術講演会 2008 年 8 月 30 日 徳島市
日本生殖医学会雑誌 第 54 巻 第 1・2 号
P. 20 2008 年浅田裕美、山縣芳明、李理華、木塚文恵、田村功、谷口憲、前川亮、竹谷俊明、松岡亜希、田村博史、杉野法広 ヒト子宮内膜における DNA methyltransferase の発現に関する検討
第 53 回日本生殖医学会学術講演会 2008 年 10 月 23 日～24 日 神戸市
日本生殖医学会雑誌 第 53 巻 第 4 号
P. 155 2008 年

浅田裕美、山縣芳明、李理華、木塚文恵、田村功、谷口憲、前川亮、竹谷俊明、松岡亜希、田村博史、杉野法広 ヒト子宮内膜間質細胞における Insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) 遺伝子と Prolactin (PRL) 遺伝子の DNA メチル化プロファイル解析
第 13 回日本生殖内分泌学会学術講演会
2008 年 11 月 29 日 大阪市
日本内分泌学会雑誌 第 84 巻 第 2 号
P. 629 2008 年

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

図1. 試料採取に用いている器具

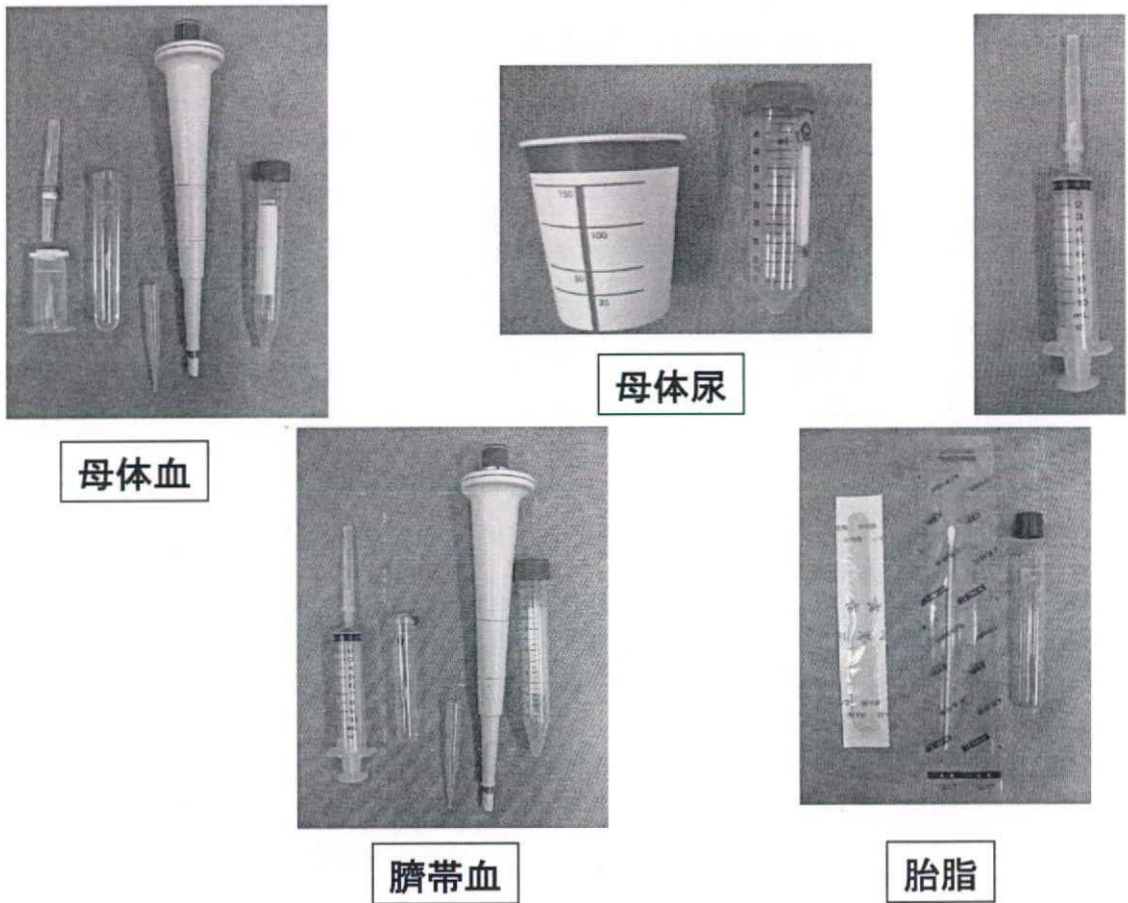
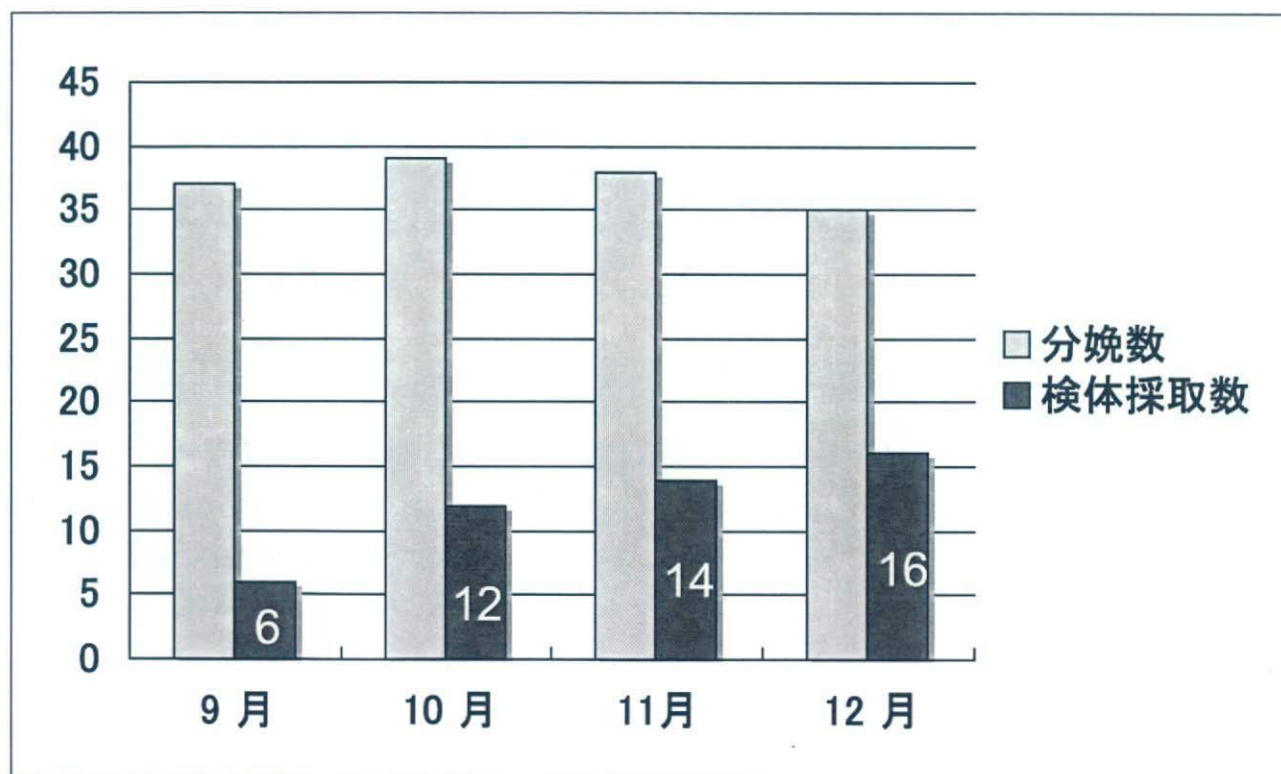


表1. 採取する試料と採取量

研究グループ	測定物質	母体血清	母体尿	毛髪	母乳	羊水	臍帯血	胎脂
星葉大	PFOS, ニコチン	2ml	10ml	-	-	-	2ml	-
埼玉	殺虫剤、BPA	2ml	10ml	-	-	-	2ml	-
大阪	フタル酸エステル	2ml	20ml	-	-	5ml	2ml	1g
大阪	PBDEs	5ml	-	-	5ml	-	-	-
愛知	重金属	-	-	0.3g	-	-	-	-

図2. 試料採取状況の推移



胎児へのエピジェネティックな影響の解析：
エピミュータゲン評価法に関する研究

主任研究者	牧野 恒久	(社)有隣厚生会東部病院
分担研究者	塩田 邦郎	東京大学農学生命科学研究科細胞生化学研究室
研究協力者	大鐘 潤	東京大学農学生命科学研究科細胞生化学研究室
	広沢-高森 瑞子	東京大学農学生命科学研究科細胞生化学研究室
	新井 良和	東京大学農学生命科学研究科細胞生化学研究室
	呉 颯英	東京大学農学生命科学研究科細胞生化学研究室

研究要旨

エピジェネティクスは DNA メチル化やクロマチン構造の変化を伴う遺伝子発現の記憶装置である。本研究はエピジェネティクスを指標として、胎児発生に影響を与える可能性のある化学物質（エピミュータゲン）のスクリーニング系を構築することを目的としている。これまでの研究より、母体中に存在する濃度でマウス ES 細胞のヘテロクロマチン形成に影響を与えるいくつかの化学物質が特定された。本研究では、特に重篤な影響の認められた DEP、および Se について、我々が開発したゲノムワイドメチル化解析法 D-REAM (T-DMR Restriction-tag-mediated amplification) 法をもとに遺伝子領域の DNA メチル化状況を解析した。その結果、母体・胎児環境中に検出される濃度で DNA メチル化に影響を与えていること、および、それらの化学物質の影響を受ける遺伝子領域が明らかとなった。以上より、エピミュータゲンのスクリーニングが可能となった。

A. 研究目的

エピジェネティクスは、塩基配列の変化を伴わない、細胞分裂後も継承される遺伝子機能を研究する学問領域である。近年、発生異常や癌など多くの疾患において、様々な遺伝子のエピジェネティック異常が病態に関連していることも明らかになりつつあり、エピジェ

ネティクスの重要性が高まっている。これまでに、様々な種類の化学物質が単離・合成され、我々の生活に多くの恩恵がもたらされてきた。しかし、一方では我々がそれらの化学物質に曝されていることも確かである。一部の化学物質は母体血中と同程度で臍帯血中からも検出さ

れており、化学物質が及ぼす胎児への影響が懸念されている。本研究では、身近に存在する化学物質が胎児発生に及ぼす影響について、初期胚のモデルと考えられるES細胞を用いたエピジェネティック解析より、胎児のエピジェネティック状況に影響を与える可能性のある化学物質（エピミュタゲン）のスクリーニング系（図1）を確立することを目的とした。

B. 研究方法

1. 化学物質暴露 ES 細胞のゲノム DNA 抽出

マウス ES 細胞をゼラチンコートディッシュ上で血清中濃度の DEP (0.1 ppb) または Se (100 ppb) を添加したものと、コントロールとして溶媒のみを添加したものを 96 時間培養し、定法に従いそれらの細胞からゲノム DNA を抽出した。

2. D-REAM 法によるゲノムワイド DNA メチル化解析

DEP、または溶媒のみを暴露されたマウス ES 細胞から抽出したゲノム DNA をメチル化感受性酵素 HpyCH4IV 消化し、その後アダプターライゲーション PCR により非メチル化領域を増幅し、マウスプロモーターアレイとハイブリさせることで、遺伝子領域の DNA メチル化解析を行った。また、子宮筋腫、正常子宮筋層も同様に、ゲノム DNA 抽出ののち、HpyCH4IV 消化、アダプターライゲーション PCR を行い、ヒトプロモーターアレイを用いたゲノムワイド DNA メチル化解析を行った。

3. COBRA 法による遺伝子領域の DNA メチル化解析

DEP、またはセレンにより DNA メチル化状況が変化する遺伝子を探索するために、上記のゲノム DNA についてバイサルファイト反応を行い、その後 COBRA 法による DNA メチル化解析を行った。バイサルファイト反応済みゲノム DNA を PCR 増幅後、HpyCH4IV による切断を行い、切断断片をマイクロチップ電気泳動装置 MCE-202 (MultiNA) により解析した。さらに、得られた切断断片の面積値より DNA メチル化率を算出した。

(倫理面への配慮)

培養細胞を用いた化学物質暴露実験にはマウス由来細胞のみを用いており、倫理面への問題はないと判断した。また、解析に使用した子宮筋腫、および正常子宮筋層の採取は山口大学医学部の倫理委員会における承認を受けた上で実施した。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」に基づいて行った。対象者のプライバシー保持に留意し、サンプルは匿名化した上で使用した。また、解析は東京大学、山口大学の「ヒトを対象とする研究倫理審査委員会」に申請、承認を受けた上で実施した。

C. 研究結果

1. 有機リン系農薬 (DEP) 暴露 ES 細胞での DNA メチル化解析

これまでの研究より、母体中に存在する濃度の DEP や Se が、マウス ES 細胞のへ

テロクロマチン形成に影響を与えることを明らかとした(図2)。本研究では、DEPによる遺伝子領域のDNAメチル化状況への影響について、D-REAM法およびCOBRA法を用いて解析した。DEP暴露細胞では、*Cdc6*や*Upk1b*(ガン関連遺伝子)でのメチル化亢進、*Lep*(代謝関連遺伝子)でのメチル化低下、*M6pr*(膜輸送関連遺伝子)でのメチル化亢進など、いくつかの遺伝子領域でDNAメチル化状況が変化することが明らかとなった(図3)。

2. Se暴露ES細胞でのDNAメチル化解析

Se暴露マウスES細胞でのDNAメチル化状況をCOBRA法で解析した結果、解析した119遺伝子に共通して全体的なDNA脱メチル化が生じていた。特に脱メチル化度合の大きな遺伝子として、*Nes*(神経分化関連遺伝子)や*Lpgat1*(膜局在アシル基転移酵素)があった。以上より、血清中濃度のSeは広範囲の遺伝子領域においてDNA脱メチル化を引き起こすことが明らかとなった。

3. 子宮筋腫でのヒトSelH(C11orf31)のDNAメチル化解析

これまでの本研究班の分析より、子宮内膜症患者のSe血清中濃度は健常者に比べて低いことが報告されている(平成19年度総括・分担研究報告書「化学物質による子どもへの健康影響に関する研究」参照)。さらに子宮筋腫患者のSe血清中濃度も健常者に比べて低いことが報告されており、子宮疾患にSe濃度変化が関与するものと考えられる。

子宮筋腫でのD-REAM法によるゲノムワイド

DNAメチル化解析より、セレンを含むタンパク質である、セレノプロテインの1つで核に局在するヒトSelH(C11orf31)の転写開始点上流域に、子宮筋腫で正常子宮筋層に比べてメチル化状況の変化する領域が検出された。このことは血中のSe含有量の変化と共に、子宮筋腫ではセレノプロテイン遺伝子のエピジェネティック状況も変化することを示唆するものである。

D. 考察

これまでに本研究班では妊娠母体中に存在する様々な化学物質の血中濃度を決定してきた。さらに、我々は先の研究班で、これらの母体血から検出される濃度でマウスES細胞のヘテロクロマチン形成を乱すいくつかの化学物質を特定した(平成19年度総括・分担研究報告書「化学物質による子どもへの健康影響に関する研究」参照)。本研究からさらに、ヘテロクロマチン形成に影響を及ぼす化学物質(DEP、Se)が、マウスES細胞の遺伝子領域におけるDNAメチル化状況も乱すことが明らかとなり、ガン関連遺伝子や神経分化に関わる遺伝子も含まれていた。このことは、母体血中レベルの化学物質が胎児のエピジェネティック状況に影響を及ぼす可能性を示唆している。以上より、ヘテロクロマチン形成、DNAメチル化を指標として、エピミュータゲンのスクリーニング系が確立できた。

子宮筋腫では血中 Se レベルの低下と共に、ヒト SelH (C11orf31) 遺伝子のエピジェネティック状況が変化していることが明らかとなった。このことは、化学物質の子宮疾患への関与を示唆するものである。子宮疾患は着床障害など胎児発育にも大きな問題をもたらす。本研究で開発されたD-REAM法を用いたゲノムワイドなエピジェネティック解析は、子宮疾患の発症機序解明や、胎児発育の改善にも繋がることを期待される。

今後は本研究で確立したマウスES細胞でのエピミュータゲンのスクリーニング系をヒトiPS細胞に応用することで、エピミュータゲンのヒト胎児への影響を評価することが可能になると考えられる。

E. 結論

本研究では、従来の毒性学試験等と異なりヒト血清中濃度程度の化学物質 (DEP, Se) がマウス初期胚のモデルと考えられるES細胞において、遺伝子領域のDNAメチル化状況に影響を与えることが明らかになった。また、先のヘテロクロマチン解析と合わせて、エピミュータゲンを評価するスクリーニング系の確立に至った。今後はヒトiPS細胞を利用して、エピミュータゲン解析系を確立する。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1 論文発表

(1)Yagi S, Hirabayashi K, Sato S, Li W, Takahashi Y, Hirakawa T, Wu G, Hattori N, Hattori N, Ohgane J, Tanaka S, Liu XS, Shiota K.

DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions (T-DMRs) in mouse promoter regions demonstrating tissue-specific gene expression.

Genome Res. 18:1969-1978 (2008)

(2)新井良和、八木慎太郎、塩田邦郎
幹細胞をエピジェネティクスで評価する、
現代化学 452:52-55 (2008)

(3)前田千晶、塩田邦郎
再生医療のためのエピジェネティクスと
エピゲノム、分子消化器病
5:13-19(2008)

2 学会発表

(1)塩田邦郎
エピジェネティクスからエピゲノムへ：
毒性病理学への応用、第25回 日本毒性
病理学会教育講演 (2009)

H. 知的所有権の取得状況

なし

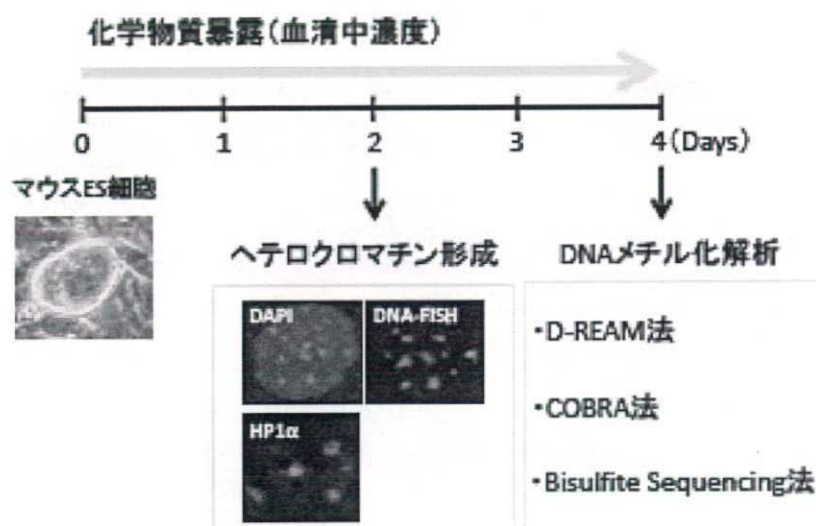


図1
 エピミュタゲンのスクリーニング系
 ヘテロクロマチン形成、DNAメチル化状況を指標として、胎児発生に影響を与える可能性のある化学物質(エピミュタゲン)のスクリーニング系の構築を進めた

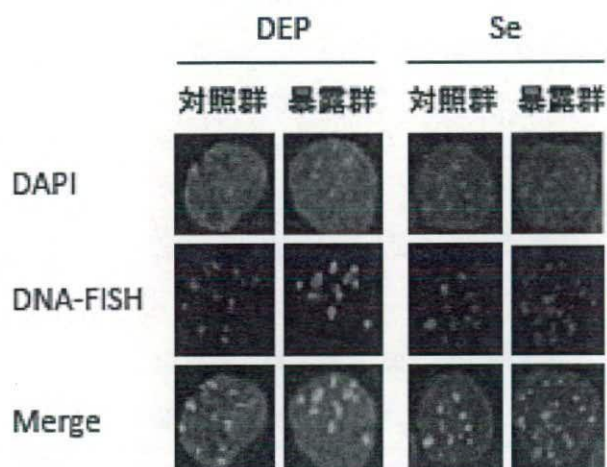


図2
 DEP、Seによるヘテロクロマチン変化
 マウスES細胞への血清中濃度のDEP暴露により、対照群に比べてDAPI、およびDNA-FISHシグナル数の減少、Se暴露でシグナル数の増加が認められた

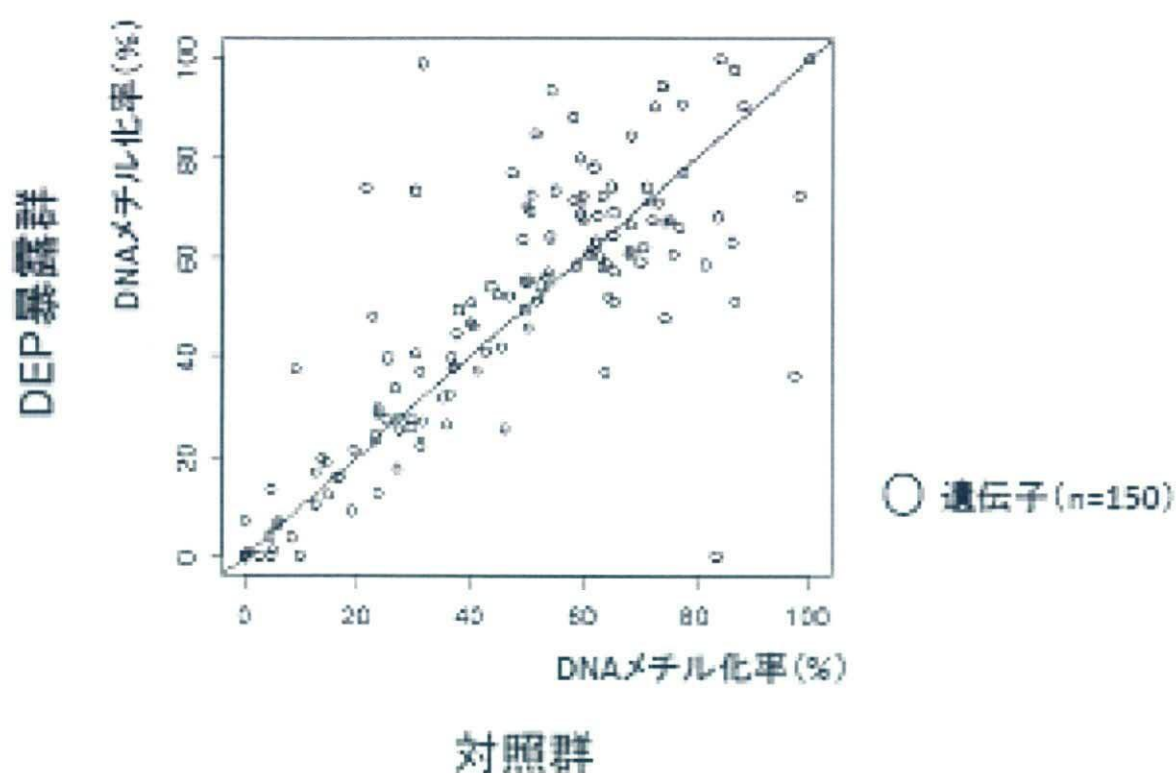


図3
 DEPによる遺伝子領域のDNAメチル化への影響
 マウスES細胞への血清中濃度のDEP暴露により、特定の遺伝子領域でDNAメチル化状況に変化が生じていた

研究成果の刊行に関する一覧表

(1) Akutsu, K., Takatori, S., Nozawa, S., Yoshiike, M., Nakazawa, H., Hayakawa, K., Makino, T., and Iwamoto, T. Polybrominated diphenyl ethers in human serum and sperm quality, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **80**, 345-350 (2008)

(2) Akutsu, K., Takatori, S., Nakazawa, H., Hayakawa, K., Izumi, S., and Makino, T., Dietary intake estimations of polybrominated diphenyl ethers based on a total diet study in Osaka, Japan. *Food Addit. Contam. Part B*, **1** (1), 58-68 (2008).

(3) Asada H, Yamagata Y, Taketani T, Matsuoka A, Tamura H, Hattori N, Ohgane J, Hattori N, Shiota K, Sugino N. Potential link between estrogen receptor- α gene hypomethylation and uterine fibroid formation. *Mol Hum Reprod* **14**: 539-545, 2008.

(4) Yamagata Y, Maekawa R, Asada H, Taketani T, Tamura I, Tamura H, Ohgane J, Hattori N, Shiota K, Sugino N. Aberrant DNA methylation status in human uterine leiomyoma. *Mol Hum Reprod* in press, 2009.

(5) Yamagata Y, Asada H, Tamura I, Lee L, Maekawa R, Taniguchi K, Taketani T, Matsuoka A, Tamura H, Sugino N. DNA methyltransferase expression in the human endometrium: down-regulation by progesterone and oestrogen. *Hum Reprod* in press, 2009.

(6) 浅田裕美、山縣芳明、田村功、前川亮、谷口憲、竹谷俊明、松岡亜希、田村博史、杉野法広 ヒト子宮内膜における DNA methyltransferase の発現に関する検討
第 60 回日本産科婦人科学会学術講演会 2008 年 4 月 12 日～15 日 横浜市
日本産科婦人科学会雑誌 第 60 巻 第 2 号 P.728 2008 年

(7) 浅田裕美、山縣芳明、田村 功、谷口 憲、前川 亮、竹谷俊明、松岡亜希、田村博史、杉野法広 子宮筋腫の Estrogen receptor- α 遺伝子の DNA メチル化情報
第 81 回日本内分泌学会学術総会 2008 年 5 月 16 日～18 日 青森市
日本内分泌学会雑誌 第 84 巻 第 1 号 P.221 2008 年

(8) Hiromi Asada, Ken Taniguchi, Hiroshi Tamura, Norihiro Sugino
Uterine Leiomyomas Associate with DNA Hypomethylation of Oestrogen Receptor- α Gene

The 24th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, Barcelona, Spain 6-9 July 2008

(9) 第45回日本生殖医学会中国・四国支部学術講演会 2008年8月30日 徳島市
日本生殖医学会雑誌 第54巻 第1・2号 P.20 2008年 浅田裕美、山縣芳明、李理華、木塚文恵、田村功、谷口憲、前川亮、竹谷俊明、松岡亜希、田村博史、杉野法広 ヒト子宮内膜における DNA methyltransferase の発現に関する検討

第53回日本生殖医学会学術講演会 2008年10月23日~24日 神戸市
日本生殖医学会雑誌 第53巻 第4号 P.155 2008年

(10) 浅田裕美、山縣芳明、李理華、木塚文恵、田村功、谷口憲、前川亮、竹谷俊明、松岡亜希、田村博史、杉野法広 ヒト子宮内膜間質細胞における Insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) 遺伝子と Prolactin (PRL) 遺伝子の DNA メチル化プロファイル解析

第13回日本生殖内分泌学会学術講演会 2008年11月29日 大阪市
日本内分泌学会雑誌 第84巻 第2号 P.629 2008年

(11) Yagi S, Hirabayashi K, Sato S, Li W, Takahashi Y, Hirakawa T, Wu G, Hattori N, Hattori N, Ohgane J, Tanaka S, Liu XS, Shiota K.

DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions (T-DMRs) in mouse promoter regions demonstrating tissue-specific gene expression. *Genome Res.* 18:1969-1978(2008)

(12) 新井良和、八木慎太郎、塩田邦郎
幹細胞をエピジェネティクスで評価する、現代化学 452:52-55 (2008)

(13) 前田千晶、塩田邦郎
再生医療のためのエピジェネティクスとエピゲノム、分子消化器病 5:13-19(2008)

(14) 塩田邦郎
エピジェネティクスからエピゲノムへ：毒性病理学への応用、第25回 日本毒性病理学会教育講演 (2009)