

200839018A

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

男児外陰部異常症および生殖機能障害と化学物質：
個体感受性と暴露量に関するゲノム疫学調査

平成20年度 総括・分担報告書

研究代表者 緒方 勤

平成21(2009)年 3月

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

男児外陰部異常症および生殖機能障害と化学物質：
個体感受性と暴露量に関するゲノム疫学調査

平成20年度 総括・分担報告書

研究代表者 緒方 勤

平成21（2009）年 3月

目 次

I 総括研究報告書

男児外陰部異常症および生殖機能障害と化学物質：個体感受性と暴露量に関するゲノム疫学調査 1

研究代表者 国立成育医療センター研究所 緒方勤

II 研究分担報告書

1 エストロゲン受容体遺伝子における化学物質感受性ハプロタイプの構造および機能解析 5

国立成育医療センター研究所 緒方勤

2 性ホルモン効果関連遺伝子群のハプロタイプ相関解析とメチル化パターン解析 9

東京大学 大迫誠一郎

3 内・外性器の手術検体採取と患者臨床像解析 11

名古屋市立大学 小島祥敬

4 成育コホート研究における外陰部異常症患者の胎児期環境評価 15

国立成育医療センター 洲鎌盛一

5 ダイオキシン関連遺伝子群の網羅的相関解析とバイオインフォマティクスによる影響化学物質の推定解析に関する研究 19

国立環境研究所 曾根秀子

6 ヒトハプロタイプブロックを対象とするイントロンノックインマウスの作製と解析 23

国立医薬品食品衛生研究所 安彦行人

7 各種化学物質の測定と暴露量の推定 25

国立環境研究所 米元純三

III 研究成果の刊行一覧表

. 33

IV 研究成果の刊行物・別刷り

. 41

總 括 研 究 報 告

男児外陰部異常症および生殖機能障害と化学物質：個体感受性と
暴露量に関するゲノム疫学研究に関する研究

研究代表者 緒方勤 国立成育医療センター研究所 部長

研究要旨

本研究の目的は、男児外陰部異常症および生殖機能障害と化学物質の関連性を個体感受性と暴露量の両者の観点から解明することである。本年度においては、優位な関連が、男児外陰部異常症（尿道下裂および停留精巣）とエストロゲン受容体 α をコードする ESR1 遺伝子の特定ハプロタイプ、ダイオキシン関連遺伝子である ARNT2、男性ホルモン産生関連遺伝子である CYP17A1 の rs743572 に、また、精子形成障害とエストロゲン受容体 β をコードする ESR2 遺伝子の特定ハプロタイプに認められた。また、尿道下裂患者の外陰部皮膚において、強力な男性ホルモンを産生するのに必須である SRD5A2 のメチル化異常が認められた。さらに、暴露量測定の準備が行われた。

A. 研究目的

本研究の目的は、男児外陰部異常症および生殖機能障害と化学物質の関連性を個体感受性と暴露量の両者の観点から解明することである。その必要性は、この関連性を示唆する動物実験データはあるが、疫学データに乏しく、その因果関係の解明が環境リスク評価上の重要課題となっていることにある。特に、脆弱な集団を保護する必要性が国際化学物質管理会議で再確認され、個体感受性を勘案した評価スキームの構築が急務となっている。

B. 研究方法

遺伝的感受性は、エストロゲン受容体遺伝子、男性ホルモン産生経路の遺伝子、ダイオキシン関連遺伝子を主として、関連解析（多型とハプロタイプ解析）をおこなった。また、環境化学物質の暴露とメチル化異常の関連について、解析した。暴露量については、患者・母親血液、臍帯血、臍帯、胎盤の分析のための準備を行った。また、成育コホートとの連携を進めた。

（倫理面への配慮）

ヒトを対象とする研究においては、全例、倫理委員会承認の下に、試料等提供者のプライバシーの保護、検体提供の任意性、研究参加者の利益および不利益、提供を受けた検体の取り扱い方、得られる研究成果の

医学的貢献度等について、試料等提供者ないしはその保護者に充分説明したうえで、書面による同意を得た後に実施した。

動物実験については、すべて「国立医薬品食品衛生研究所・動物実験の適正な実施に関する規定（平成19年4月1日改正）」に基づいて審査が行われ、許可が与えられた上で実施されている。

C. 研究結果

1. エストロゲン受容体遺伝子と遺伝的感受性：われわれは、エストロゲン受容体 α をコードする ESR1 遺伝子に約 35 kb のハプロタイプブロックが存在し、AGATA という特定ハプロタイプのホモ接合体が顕著な外陰部異常発症感受性（オッズ比：尿道下裂 13.75、停留精巣 9.0）を有することを世界で初めて見出した。さらに、エストロゲン受容体 α をコードする ESR1 の特定ハプロタイプが、イタリア人小児外陰部異常に関連すること、2,244 bp の微小欠失と絶対連鎖不平衡することを見いだした。さらに、精子形成障害が、ESR1 ではなく、エストロゲン受容体 β をコードする ESR2 の特定ハプロタイプと有意に関連することを見いだした。

この機能解析のために、常法に従い、ターゲティングベクターの設計を完了した。ノックインすべきゲノム断片が10kb 以上とかなり大きいものの、分担者の所属

機関にて7kb の組換え実績があることから、大きな障害はないものと予想される。市販の大腸菌人工染色体ライブラリーからヒトおよびマウスの ESR1 遺伝子を含むゲノム断片の取得を行った。現在、ベクターの構築作業を続行中である。

2. 男性ホルモン産生経路の遺伝子、ダイオキシン関連遺伝子と遺伝的感受性:日本人及びイタリア人の男児の正常及び停留精巣、尿道下裂及びマイクロペニスの患者について検討した。その結果、疾患群と正常群の間で優位な関連性の差が、ダイオキシン関連遺伝子である ARNT2 の rs12148133 と、男性ホルモン産生関連遺伝子である CYP17A1 の rs743572 に認められ、疾患の発症や病態の進展に関与する可能性が示唆された。

3. 環境化学物質の暴露とメチル化異常の関連:尿道下裂患者の外陰部皮膚組織が入手しえた 5 検体中、デザインしたプライマーで増幅できたサンプルは 3 検体で、うち SRD5A2 の解析ができたものが 3 検体であった。その中の 2 検体は比較的低メチル化を呈していた。残り 1 検体と対象として使用した市販の血液由来 DNA ではほとんどの CpG がメチル化されていることがわかった。さらに CYP1A1 遺伝子で増幅できたサンプルは 1 検体だけであったが、メチル化はほとんど観察されなかった。CYP1A1 の mRNA 解析では、5 検体中 3 検体で有意な mRNA が測定できたが、2 検体は検出限界板であった。

4. 暴露量の測定 2-12歳までの子どもから血液及び尿を採取し、化学物質を測定するために、化学物質を測定している文献を収集し、分析測定方法の比較検討を行った。また、血中ポリ塩化ビフェニル(PCB)及びジフェニル・エーテル(PBDEs)の測定については、プロトコルの確認を行った。既に、われわれは、臍帯で種々の環境化学物質が測定できることを示しており、これにより、暴露量測定の容易が整備された。

5. 成育コホートとの連携:成育出生コホートでの前向き研究において参加者 1565 人中 32 例の泌尿生殖器系の異常を認めた。そのうち男児外陰部異常として診

断された児は 17 例であった。その内訳は尿道狭窄 6 例、停留精巣 6 例、尿道下裂 2 例、両側遊走精巣 2 例、陰嚢水腫 1 例で、尿道狭窄、停留精巣、尿道下裂例は手術を受けている。コホート参加出産児の平均体重は 2956g で、そのうち 2500g 以下の低出生体重児 12%であり、2003 年厚生労働省統計 9.1%より高率であった。男児外陰部異常症者の平均在胎週数、出生体重は 38 週、2952gであり、また母親年齢平均 33 歳、父親平均年齢 33 歳で参加者平均との相違は無かった。今後発症者の妊娠中生活習慣、食習慣を調査し環境化学物質の影響について検討を行っていく。

D. 考察

上記の成果は、本研究課題である環境化学物質にたいする遺伝的感受性の同定と暴露量の測定に大きく前進する内容である。特に、エストロゲン受容体の中で、ホルモン産生細胞(ライディッヒ細胞)で発現している α 型の特定ハプロタイプが、ホルモン産生低下に起因する尿道下裂や停留精巣と関連し、生殖細胞で発現している β 型の特定ハプロタイプが、精子形成障害と関連していることは興味深い。

E. 結論

当該年度においては、外陰部形成障害あるいは精子形成障害とエストロゲン受容体、男性ホルモン産生経路関連遺伝子、ダイオキシン関連遺伝子との関連性の同定、外陰部異常症とメチル化異常、暴露量の測定の準備と、大きな進展が見られた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表
別紙4のとおり

2. 学会発表

各研究分担報告書に記載

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

(予定を含む。)

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

研 究 分 担 報 告

エストロゲン受容体遺伝子における化学物質感受性ハプロタイプの構造および機能解析

研究分担者 緒方勤 国立成育医療センター研究所 部長

研究要旨

われわれは、エストロゲン受容体 α をコードする ESR1 の特定ハプロタイプが、イタリア人小児外陰部異常に関連すること、2, 2, 44 bp の微小欠失と絶対連鎖不平衡することを見いだした。さらに、精子形成障害が、ESR1 ではなく、エストロゲン受容体 β をコードする ESR2 の特定ハプロタイプと有意に関連することを見いだした。

A. 研究目的

近年、男児外陰部異常症および生殖機能障害の増加が疫学的調査により明らかとなりつつあり、その原因として環境化学物質の影響が危惧されている。特に、大部分の環境化学物質が有するとされているエストロゲン用効果は、男性化障害を招くことが知られている。そして、このエストロゲン用効果が、主に環境化学物質がエストロゲン受容体に結合することで発揮されることから、エストロゲン受容体は環境化学物質作用の影響を担う中核的因子と推測される。これに関し、われわれは、エストロゲン受容体 α をコードする ESR1 遺伝子に約 35 kb のハプロタイプブロックが存在し、AGATA という特定ハプロタイプのホモ接合体が顕著な外陰部異常発症感受性(オッズ比:尿道下裂 13.75、停留精巣 9.0)を有することを世界で初めて見出した。

本研究の目的は、この特定ハプロタイプが多人種において与える影響や生殖機能との関連を明らかとすること、および、エストロゲン作用増強を招く機序を解明することである。さらに、エストロゲン受容体 β をコードする ESR2 遺伝子のハプロタイプ解析および機能解析を行うことである。

B. 研究方法

1) ESR1 遺伝子特定ハプロタイプが多人種において与える影響:イタリア人外陰部異常症男児(停留精巣 80 例と尿道下裂 13 例)と正常男児 150 例を対象として解析した。

2) 同特定ハプロタイプが生殖機能において与え

る影響:日本人精子形成障害患者 80 例と妊孕性陽性男性 53 例を対象として解析した。

3) 同特定ハプロタイプがエストロゲン作用増強を招く機序の解明:本年度は、まず、この特定ハプロタイプの全領域のシークエンス解析と、見いだされた塩基配列異常と特定ハプロタイプの連鎖不平衡を検討した。

4) ESR2 遺伝子のハプロタイプ解析:精子形成障害を対象として、10 個の SNP 解析に基づく遺伝統計解析により行った。

(倫理面への配慮)

ヒトを対象とする研究においては、全例、倫理委員会承認の下に、試料等提供者のプライバシーの保護、検体提供の任意性、研究参加者の利益および不利益、提供を受けた検体の取り扱い方、得られる研究成果の医学的貢献度等について、試料等提供者ないしはその保護者に充分説明したうえで、書面による同意を得た後に実施した。

C. 研究結果

1) ESR1 遺伝子特定ハプロタイプが多人種において与える影響:この特定ハプロタイプは、イタリア人外陰部異常症男児においても有意に高頻度に存在した($P=0.0062$ 、オッズ比 2.3)。しかし、ハプロタイプの頻度は日本人よりも低く、これに一致して、この特定ハプロタイプは、イタリア人では優性効果を持つというデータが得られた。

2) 同特定ハプロタイプが生殖機能において与える影響:この特定ハプロタイプと日本人における精

子形成障害との関連は見いだされなかった (P=0.38)。

3) 同特定ハプロタイプがエストロゲン作用増強を招く機序の解明:この特定ハプロタイプ内に 2, 2, 44 bp の微小欠失が存在することを見いだした。さらに、この微小欠失が、この特定ハプロタイプと絶対連鎖不平衡(この微小欠失は、特定ハプロタイプがあると必ず存在し、特定ハプロタイプがないと必ず存在しない状態)を示すことが確認された。

4) ESR2 遺伝子のハプロタイプ解析:ESR2 全体が 1つのハプロタイプブロックを示すことが見いだされ、さらに GTTCAAGATA という特定ハプロタイプが有意に精子形成障害と関連することを、世界で初めて見いだした (P=0.0015、オッズ比 2.9)。

D. 考察

以上の成績は、以下のことを示唆するものである。1) ESR1 遺伝子特定ハプロタイプとイタリア人外陰部異常症における有意の関連は、環境化学物質の影響が様々な国において認められることに一致する。2) ESR1 遺伝子特定ハプロタイプと絶対連鎖不平衡を示す微小欠失が同定されたことは、この微小欠失が感受性を招く真の原因であることを示唆する。その機序は今後の検討課題であるが、スライスパターンの変動、マイクロ RNA の欠失、mRNA の不安定性などが考えられる。3) 精子形成障害が ESR1 ではなく、ESR2 の特定ハプロタイプと有意に関連することは、精子形成障害も環境化学物質の影響を受けることを示唆し、さらに、精巣体細胞において ESR1 が発現し、生殖細胞において ESR2 が発現していることに一致する。

E. 結論

われわれは、ESR1 の特定ハプロタイプが、イタリア人小児外陰部異常に関連すること、2, 2, 44 bp の微小欠失と絶対連鎖不平衡することを見いだした。さらに、精子形成障害が、ESR1 ではなく、ESR2 の特定ハプロタイプと有意に関連することを見いだした。これらのデータは、環境化学物質と男児外陰部異常症および生殖機能障害の関連を解析する上で重要なデータを提供する。

F. 健康危険情報

エストロゲン受容体 α および β 遺伝子の特定ハプロタイプは、環境化学物質に反応して出現する男児外陰部異常症および精子形成障害の感受性因子である。

G. 研究発表

論文発表

1. Fukami M, Wada Y, Okada M, Kato F, Katsumata N, Baba T, Morohashi K, Laporte J, Kitagawa M, Ogata T. *CXorf6 (MAMR1: mastermind-related 1) transactivates the Hes3 promoter, augments testosterone production, and contains the target sequence for SF-1.* *Journal of Biological Chemistry* 283 (9): 5525-5532, 2008.
2. Kagami M, Sekita Y, Nishimura G, Irie M, Kato F, Okada M, Yamamori S, Kishimoto H, Nakayama M, Tanaka Y, Matsuoka K, Takahashi T, Noguchi M, Tanaka Y, Masumoto K, Utsunomiya T, Kouzan H, Komatsu Y, Ohashi H, Kurosawa K, Kosaki K, Ferguson-Smith AC, Ishino F, Ogata T. Deletions and epimutations affecting the human chromosome 14q32.2 imprinted region: implications for the phenotypic development in paternal and maternal uniparental disomy for chromosome 14. *Nature Genetics* 40 (2): 237-242, 2008.
3. Suzuki K, Haraguchi R, Ogata T, Barbieri O, Alegria O, Vieux-Rochas M, Nakagata N, Ito M, Mills A, Kurita T, Levi G, Yamada G. Abnormal urethra formation as a model for hypospadias of the split-hand-foot malformation (SHFM). *European Journal of Human Genetics* 16 (1): 36-44, 2008.
4. Dateki S, Fukami M, Sato N, Muroya K, Adachi M, Ogata T. *OTX2* Mutation in a patient with anophthalmia, short stature, and partial GH deficiency: functional studies using the *IRBP*, *HESX1*, and *POU1F1* promoters. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93 (10): 3697-702, 2008.
5. Sugawa F, Wada Y, Okada M, Maruyama T, Uchida H, Arase T, Hamada N, Ishizuka B, Ogata T. Premature ovarian failure and androgen receptor gene CAG repeat lengths weighted by X chromosome inactivation patterns. *Fertility and Sterility* (in press) 2008 Feb 15. [Epub ahead of print].

6. Ogata T, Wada Y, Fukami M. *MAMLD1 (CXorf6)*: a new gene for hypospadias. *Sexual Development* 2 (4-5): 244-250, 2008.
7. Ogata T, Laporte J, Fukami M. *MAMLD1 (CXorf6)*: a new gene involved in hypospadias. *Hormone Research* (in press)
8. Yoshida R, Massart F, Spinelli C, Kamatani N, Ogata T. Haplotype analysis of the estrogen receptor α gene in Italian boys with abnormal external genitalia: further support for the susceptibility to estrogenic environmental endocrine disruptors. *European Journal of Endocrinology* (submittd).
9. 緒方勤. 男児外陰部異常症および精子形成障害と内分泌攪乱化学物質感受性: エストロゲン受容体 α 遺伝子のハプロタイプ解析. *医学のあゆみ* 25 (9): 954-959, 2008.
10. 緒方勤. エストロゲン様内分泌攪乱化学物質と男性性機能低下: 疫学データと個体感受性解析. *日本小児泌尿器科学会雑誌* 16 (2): 8-13, 2008.

2. 学会発表

1. Ogata T, Fukami M, Wada Y, Yoshida R, Watanabe M. Haplotype analysis of the estrogen receptor α gene in male genital and reproductive abnormalities. In: *The Royan International Twin Congress (The 9th Congress on Reproductive Biomedicine and The 4th Congress on Stem Cell Biology and Technology)*. August 27-29, Tehran, 2008.
2. Ogata T, Yoshida R, Fukami M. External genital abnormalities as single gene disorders and multifactorial disorders. *International Symposium for Gonad and Brain Sex Differentiation*. September 14-16, Fukuoka, 2008.
3. Ogata T. Disorders of Sex Development: New Gene and New Mechanism. The ESPE-JSPE Plenary Lecture. The 47th Meeting of European Society for Paediatric Endocrinology. September 20-24, Istanbul, 2008.
4. Horikawa R, Yoshida R, Ogata T. Noonan Syndrome. In: *Diagnosis and Management Challenges Symposium. The 5th Asia Pacific Paediatric Endocrine Society Meeting*. October 29 - November 1, Seoul, 2008.
5. Ogata T. New Gene and New Mechanism for Disorders of Sex Development. In: *New aspects in sex differentiation (Basic)*. The 13th International Congress of

- Endocrinology. November 8-12, Rio de Janeiro, 2008
6. 緒方勤. 性分化異常症の基礎と臨床. 第179回熊本周産期懇話会. 2008年(平成20年)11月19日, 熊本.
 7. 吉田理恵, 和田友香, 緒方勤. エストロゲン受容体 α 遺伝子内微小欠失と男児外陰部異常症. 第53回日本人類遺伝学会学術集会, 2008.
 8. 吉田理恵, 和田友香, 緒方勤. エストロゲン受容体 α 遺伝子内微小欠失と男児外陰部異常症. 第42回日本小児内分泌学会学術集会, 2008.
 9. 吉田理恵, 和田友香, 緒方勤. エストロゲン受容体 α 遺伝子内微小欠失と男児外陰部異常症. 第42回日本小児内分泌学会学術集会, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

男児外陰部異常症および生殖機能障害と内分泌攪乱化学物質： 個体感受性と暴露量に関するゲノム疫学研究

研究分担者 大迫誠一郎 東京大学 准教授

研究要旨

本サブテーマでは、尿道下裂を呈した新生児のゲノムの DNA メチル化解析を行うことにより、疾患の発症原因としてのゲノムメチル化変動の可能性を調査することを目的とする。同時に患部 RNA からマーカー遺伝子の定量を行い、曝露レベルとの相関を検討する。

A. 研究目的

動物実験レベルにおいては、胎児期の環境汚染化学物質曝露で、標的器官のゲノムメチル化頻度やメチル化パターンに変動が起き、それが原因となって発癌感受性や形質に変化が生じることが報告されている。尿道下裂は近年、小児科臨床上も有意な増加を見せる疾患とされるが、環境汚染物質の胎児期曝露で生じる前立腺萎縮やペニスの発達障害など動物実験で証明されている現象と同一の機序で発生しているとの仮説が提示されて久しい。しかし、ヒト集団における尿道下裂発症とゲノムメチル化変動との関連性、さらには環境汚染物質の関与に関しては報告がない。本サブテーマでは、尿道下裂患者の包皮のゲノム DNA メチル化レベルを対照群と比較することで検討、さらに包皮 RNA における化学物質曝露マーカーのレベルとの相関を調べることで曝露との関連性を検討する。本年度は対象遺伝子の選定と予備解析を行った。

B. 研究方法

尿道下裂の包皮試料は、名古屋市立大学医学部で採取されたもの（1歳～1歳9月、5献体）を使用した。ISOGEN で処理し、DNA 分画ならびに RNA 分画を調整した。DNA は定法に従いバイサルファイトゲノミックシーケンシング法で 5 アルファ還元化酵素 2 型（SRD5A2）ならびにシトクローム P4501A1（CYP1A1）遺伝子プロモーター領域の CpG アイランドを標的に DNA メチル化解析を行った。また、RNA は逆転写後 CYP1A1 mRNA のコピー数をリアルタイム RT-PCR 法で測定した。

（倫理面への配慮）

使用した包皮サンプルは、名古屋市立大学ならびに国立成育医療センター研究所の医学研究倫理審査委員会で承認を得た研究課題において、同意を得た手術時に採取されたものである。

C. 研究結果

まずメチル化解析では、解析した 5 検体中、デザインしたプライマーで増幅できたサンプルは 3 検体で、うち SRD5A2 の解析ができたものが 3 検体であった。その中の 2 検体は比較的低メチル化を呈していた。残り 1 検体と対象として使用した市販の血液由来 DNA ではほとんどの CpG がメチル化されていることがわかった。さらに CYP1A1 遺伝子で増幅できたサンプルは 1 検体だけであったが、メチル化はほとんど観察されなかった。CYP1A1 の mRNA 解析では、5 検体中 3 検体で有意な mRNA が測定できたが、2 検体は検出限界板であった。

D. 考察

RNA の発現レベルは全てのサンプルで信頼できる数値と思われるが、これを前提にすると、DNA メチル化の解析できた 3 サンプルにおける CYP1A1 の発現レベルと SRD5A2 プロモーター領域のメチル化レベルは逆相関をとっているように思われる。我々が現在行っているラットの用いた胎児期ダイオキシン曝露実験では、前立腺内の SRD5A2 プロモーター領域が低メチル化することが示唆されている。包皮の CYP1A1 mRNA レベルが環境汚染物質の曝露レベル

と表していると想定すると、曝露レベルの高かった検体のほうが低メチルであることを示しており、ラットの実験と一致する結果であると考えられる。上記測定項目を用いて今後さらにサンプル数を増していく。

E. 結論

尿道下裂患者の包皮サンプルから、化学物質の胎児期曝露により変動が生じることが報告されている遺伝子のエピジェネティックな解析が可能であることがわかった。また曝露マーカーの発現レベルから曝露指標の設定も可能であると思われる。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ishimura R., Kawakami T., Ohsako S., Tohyama C.

Dioxin-induced toxicity on vascular remodeling of the placenta. *Biochemical Pharmacol* (in press) (2009).

Shiizaki K., Ohsako S., Kawanishi M., Yagi T.

Omeprazole alleviates benzo[a]pyrene cytotoxicity by inhibition of CYP1A1 activity in human and mouse hepatoma cells. *Basic Clinical Pharmacol Toxicol* 103, 468-475, (2008).

Wu Q., Suzuki J.S., Zaha H., Lin T-M., Peterson RE.,

Tohyama C., Ohsako S. Differences in gene expression and benzo[a]pyrene-induced DNA adduct formation in the liver of three strains of female mice with identical *AhRb2* genotype treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and/or benzo[a]pyrene. *J Applied Toxicol* 8, 724-733, (2008).

2. 学会発表

大迫誠一郎, 松田佳奈, 阪田佳紀, 管井恵津子, 吉岡亘, 遠山千春. マウス胎児期ダイオキシン曝露による CYP1A1 遺伝子メチル化の変動. 第 81 回日本生化学会、第 31 回日本分子生物学会合同大会、神戸 (2008)

大迫誠一郎. 胎生期ダイオキシン曝露により生じる生後

発達の不可逆的变化について. 日本先天異常学会、東京 (2008) 6 月 29 日

大迫誠一郎. 環境汚染化学物質の胎児期曝露によるエピジェネティックな変化. 日本薬学会関東支部会、千葉 (2008) 10 月 4 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

男児外陰部異常症および生殖機能障害と化学物質：
個体感受性と暴露量に関するゲノム疫学研究

研究分担者 小島祥敬 名古屋市立大学大学院医学研究科腎・泌尿器科学分野

研究要旨

尿道下裂および停留精巣患者の臨床データの収集および血液および手術を行った際に得られた包皮および皮膚組織の採取を行った。

A. 研究目的

解析対象遺伝子発現組織の採取と患者臨床像解析
尿道下裂および停留精巣は先天性男子生殖器疾患の中で最も頻度の多いものとされている。私たちの研究目的は、これら疾患の化学物質に対する個体感受性および遺伝子解析を行うために必要な血液、包皮および皮膚組織を採取することである。また、各患者の臨床像（尿道口の位置、精巣の位置、合併疾患など）を詳細に検討することである。

B. 研究方法

手術目的で入院した尿道下裂および停留精巣患者の血液を採取。

手術を施行した際に、尿道下裂であれば尿道形成術を施行した際の余剰包皮、停留精巣であれば精巣固定術を施行した際の陰囊切開部をトリミングした際の余剰皮膚を検体として採取した。

採取血液および組織は所定の採血管および培養液に入れ保存した。

（倫理面への配慮）

本研究は委員会名古屋市立大学大学院医学研究科「ヒト遺伝子解析研究」倫理審査委員会に承認されている。また血液、検体採取の際は患者（小児であることが多いため主に家族）より同意を得たのち行っている。

C. 研究結果

約 80 例の尿道下裂(63 例)および停留精巣（13 例）

の組織採取を行った。

D. 考察

特に尿道下裂に関して言えば、欧米に比べ近位型（すなわち高度な）尿道下裂が多い印象があり、遺伝的要素が関与している可能性が示唆される。化学物質の個体感受性と遺伝子との関連を調べることで、今後その発症要因が明らかになることが期待される。

E. 結論

尿道下裂および停留精巣の血液、包皮および皮膚検体組織を採取した。尿道下裂は近位型（すなわち高度な）を多く認めた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakane A, Maruyama Hayashi Y, Kojima Y, T, Kohri K. Can a slit-like meatus be achieved with the V-incision sutured meatoplasty for onlay island flap hypospadias repair? BJU Int. 99:1479-82. 2007
2. Hayashi Y, Yasui T, Kojima Y, Maruyama T, Tozawa K, Kohri K. Management of urethral calculi associated with hairballs after urethroplasty for severe hypospadias. Int J Urol. 14:161-3, 2007.
3. Mizuno K, Hayashi Y, Kojima Y, Kurokawa S, Sasaki S, Kohri K. Influence for testicular development and

- histological peculiarity in the testes of flutamide-induced cryptorchid rat model. *Int J Urol.* 14:67–72, 2007.
4. Hayashi Y, Kojima Y., Mizuno K., Nakane A., Kurokawa S., Maruyama T., Kohri K. Neo-modified Koyanagi technique for the single-stage repair of proximal hypospadias. *J Pediatr Urol.* 3:239–242, 2007.
 5. Kojima Y, Sasaki S, Shinoura H, Hayase M, Kubota Y, Hayashi Y, Tsujimoto G, Kohri K. Change of Expression Levels of Alpha1-Adrenoceptor Subtypes by Administration of Alpha1d-Adrenoceptor-Subtype-Selective Antagonist Naftopidil in Benign Prostate Hyperplasia Patients. *Prostate.* 67:1285–1292, 2007.
 6. Kojima Y, Hayashi Y, Yasui T, Itoh Y, Maruyama T, Kohri K. Laparoscopic nephrectomy for a girl with giant hydronephrosis of a horseshoe kidney. *Int J Urol.* 14:647–9, 2007.
 7. Itoh Y, Kojima Y, Yasui T, Tozawa K, Sasaki S, Kohri K. Examination of alpha 1 adrenoceptor subtypes in the human ureter. *Int J Urol.* 14:749–753, 2007.
 8. Hayashi Y, Kojima Y, Nakane A, Kurokawa S, Tozawa K, Kohri K. Ventral based dartos flap for the prevention of the urethrocutaneous fistula urethroplasty. *Int J Urol.* 14:725–728, 2007.
 9. Kojima Y, Hayashi Y, Yasui T, Itoh Y, Maruyama T, Kohri K. Laparoscopic management for urachal cyst in a 9-year-old boy. *Int Urol Nephrol.* 39:771–774. 2007.
 10. Kubota Y, Hashitani H, Shirasawa N, Kojima Y, Sasaki S, Mabuchi Y, Soji T, Suzuki H, Kohri K. Altered distribution of interstitial cells in gunia pig bladder following bladder outlet obstruction. *Neurol Urodynam.* 27:330–40,2008.
 11. Umemoto Y, Sasaki S, Kojima Y, Kaneko T, Yanai Y, Kohri K. A case of azoospermia with Kippel-Feil anomaly. *Int J Urol.*15:188–9, 2008.
 12. Kojima Y, Hayashi Y, Mizuno K, Sasaki S, Fukui Y, Koopman K, Morohashi K-I, Kohri K. Upregulation of SOX9 in human SRY-negative XX males. *Clin Endocrinol.* 68:791–9, 2008
 13. Mizuno K, Hayashi Y, Kojima Y, Kurokawa S, Sasaki S, Kohri K. Early orchiopexy improve the subsequent testicular development and spermatogenesis in the experimental cryptorchid rat model. *J Urol.* 179:1195–9, 2008.
 14. Kojima Y, Sasaki S, Shinoura H, Hayase M, Kubota Y, Hayashi Y, Tsujimoto G, Kohri K. Expression of alpha1-adrenoceptor subtypes mRNAs as a predictor of the efficacy of subtype-selective alpha1-adrenoceptor antagonists in the management of benign prostatic hyperplasia. *J Urol.* 179:1040–6, 2008.
 15. Okada S, Watanabe H, Kojima Y, Yanai Y, Sasaki S, Kohri K. Loxoprofen sodium treatment for elderly men with refractory nocturia –Effect on nighttime urine production–. *Int J Urol.* 15:462–4, 2008.
 16. Kojima Y, Hayashi Y, Kurokawa S, Mizuno K, Sasaki S, Kohri K. No evidence of germline transmission by adenovirus-mediated gene transfer to mouse testes. *Fertil Steril.* 89:1448–54, 2008.
 17. Kaneko T, Sasaki S, Umemoto Y, Kojima Y, Ikeuchi T, Kohri K. Simulated conditions of microgravity increases progesterone production in I-10 cells of Leydig tumor cell line. *Int J Urol.* 15:245–50, 2008
 18. Hayashi Y, Kojima Y, Mizuno K, Maruyama T, Tozawa K, Kohri K. Modified foreskin reconstruction for distal hypospadias and chordee without hypospadias. *Int J Urol.* 2008 15:646–8, 2008.
 19. Yasui T, Itoh Y, Kojima Y, Umemoto Y, Tozawa K, Sasaki S, Hayashi Y, Kohri K. Impact of microwave tissue coagulation during laparoscopic partial nephrectomy on postoperative renal function. *Int Urol Nephrol.* 40:277–82, 2008.
 20. Kaneko T, Kojima Y, Umemoto Y, Sasaki S, Hayashi Y, Kohri K. Usefulness of transcription factors Ad4BP/SF-1 and DAX-1 as immunohistologic markers for diagnosis of advanced adrenocortical carcinoma. *Horm Res.* 70:294–299, 2008.
 21. Kamisawa H, Kojima Y, Mizuno K, Maruyama T, Kohri K, Hayashi Y. Evaluation of preoperative testicular volume in Japanese children with unilateral cryptorchidism. *Int Urol Nephrol.* *Int Urol Nephrol:* 977–81, 2008.
 22. Hayashi Y, Kojima Y, Mizuno K, Kurokawa S, Nakane A, Kohri k. Achieving a natural glanular meatus for distal

- hypospadias with a narrow and shallow plate: tubularized incised plate versus modified Barcat repair. *Int J Urol.* 15(7):616–20, 2008.
23. Nakane A, Kojima Y, Hayashi Y, Kohri K, Masui S, Nishinakamura R. Pax2 overexpression in embryoid bodies induces upregulation of integrin alpha8 and aquaporin-1. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* in press
24. Okada S, Kojima Y, Hamamoto S, Mizuno K, Sasaki S, Kohri K. Dietary soy isoflavone replacement improves detrusor overactivity of ovariectomized rats with alteration of connexin-43 expression in the urinary bladder. *BJU Int.* in press
25. Mizuno K, Hayashi Y, Kojima Y, Nakane A, Tozawa K, Kohri K. Activation of NF- κ B associated with germ cell apoptosis in testes of experimentally induced cryptorchid rat model. *Urology.* in press
26. Mizuno K, Kojima Y, Kurokawa S, Maruyama T, Sasaki S, Kohri K, Hayashi Y. Identification of differentially expressed genes in human cryptorchid testes using suppression subtractive hybridization. *J Urol.* in press
27. Iwatsuki S, Kojima Y, Imura M, Mizuno K, Kohri K, Hayashi Y. Detection of ectopic ureteral insertion to vagina with hypoplastic ectopic kidney by computed tomography with three-dimensional imaging. *Urology.* in press.
28. Mizuno K, Kojima Y, Kurokawa S, Mizuno H, Kohri K, Hayashi Y. Laparoscopic diagnosis and treatment of a phenotypic girl with a mosaic 45,XO/46,X,idi(Y) mixed gonadal dysgenesis. *J Pediatr Surg.* in press.
29. Kojima Y, Mizuno K, Imura M, Kato T, Kohri K, Hayashi Y. Laparoscopic orchiectomy and subsequent internal ring closure for extra-abdominal testicular nubbin in children. *Urology.* in press
30. Kojima Y, Mizuno K, Nakane A, Kato T, Kohri K, Hayashi Y. Long-term physical, hormonal and sexual outcome of males with disorders of sex development. *J Pediatr Surg.* in press.
31. Ohya S, Kimura K, Niwa S, Ohno A, Kojima Y, Sasaki S, Kohri K, Imaizumi Y. Malignancy Grade-Dependent Expression of K(+)-Channel Subtypes in Human Prostate Cancer. *J Pharmacol Sci.* in press
32. Kojima Y, Kurokawa S, Mizuno K, Umemoto Y, Sasaki S, Hayashi Y, Kohri K. Gene transfer to sperm and testis: future prospects of gene therapy for male infertility. *Curr Gene Ther.* 8:121–34, 2008
33. Hayashi Y, Kojima Y. Current concepts in hypospadias surgery. *Int J Urol.* 15: 651–664, 2008.
34. Kojima Y, Sasaki S, Hayashi Y, Tsujimoto G, Kohri K. Subtypes of alpha1-adrenoceptors in BPH: future prospects for personalized medicine. *Nat Clin Pract Urol.* 6: 44–53, 2009.
2. 学会発表
1. 林 祐太郎、小島 祥敬、水野 健太郎、黒川 覚史、井村 誠、丸山 哲史、郡 健二郎:新しい治療戦略に基づく尿道下裂修復術の展開—最近 3 年間の尿道下裂 100 例への応用—。第 96 回日本泌尿器科学会総会、2008.4.25–27、横浜市
2. 加藤 利基、小島 祥敬、柴田 泰宏、神沢 英幸、井村 誠、水野 健太郎、中根 明宏、林 祐太郎、郡 健二郎:非触知精巣に対する MRI 脂肪抑制 T2 強調画像と拡散強調画像の有用性についての検討。第 96 回日本泌尿器科学会総会、2008.4.25–27、横浜市
3. 水野 健太郎、小島 祥敬、黒川 覚史、井村 誠、丸山 哲史、佐々木 昌一、林 祐太郎、郡 健二郎:ヒト停留精巣組織に特異的な遺伝子の同定と機能解析。第 96 回日本泌尿器科学会総会、2008.4.25–27、横浜市
4. Kurokawa Satoshi, Kojima Yoshiyuki, Mizuno Kentaro, Imura Makoto, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: Distribution of gene expression on genital tubercles in the hypospadiac rat. AUA 2008 Annual Meeting, 2008.5.17–22, Orland(Florida USA)
5. Mizuno Kentaro, Kojima Yoshiyuki, Kurokawa Satoshi, Kamisawa Hideyuki, Imura Makoto, Nakane Akihiro, Kato Toshiki, Maruyama Tetsuji, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: Identification of differential expressed genes associated with testicular descent using PCR-based suppressive subtractive hybridization and relationship to germ cell maturation. AUA 2008 Annual Meeting, 2008.5.17–22, Orland(Florida USA)
6. Kato Toshiki, Kojima Yoshiyuki, Shibata, Yasuhiro, Imura Makoto, Mizuno Kentaro, Maruyama Tetsuji, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: Usefulness of MR

fat-suppressed T2-weighted and diffusion-weighted imaging for the diagnosis of non-palpable testes. AUA 2008 Annual Meeting, 2008.5.17-22, Orland(Florida USA)

7. 黒川 覚史、小島 祥敬、水野 健太郎、柴田 泰宏、井村 誠、中根 明宏、丸山 哲史、林 祐太郎、郡 健二郎:尿道下裂関連遺伝子の同定と発症メカニズムの検討。第17回日本小児泌尿器科学会総会、2008.7.16-18、高松市

7. 水野 健太郎、小島 祥敬、黒川 覚史、井村 誠、丸山 哲史、佐々木 昌一、林 祐太郎、郡 健二郎:停留精巣における精源細胞特異的マーカー(TPT1・EEF1A1)の同定と将来の造精機能予測。第17回日本小児泌尿器科学会総会、2008.7.16-18、高松市

8. 中根 明宏、林 祐太郎、水野 健太郎、小島 祥敬、丸山 哲史、郡 健二郎:尿道下裂術後の排尿状態、外観、性機能に関する満足度のアンケート調査。第58回日本泌尿器科学会中部総会、2008.11.14-16、大津市
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特記すべきことなし

2. 実用新案登録

特記すべきことなし

3. その他

特記すべきことなし

男児外陰部異常症および生殖機能障害と化学物質：
個体感受性と暴露量に関するゲノム疫学研究
成育コホート研究における外陰部異常症患者の胎児期環境評価

研究分担者 洲鎌盛一 国立成育医療センター 総合診療部 医長

研究要旨

成育出生コホートでの前向き研究において参加者 1565 人中 32 例の泌尿生殖器系の異常を認めた。そのうち男児外陰部異常として診断された児は 17 例であった。その内訳は尿道狭窄 6 例、停留精巣 6 例、尿道下裂 2 例、両側遊走精巣 2 例、陰嚢水腫 1 例で、尿道狭窄、停留精巣、尿道下裂例は手術を受けている。コホート参加出産児の平均体重は 2956g で、そのうち 2500g 以下の低出生体重児 12% であり、2003 年厚生労働省統計 9.1% より高率であった。男児外陰部異常症者の平均在胎週数、出生体重は 38 週、2952g であり、また母親年齢平均 33 歳、父親平均年齢 33 歳で参加者平均との相違は無かった。今後発症者の妊娠中生活習慣、食習慣を調査し環境化学物質の影響について検討を行っていく。

A. 研究目的

国立成育医療センターでは出生コホート研究を 2003 年より行っている。本研究では妊娠中の生活環境、出産後の児の生活環境、育児方法などの要因が、児の成長・発達に及ぼす影響を調べている。これまで対象者のアレルギー発症率（喘息、アトピー性皮膚炎、食物アレルギー）、発達障害発症率（広汎性発達障害、精神遅滞、注意欠陥多動症候群）について検討を行ってきた。今回男性外陰部異常の発生率を調査し、胎児環境と当該疾患発症との関連について検討することを目的とした。

B. 研究方法

成育コホート研究として、2003 年から 2 年間で 1757 人の妊婦が研究協力者として同意登録した。参加者は妊娠 16 週以前から経過観察が行われて、妊娠中の栄養摂取、生活環境、育児知識などについてアンケート調査が行なわれた。2006 年の 8 月に全員出産が完了し、出生児 1565 人が登録された。2008 年 6 月で 1136 人(72.6%)の 2 歳児健診が終了しており、2 歳時点での身体的合併症、精神発達合併症の率を算出する。またこの中で男性外陰部異常者を抽出し、周産期異常との関連、妊娠中の食事習慣、生活環境での環境化学物質

の暴露の可能性について検討する。更に胎児環境の biological marker としての乾燥保存臍帯での環境化学物質測定を行うため、研究参加者に提供を依頼する。
(倫理面への配慮)

本研究を遂行するにあたり、研究実施期間の倫理委員会の承認をとっており、被験者の保護者には検査内容や予想される不利益、利益等について、口頭及び文書にて十分説明し文書にて同意をえている。本研究は、文部科学省・厚生労働省による「疫学研究に関する倫理指針」（平成 14 年 6 月 17 日策定、平成 19 年 8 月 16 日全部改正）を遵守し、被験者の人権保護ならびに個人情報保護に十分に注意を払う。個人情報保護法に従い、個人情報の取り扱いについては十分な注意を払う。

C. 研究結果

出生後は半年毎のアンケート調査に加え、生後 1 ヶ月、6 ヶ月、2 歳の健診を行い受診率はそれぞれ 99.6%、85.3%、72.6% であり、2 歳児は 1136 人が健診を受けた（表 1）。それぞれの健診で発達発育に何らかの問題を認めた児が 154 人おり、外来での経過観察により現在のところ 73 人が周産期異常、染色体異常、奇形症候群、精神遅滞、発達障害と診断されている。泌尿生

生殖器系の異常を認めたものが 32 例あり (図 1)、そのうち男児外陰部異常として診断された児は 17 例であった (表 2)。その内訳は尿道狭窄 6 例、停留精巣 6 例、尿道下裂 2 例、両側遊走精巣 2 例、陰嚢水腫 1 例で、尿道狭窄、停留精巣、尿道下裂例は手術を受けている。コホート参加出産児の平均体重は 2956g で、そのうち 2500g 以下の低出生体重児は 12% を占めており、厚生労働省統計でのわが国の低出生体重児の割合は 1975 年 4.6%、以降 93 年 6.3%、03 年 9.1% と次第に増加しているが、それよりも更に高率であった。男児外陰部異常症者の平均在胎週数、出生体重は 38 週、2952 g であり、また母親年齢平均 33 歳、父親平均年齢 33 歳で参加者平均との相違は無かった。

乾燥保存臍帯は 700 人以上の参加者に提供を依頼し現在のところ 76 人の方に協力承諾を得て解析を進めている。

D. 考察

数十年前に比べ小児における内分泌系の変化が報告されている。即ち二次性徴の発現の早期化、男子尿道下裂、停留精巣発症率の増加などである。その変化には内分泌作用をもつ様々な環境化学物質の影響が推測されている。本コホート研究で診断された男児外陰部異常症 17 例の内訳は、尿道下裂 2 例、停留精巣 6 例、尿道狭窄症 6 例、その他 3 例であった。この尿道下裂の頻度(0.137%)は、1991 年に報告されたオーストラリアのコホート研究における頻度(77/56037=0.137%)と同等である。尿道下裂のリスク因子については、国内外において因果推論にたる適切な報告がない。欧米と日本では生活環境、栄養環境とも大きく異なっており、エストロゲン作用のある摂取環境化学物質質量や、化学物質やホルモン代謝に関する遺伝的な多形など大きく異なっていると推測されるので日本人を対象とした研究が不可欠である。今後、コホート研究のアンケート調査で得られている妊娠中の体重増加、食事習慣、生活環境について発症との関連の検討を行う予定である。これまで生体試料を用いて環境化学物質の曝露量と外陰部異常症発症についての研究を行っている報告はない。現在乾燥保存臍帯の環境化学物質濃度を測定しており、それとの関連についても検討を行っている。2009 年 3 月より開始する 5 歳児健診では、外陰部異常症とされた児童の発

達。発育を調査し、内分泌系以外の精神神経発達にも影響が及んでいないか検討する予定である。しかしこれまで、

E. 結論

成育出生コホートでの前向き研究において参加者 1565 人中 32 例の泌尿生殖器系の異常を認めた。そのうち男児外陰部異常として診断された児は 17 例で、その内訳は尿道狭窄 6 例、停留精巣 6 例、尿道下裂 2 例、両側遊走精巣 2 例、陰嚢水腫 1 例であった。関連する因子については現在検討中である。

F.

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 洲鎌盛一。熱性けいれんで来院した児に必要な検査は何か？ 真部 淳、上村克徳 編集。小児科研修の素朴な疑問に答えます。メディカル・サイエンス・インターナショナル、東京、2008 年 5 月。

2. 洲鎌盛一。単純型熱性けいれんにジアゼパム座薬の投与は必要か？ 真部 淳、上村克徳 編集。小児科研修の素朴な疑問に答えます。メディカル・サイエンス・インターナショナル、東京、2008 年 5 月。

3. 洲鎌盛一。入眠時の気になる行動。子どもの睡眠。小児内科 2008;40:81-83

4. 洲鎌盛一。成長と発達。小児看護ポケットナビ。斉藤理恵子、早坂素子、西海真理。編集。中山書店、東京、2008 年 7 月。

5. 洲鎌盛一。体重増加不良(FTT)と発達障害。成育医療センターメールマガジン 2008 年 3 月 3 日

6. 洲鎌盛一。胃食道逆流症を伴い長期に経管栄養を必要とした 22q11.2 欠失症候群の症例。監修 里宇明元、藤原俊之。編集 植松宏、太田哲生、大塚友吉、混同国嗣、清水充子、高橋秀寿、辻哲也。ケーススタディ 摂食・嚥下リハビリテーション 50 症例から学ぶ実践的アプローチ 医歯薬出版 東京 2008 年 9 月

2. 学会発表

1. 岸野愛、洲鎌盛一。低出生体重児のアテトーゼ型脳性麻痺。ビリルビン脳症を伴わない核黄疸？

日本小児科学会、2008 年 4 月 東京。

2. 洲鎌盛一。脳室周囲白質軟化症(PVL)好発時期以前出生児の錐体路症状と頭部 MRI 所見

日本周産期新生児学会 2008 年 10 月、東京。

3. 岸野愛、洲鎌盛一。周産期低酸素性虚血性脳障害 (HIBD)による中心被蓋路病変の出現頻度。日本小児神経学会 2008 6月、東京

4. 洲鎌盛一。粗大脳病変のない在胎 25 週以下の児の神経行動学的予後。日本小児神経学会 2008 6月、東京

5. 余谷暢之 秋山紀子 大原佳央里 古賀晋一郎 洲鎌盛一 阪井裕一。低出生体重児は増えているか？－当センターコホート研究での低出生体重児の動向－ 外来小児科学会、2008 年9月名古屋

6. 鋤柄小百合、島田姿野、古賀晋一郎、前川貴伸、土田尚、洲鎌盛一、高山ジョニー郎。広汎性発達障害児をもつ母親の QOL の検討。外来小児科学会、2008 年9月名古屋

7. 岸野愛、鋤柄小百合、島田姿野、洲鎌盛一、阪井裕一。単純性 dimple と殿裂偏奇症例での脊髄病変のリスク。外来小児科学会、2008 年9月名古屋

8. 安達晋吾、洲鎌盛一、阪井裕一。広汎性発達障害児の早期徴候。外来小児科学会、2008 年9月名古屋
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他