

表 1

発達健診受診率

年齢	1ヶ月	6ヶ月	2歳
受診率	99.6%	85.3%	72.6%
	1558/ 1565	1336/ 1565	1136/ 1565

図 1

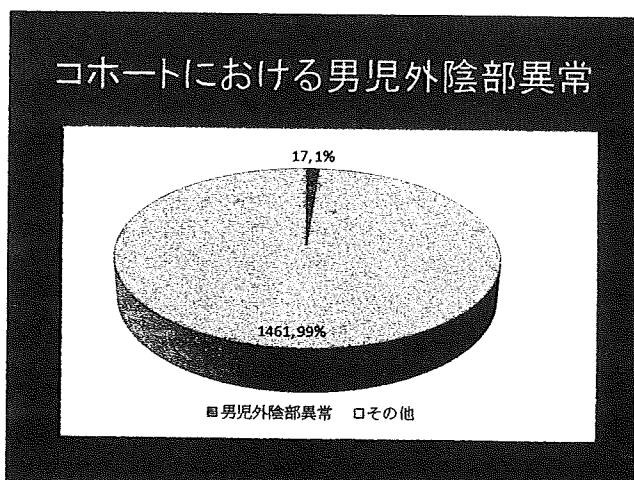


表 2

コホートにおける男児外陰部異常

年齢	出生数	出生日	父年齢	母年齢	診断内容
35w	3335	2004/8/12			29尿道下裂、右陰嚢水腫、左停留精巣術後
40w6d	2732	2005/9/25	28		30尿道下裂
40w	3170	2004/7/6			25左停留精巣術後
38w4d	4032	2005/10/31	41		39左停留精巣術後
39w1d	2805	2006/1/31	40		37右停留精巣術後
39w6d	3000	2006/4/8	41		43右停留精巣術後
38w	3000	2006/4/7	35		35右停留精巣術後、左遊走精巣、尿道副腺増殖術後
40w5d	3635	2005/1/21	34		32右精巣核転位定所、左精巣増殖
36w6d	2118	2005/6/16			21左陰嚢水腫術後
38w	2538	2005/6/21	36		29両側遊走精巣
40w5d	2840	2004/10/24	32		33両側遊走精巣

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

研究分担者 独立行政法人 国立環境研究所 主任研究員 曾根秀子

研究要旨

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のダイオキシン関連遺伝子群の遺伝子の一塩基多型（SNP）と停留精巣、尿道下裂及びマイクロペニスの疾患頻度との関係について検討した。その結果、疾患群と正常群の間で優位な差が、ARNT2 と CYP17A1 の SNP の頻度に認められ、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。

A. 研究目的

停留精巣、尿道下裂及びマイクロペニスなどの男児外陰部異常症および生殖機能障害の疾患要因には、胎児期のエストロゲン様物質の曝露がそれら疾患の発症の誘引や進展に関与しているとの懸念がある。過去10年にわたり、環境中に存在する化学物質のうち、ポリ塩化ダイオキシン、ポリ塩化ビフェニルの類縁体及びビスフェノール A などに、エストロゲン様作用や抗エストロゲン様作用のあることが報告されてきた。したがって、これら化学物質が、男児外陰部異常症の発症や進展に関与していると最も強く疑う必要があると思われる。そこで、我々は、これまでに、インフォマティクスなアプローチによりエストロゲン受容体と相互作用のある核内受容体、それらのアゴニスト及びアゴニストが応答する遺伝子群（以下、ダイオキシン関連遺伝子群）を選定した。このダイオキシン関連遺伝子群の発現変化や異常分子種の発現などが、男児外陰部異常症の発症や病態の進展に関与することが明らかになれば、母体や新生児、乳児の化学物質の影響リスクに関する管理に役立つものと考えられる。

そのために、本研究課題では、選定したダイオキシン関連遺伝子群の遺伝子多型と停留精巣、尿道下裂及びマイクロペニスの疾患頻度との関係について検討した。

B. 研究方法

ダイオキシン関連遺伝子群には、AHR, AHRR, ARNT, ARNT2, CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP17A1, CYP19A1, CYP2B6, CYP3A4, RXRA, RXRB, RXRG 及び NRI2 (PXR) の15遺伝子の多型のアレル型と、頻度について、日本人210人及びイタリア人187人を調べた。解析に用いた検体の内訳は、日本人に関しては、正常検体が、91、疾患の検体数が119（内訳：停留精巣62、尿道下裂23、マイクロペニス34）であった。イタリア人は、正常検体が、137及び疾患検体が55（内訳：停留精巣46、尿道下裂8、マイクロペニス1）であった。塩基の型は、イルミナのゴールデンゲートアレイを用いて測定した。多型解析には、GeneSpring GT 及び SAS (version9.0)を用いた。さらに、統計的有意差のあった SNP に関しては、化学物質の応答性及び選択的 RNA スプライシングを調べるために、プライマーの設計を行った。

C. 研究結果

日本人に関しては、 χ^2 乗検定で有意のあった遺伝子 ARNT2, CYP17A1, CYP1A2, NR1I2, AHR の5遺伝子の計25 SNP について、オッズ比を調べたところ、停留精巣では、どの SNP でもオッズ比の増加は認められなかったが、尿道下裂で ARNT2 の rs12148133 に 5.1 (95%信頼区間 1.5-16.6)、マイクロペニスで NR1I2 の rs3814055 に 2.3 (1.0-5.2)、rs7643038 に 2.3 (1.0-5.2) 及び CYP1A2 の rs2069521 に 3.6 (1.1-11.8) の正常との違いが認められた。各疾患のサ

ンプル数が少ないため、トレンド解析により再度検定を行ったところ、0.0001 以下と有意な差が認められた SNP は、停留精巣で、CYP17A1 の rs743572 及び rs6163 と、CYP1A2 の rs2069522、AhR の rs3757824、ARNT2 の rs8024819 rs10438389、NR1I2 の rs9859568 であった。尿道下裂においても同様な SNP に有意な差が認められた。しかし、マイクロペニスではどの SNP でも差が認められなかった。一方、イタリア人の ARNT2, CYP17A1, ARNT2, NR1I2, AHR の 5 遺伝子の同じ SNP に関してオッズ比及びトレンド解析を行ったところ、停留精巣では、ARNT2 の rs8024819、尿道下裂では、ARNT2 の rs10431813 と rs4423382 にオッズ比の増加が認められた。イタリア人の停留精巣に関するトレンド解析では、0.05 以下と有意のあった SNP は、CYP17A1 の rs743572 及び rs6163 と ARNT2 の rs8024819、rs12148133 と AhR の rs3757824、NR1I2 の rs7643038 であった。

D. 考察

解析した遺伝子ごとに、SNP の位置及びハプロタイプブロックの中にある SNP かどうかを検討した。まず、CYP17A1 については、日本人とイタリア人とも、オッズ比解析及びトレンド解析のいずれかで疾患と正常の両群で有意のあった SNP は、rs743572 及び rs6163 であった。この二つの遺伝子は、同一のハプロタイプブロック内に存在していた。ARNT2 では、rs8024819、rs12148133、rs10431813 及び rs4423382 で両群に違いが認められたが、いずれもハプロタイプブロックを構成する SNP はなかった。NR1I2, AHR 及び CYP1A2 に関しては、両人種間で共通した SNP は認められなかった。これらのことから、今回解析した男児外陰部異常症疾患の発症や病態の進展に関与すると疑われるダイオキシン関連遺伝子は、ARNT2 と CYP17A1 であると示唆された。現在、この二つの遺伝子について、選択的 RNA の有無や化学物質感受性について検討している。

E. 結論

ダイオキシン関連遺伝子群の遺伝子多型と停留精巣、尿道下裂及びマイクロペニスの疾患頻度との関係について検討した。その結果、ARNT2 と CYP17A1 が疾

患の発症や病態の進展に関与する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 曾根秀子 正常ヒト乳腺上皮細胞におけるビスフェノールAの分化、増殖及び老化に及ぼす影響. 日本トキシコロジー学会 第35回研究発表会 (2008)

Sone H: Gene Expression Signatures of Environmental Chemicals in Cancer and Developmental Disorders. 第14回国際フリーラジカル学会、北京 (2008) .

2. 曾根秀子 黄倉雅広: 化学物質の毒性予測及びリスク評価手法確立のための基盤システムの構築 日本バイオインフォマティクス学会第4回オントロジー研究会、東京 (2008) .

3. Nagano R, Shigeru K, Imanishi S, Ohsako S, Zaha H, Ohkura M, Yonemoto J, and Sone H. Cellular image profiling of neural differentiation pattern of mouse embryonic stem cells with morphological information. 第41回日本発生生物学会、徳島 (2008) .

4. Imanishi Satoshi, Yonemoto Junzo, Sone Hideko: Evaluation of Vascular Toxicity of Permethrin in Human Endothelial Cell and Mouse ES Cell, SOT Annual meeting March, 2008 (Seattle).

5. Imanishi S, Akanuma H, Okura M, Shiraishi H, Fujimaki H, Sone H. Prenatal Exposure to Permethrin Causes Vascular Malformations in the Fetal Brain and Decreases Motility of Adult Mice. SOT Annual meeting March, 2009 (Baltimore).

6. 今西 哲、米元純三、曾根秀子. ヒト血管内皮細胞とマウス ES 細胞を用いたペルメトリンの血管毒性の評価. 第11回環境ホルモン学会 2008 (東京)

7. 赤沼宏美、永野麗子、小池上繁、今西哲、豊柴博

義、黄倉雅広、曾根秀子. ES 細胞から神経系の分化過程における遺伝子ネットワーク解析. 第 11 回環境ホルモン学会 2008 (東京)

8. 永野麗子、小池上 繁、今西 哲、赤沼宏美、宮崎 航、大迫誠一郎、黄倉雅広、曾根秀子. マウス ES 細胞を用いたマルチプロファイリング技術による化学物質の影響評価の開発第 11 回環境ホルモン学会 2008 (東京)

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

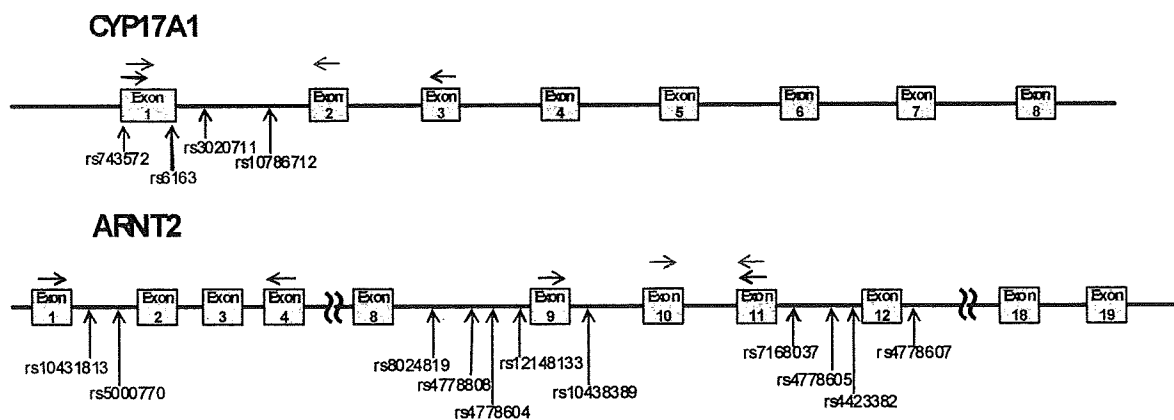


図 1 CYP17A1 及び ARNT2 の DNA 遺伝子構造と χ 二乗検定

(日本人)で有意差が認められた SNP の位置の俯瞰図

↑ SNP
 → リアルタイムPCR用 primer
 → RT-PCR用 primer

図2 HaplotypeView によるイタリア人 SNP のケースコン

トロール解析-個々の SNPs

Variation	Physical Position	D	D'	Rho	Chi Squared	Degrees of Freedom	p-Value	gene name
rs2672740	5:-443636	0.0202	0.393	0.117	5.212	1	0.0224	AHRR
rs6899226	5:446377	0.0176	0.342	0.102	3.956	1	0.0467	AHRR
rs1030572	1:-147608	0.00746	1	0.104	4.122	1	0.0423	ARNT
rs1085193	15:786469	0.0275	0.148	0.128	6.06	1	0.0138	ARNT2
rs1020397	15:785057	0.0266	0.154	0.121	5.611	1	0.0178	ARNT2
rs8024819	15:786150	0.00705	0.474	0.109	4.581	1	0.0323	ARNT2
rs1163555	15:786457	0.022	0.12	0.103	3.876	1	0.049	ARNT2
rs3740397	10:-10458	0.0249	0.201	0.111	4.737	1	0.0295	CYP17A1
rs6163	10:104586	0.0238	0.19	0.106	4.311	1	0.0379	CYP17A1
rs743572	10:104587	0.0238	0.19	0.106	4.311	1	0.0379	CYP17A1
rs1078671	10:104586	0.023	0.185	0.103	4.05	1	0.0442	CYP17A1
rs2289105	15:492948	0.0249	0.172	0.11	4.671	1	0.0307	CYP19A1
rs9944225	15:493153	0.0137	0.217	0.107	4.369	1	0.0366	CYP19A1
rs1143704	15:-49297	0.0234	0.164	0.104	4.128	1	0.0422	CYP19A1
rs2255192	15:492881	0.0193	0.115	0.101	3.892	1	0.0485	CYP19A1
rs2567206	2:3821518	0.0339	0.213	0.181	12.55	1	0.000396	CYP1B1
rs2551188	2:3821444	0.0342	0.206	0.18	12.27	1	0.000461	CYP1B1
rs1017533	2:3821929	0.0313	0.196	0.167	10.69	1	0.00108	CYP1B1
rs4646429	2:-382185	0.0302	0.194	0.163	10.1	1	0.00148	CYP1B1
rs1056836	2:-382098	0.0274	0.254	0.125	6.018	1	0.0142	CYP1B1
rs2855658	2:-382085	0.0263	0.24	0.12	5.511	1	0.0189	CYP1B1
rs9341266	2:-382076	0.0108	0.34	0.116	5.137	1	0.0234	CYP1B1
rs9341257	2:-382103	0.00372	1	0.114	5.008	1	0.0252	CYP1B1
rs2291287	19:462142	0.0119	0.336	0.121	5.626	1	0.0177	CYP2B6
rs1403527	3:-120989	0.0191	0.4	0.113	4.933	1	0.0263	NR1I2
rs7643038	3:1209797	0.023	0.211	0.105	4.209	1	0.0402	NR1I2
rs1054190	3:1210194	0.012	0.671	0.109	4.049	1	0.0442	NR1I2
rs3814055	3:1209827	0.0222	0.206	0.101	3.95	1	0.0469	NR1I2

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

研究分担者 安彦 行人(国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 主任研究官)

研究要旨

ヒト ESR1 遺伝子のエストロジェン感受性をもたらすと予想されるゲノム上の塩基配列を、in vivo で機能解析することを目的に、ヒト感受性ハプロタイプ領域をマウスの該当領域にノックインしたマウスの作製を行う。

A. 研究目的

ヒト ESR1 遺伝子のエストロジェン感受性をもたらすと予想されるゲノム上の塩基配列を、マウスゲノムの該当領域にノックインしたマウスを樹立し、その機能を in vivo で解析することを目的とする。

B. 研究方法

ヒトおよびマウスゲノムから ESR 遺伝子を含む断片を取得し、遺伝子ターゲティングのためのベクターを構築する。具体的には、ヒト野生型およびエストロジェン感受性ハプロタイプそれぞれの配列を、マウスの該当領域に隣接する配列で挟んだ組換え DNA を作製し、ターゲティングベクターとする。

完成したターゲティングベクターをエレクトロポレーション法によりマウス ES 細胞に導入し、相同組み換え体を選別後、キメラマウスの作製を経て目的の遺伝子組み換えマウス個体を得る。

（倫理面への配慮）

遺伝子組み換え実験に関しては、導入遺伝子の文献調査などにより安全性を逐一検討するとともに、遺伝子改変生物の逃亡防止など管理を厳格に行っている。また関係機関に対して必要とされる手続きを随時、遅滞なく行い、法令遵守に万全を期している。

C. 研究結果

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 10 kb 以上とかなり大きいものの、分担者の所属機関にて 7 kb 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。

さらに、上記遺伝子ターゲティングの技術的・方法的裏付けとなる、異種生物のシス制御配列をノックインしたマウス（メダカゲノムの一部をマウスゲノムの該当領域にノックインしたマウス）の解析を進め、原著論文として Development 誌に発表した。また、国内外の学会にて発表を行った。

E. 結論

ノックインマウスを用いたヒトハプロタイプの解析に技術的裏付けを得た。それに従い、ターゲティングベクターの設計を行い、構築作業を進めている。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1-1. Functional importance of evolutionally conserved Tbx6 binding sites in the presomitic mesoderm-specific enhancer of Mesp2.

Yukuto Yasuhiko, Satoshi Kitajima, Yu Takahashi,

Masayuki Oginuma, Harumi Kagiwada, Jun Kanno, and

Yumiko Saga

Development. Vol.135, Issue 21, Nov 2008, pp.3511-3519

2. 学会発表

該当無し

2-1. Functional importance and evolutionary conservation of Tbx6 binding sites in presomitic mesoderm (PSM) specific enhancer of Mesp2

2. 実用新案登録

該当無し

Yukuto Yasuhiko, Satoshi Kitajima, Yu Takahashi, Masayuki Oginuma, Harumi Kagiwada, Jun Kanno and Yumiko Saga

3. その他

該当無し

第41回日本発生生物学会年会(徳島市)

2-2. Multiple, evolutionally conserved T-box binding sites in cis-regulatory sequence are required for presomitic mesoderm (PSM) specific expression of Mesp2

Yukuto Yasuhiko, Satoshi Kitajima, Yu Takahashi, Masayuki Oginuma, Harumi Kagiwada, Jun Kanno and Yumiko Saga

日本発生生物学会・フランス発生生物学会合同年会
"Frontiers in Developmental Biology 2008"(フランス・イ
ェール市)

2-3. Functional Importance of Evolutionally Conserved Tbx6 Binding Sites in the Presomitic Mesoderm (PSM) Specific Enhancer of Mesp2

Yukuto Yasuhiko, Satoshi Kitajima, Yu Takahashi, Masayuki Oginuma, Harumi Kagiwada, Jun Kanno and Yumiko Saga

The 16th CDB Meeting, "Cis-sequence Regulation and its Evolution"(神戸市)

2-4. Functional importance of evolutionally conserved Tbx6 binding sites in the presomitic mesoderm (PSM) specific enhancer of Mesp2

Yukuto Yasuhiko, Satoshi Kitajima, Yu Takahashi, Masayuki Oginuma, Harumi Kagiwada, Yumiko Saga and Jun Kanno

第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同
年会(神戸市)

(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

各種化学物質の測定と曝露量の推定に関する研究

研究分担者 米元純三

独立行政法人 国立環境研究所 環境リスク研究センター 副センター長

研究要旨

男児外陰部異常症および生殖機能障害の発症や病態の進展における、化学物質の関与を調べるために、個体感受性と曝露量の両者の観点から検討を行うのが、本課題の主旨である。本年度は、化学物質測定方法の検討と化学物質のエストロゲン活性並びに、疾患に関連すると考えられるダイオキシン応答遺伝子の応答性を検討した。エストロゲン活性は、概ねこれまでの報告と一致する結果であった。CYP17A1の発現は、E2、BPA、ppDDTで抑制され、ARNT2の発現は4-OH-PCB107及び4-OH-PCB187で抑制された。

A. 研究目的

本研究の目的は、大課題「男児外陰部異常症および生殖機能障害と化学物質：個体感受性と曝露量に関するゲノム疫学研究」において、男児外陰部異常症および生殖機能障害の発症や病態の進展における、化学物質の関与を個体感受性と曝露量の両者の観点から解明することである。曝露量の推定には、患者及び母親血液と尿、臍帯血、臍帯及び胎盤組織の化学物質濃度の分析が不可欠である。また、候補となる化学物質は、ジフェニル・エーテル、ポリ塩化ビフェニル及びポリ塩化ジベンゾパラジオキシンからビスフェノール、フタル酸エステル類まで異なった化学構造を有する化学物質群である。そのため、本年度は、測定準備のために、分析に関する文献を精査し、少ない試料で曝露量を測定できるかどうか検討した。また、実際のヒト試料の測定の前に、測定候補となる化学物質のエストロゲン活性を確認し、測定物質の絞込みも実施した。個体感受性の観点から化学物質の応答性を調べるために、エストロゲン活性が見出された化学物質について、疾患関連遺伝子の応答性を調べた。

B. 研究方法

化学物質測定準備：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、次に記載するプロトコルの確認を行った。「ヘキサン/エチルエーテルで抽出し、Florisil、シリカゲル及び濃硫酸でクリーンアップと分画を行う。PCB(PCB 118、138、153、170と180; 4-OH-PCB187,4-OH-PCB146、4-OH-PCB109、3'-OH-PCB138と4'-OH-PCB165)は、60-m DB-5キャピラリーカラムの上で、電子捕獲型検出器を用いた高解像度キャピラリー・ガスクロマトグラフィーを使って分析する。PBDEs(BDE 47、153、197、207と209)は、30mDBの-5HTキャピラリーカラムの上で、ガスクロマトグラフ-イオントラップ型質量分析計により分析を実施する。」プロトコルの確認を行った。

尿中フタル酸塩類とBisphenol A(BPA)の測定については、次のプロトコルの確認を行った。「尿サンプルは、 β -グルクロニダーゼで37°C 2時間の加水分解を行う。フタル酸塩代謝物質(MEHP, MCP, MBzP, MEPとMMP)は、1mlの尿をプレカラムで精製した後、逆相高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により分離する。遊出した代謝物は、タンデム質量分析によって定量化する。BPAは、半自動の蒸気蒸留と固体の段階抽出を行い、tert-butyl dimethylsilylに変換した後、N-tert-butyl dimethylsilyl-N-methyl trifluoroacetamide(MTBSTFA)を添加してGC-MS/MSシステムで測定する。」

ヒト卵胞癌細胞を用いたエストロゲン活性測定：

エストロゲン応答配列にルシフェラーゼ遺伝子をリポーター遺伝子として連結した外来遺伝子を導入したヒト卵胞癌細胞 (BG1Luc4E2) を5%CO₂ 及び37°C に保ったインキュベータで培養し、各種化学物質の濃度を培養プレートに添加した。添加24時間後に培養液をリン酸緩衝液(pH7.5)で置換後、細胞溶解液を添加し、細胞を破濁の後、ルシフェラーゼ活性をルミノメーター (ATTO AB-2100) で測定した。また、化学物質添加24時間後に、RNAを抽出し、CYP17A1及びARNT2のmRNA発現レベルを調べた。

(倫理面への配慮)

ヒト検体を使用する際には、文部科学・厚生労働・経済産業省「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守して研究を実施する。なお、本研究に関連する内容は、全て独立行政法人国立環境研究所医学倫理審査委員会の承認済である。

C. 研究結果

化学物質測定準備: 過去5年間の文献調査の検討を行った。論文を精査し、試料のタイプ(血液及び尿)、試料の抽出方法、検出機器を表1~表3にまとめた。我々が用いる予定の測定方法との比較検討を行った。残留性有機塩素化合物(POPs)については、Bradmanらが、炭素安定同位体¹³CでラベルBDE-85を内部標準として用いた方法で0.6gの血清(あるいは血漿)を使用しており、最も微量であった。bisphenol Aでは、2報文献を検出し、スポット尿を測定していた。フタル酸エステル類では、1報に、1mlの血清を用いた報告があった。尿中濃度の測定は、スポット尿がほとんどであった。

ヒト卵胞癌細胞を用いたエストロゲン活性測定及び疾患関連遺伝子且つダイオキシン応答遺伝子の反応性: 17β-estradiol, bisphenol A, TCDD, 4-OH-PCB107及び4-OH-PCB187について、ルシフェラーゼ活性を指標とした用量反応関係を調べた。その結果、17β-estradiol (E2)は 10^{-12} - 10^{-8} Mの範囲で、bisphenol A及びoctylphenolは 10^{-10} - 10^{-6} Mの範囲で、TCDDは 10^{-10} - 10^{-7} Mの範囲で、4-OH-PCB107及び4-OH-PCB187は、 10^{-9} - 10^{-5} Mの範囲で、培地添加濃度に依存して活性が上昇することがわかった。op-DDT及びpp-DDTは、ルシフェラーゼ活性を抑制

した。これらの反応は、選択的なエストロゲン受容体アンタゴニストで前処理すると消失した。また、網羅的SNP解析により見出された男児外陰部異常症疾患に関与していると思われるCYP17A1及びARNT2の化学物質(E2, BPA, op-DDT, pp-DDT, 4-OH-PCB107及び4-OH-PCB187)に対する応答性を同様のヒト卵胞癌細胞(BG1Luc4E2)を用いて調べるために、Taqmanプローブを用いたリアルタイムPCRで定量した。その結果、CYP17A1の発現は、E2及びppDDTで約半減し、4-OH-PCB187で1.2倍であった。一方、ARNT2の発現は、E2で変化がなく、op-DDTで1.5倍、4-OH-PCB107及び4-OH-PCB187で半減した。

D. 考察

化学物質測定準備: 血液を用いた測定に関しては、2-12歳までの子どもから採取するため、通常の測定スケールよりダウンサイジングが可能かを検討する必要があると思われた。フタル酸エステル及びビスフェノールAについては、スポット尿の事例が多いので、尿を用いることが妥当と考えられた。

ヒト卵胞癌細胞を用いたエストロゲン活性測定及び疾患関連遺伝子且つダイオキシン応答遺伝子の反応性: 17β-estradiol (E2), bisphenol A, octylphenol, TCDD, 4-OH-PCB107, 4-OH-PCB187, op-DDT及びpp-DDTのエストロゲン活性を調べたところ、概ねこれまでの報告と一致した活性が得られた。そこで、これら化学物質の50%ルシフェラーゼ活性を引き起こす濃度で、正常と患者間で遺伝子多型の検出頻度が有意に異なっている遺伝子CYP17A1及びARNT2について、ルシフェラーゼ活性を調べたときと同じヒト卵胞癌細胞(BG1Luc4E2)を用いて、これら両遺伝子の発現を調べた。興味深いことに、ルシフェラーゼリポーターアッセイによるエストロゲン活性の高い化学物質(E2及びbisphenolA)でCYP17A1の発現が抑制された。また、4-OH-PCB107及び4-OH-PCB187でARNT2の発現が抑制されたこと、op-DDTで増加された事はこれまでに報告はなく、新しい知見であった。男児外陰部異常症の発症や病態の進展を考える上で、AHRシグナル伝達とエストロゲン・アンドロゲン代謝の相互関係については、考慮すべきものと思われた。

E. 結論

化学物質の関与を個体感受性と曝露量の両者の観点から調べるために、本年度は、化学物質測定方法の検討と化学物質のエストロゲン活性並びに、疾患に関連すると考えられるダイオキシン応答遺伝子の応答性を検討した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Kamata, R., Shiraishi, F., Nishikawa, J., Yonemoto, J., Shiraishi, H. (2008) Screening and detection of the in vitro agonistic activity of xenobiotics on the retinoic acid receptor. *Toxicol In Vitro* **22**, 1050-1061
- 2 Nishimura, N., Matsumura, F., Vogel, C. F., Nishimura, H., Yonemoto, J., Yoshioka, W., Tohyama, C. (2008) Critical role of cyclooxygenase-2 activation in pathogenesis of hydronephrosis caused by lactational exposure of mice to dioxin. *Toxicol Appl Pharmacol* **231**, 374-383
- 3 Sone, H., Yonemoto, J. (2008) A genome informatics and epidemiological study identifies alleles in ARNT2 associated with risk of hypospadias

and micropenis. *Organohalogen Compounds* **70**, 1004-1007

- 4 Yonemoto, J., Kawahara, J., Hattori, T., Matsumura, T., Sugama, S. (2008) Concentration of PCBs and OH-PCBs in preserved umbilical cords. *Organohalogen Compounds* **70**, 2436-2438

2. 学会発表

- 1 米元純三, 河原純子, 服部達也, 松村徹, 洲鎌盛一 (2008) 保存臍帯中のOH-PCB、PCB濃度一軽度発達障害児における予備的検討一. 日本内分泌攪乱化学物質学会第11回研究発表会, 東京
- 2 今西哲., 米元純三, 曾根秀子 (2008) ヒト血管内皮細胞とマウスES細胞を用いたペルメトリンの血管毒性の評価. 日本内分泌攪乱化学物質学会第11回研究発表会, 東京

(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

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

表 1 POPS (PCB, PCDD, PBD, DDE/DDT)に関する分析方法の検討

	著者	論文題名	年、巻、頁	検体試料	分析機器	抽出方法
1	Trejo-Acevedo A, Diaz-Barriga F, Carrizales L et al.	Exposure assessment of persistent organic pollutants and metals in Mexican children.	Chemosphere. 2009 Feb;74(7):974-80.	Blood	GC-MS	A 2 mL aliquot of plasma was first extracted with a mixture of ammonium sulfate/ethanol/hexane (1:1:3), and the extract was then concentrated and cleaned up on Florisil columns.
2	Sandanger TM, Brustad M, Sandau CD et al.	Levels of persistent organic pollutants (POPs) in a coastal northern Norwegian population with high fish-liver intake.	J Environ Monit. 2006 May;8(5):552-7.	Blood	GC-MS	The plasma samples were extracted on an Oasis HLB solid phase extraction column.
3	Noakes PS, Taylor P, Wilkinson S et al.	The relationship between persistent organic pollutants in maternal and neonatal tissues and immune responses to allergens: A novel exploratory study.	Chemosphere. 2006 May;63(8):1304-11.	Maternal blood/cord blood/placental tissues/adipose tissue/breast milk	GC-ECD	Blood: extracted using hexane; Breast milk: the milk samples were adsorbed onto a non-reactive matrix and the relevant analytes were extracted using a modified accelerated solvent extraction (ASE) procedure. Tissue: the homogenised tissue sample was extracted using hexane
4	Link B, Gabrio T, Zoellner I et al.	Biomonitoring of persistent organochlorine pesticides, PCDD/PCDFs and dioxin-like PCBs in blood of children from South West Germany (Baden-Wuerttemberg) from 1993 to 2003.	Chemosphere. 2005 Mar;58(9):1185-201.	Blood	GC-ECD/HRGC-HRMS	An aliquot of the inner standard was added to the sample and shaken with a mixture of petrol ether/acetone (8/2) three times for sample clean-up.
5	Hertz-Picciotto I, Jusko TA, Willman EJ et al.	A cohort study of in utero polychlorinated biphenyl (PCB) exposures in relation to secondary sex ratio.	Environ Health. 2008 Jul 15;7:37.	Blood	GC-ECD	The PCBs were extracted three times with 90 percent hexane/10 percent dichloromethane, and the extract was passed through a 0.5 percent deactivated florisil column. The PCBs were eluted with 60 milliliters of hexane and then 60 milliliters of 50 percent hexane/50 percent dichloromethane.
6	Bloom MS, Buck Louis GM, Schisterman EF et al.	Maternal serum polychlorinated biphenyl concentrations across critical windows of human development.	Environ Health Perspect. 2007 Sep;115(9):1320-4.	Blood	GC-ECD	Serum samples were mixed with solutions of International Union of Pure and Applied Chemistry PCB isomers no. 46 and 142 (surrogate standards) and left overnight to equilibrate.
7	Park H, Lee SJ, Kang JH et al.	Congener-specific approach to human PCB concentrations by serum analysis.	Chemosphere. 2007 Aug;68(9):1699-706.	Blood	HRGC-HRMS	Each human serum sample was added to a 500 ml separatory funnel and spiked with a suite of ¹³ C ₁₂ -labeled PCBs as surrogate internal standards. The sample was liquid/liquid extracted three times with 200 ml of 2:1 acetone/hexane.
8	Bradman A, Fenster L, Sjodin A et al.	Polybrominated diphenyl ether levels in the blood of pregnant women living in an agricultural community in California.	Environ Health Perspect. 2007 Jan;115(1):71-4.	Blood	GC-isotope dilution HRMS	The samples (0.6-3.6 g) were fortified with ¹³ C-labeled internal standards [750 pg/congener, except 2,2',3,4,4'-pentaBDE (BDE-85)]. The samples were thereafter denaturated with 6 mol/L hydrochloric acid (1 mL) and 2-propanol (6 mL) with mixing between each addition and extracted with n-hexane/methyl-tert-butyl ether (6 mL, 1:1 by volume)

表2 尿中 Bisphenol A の測定方法

	著者	論文題名	年、巻、頁	検体試料	分析機器	抽出方法
1	Calafat AM, Ye X, Wong LY et al.	Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-	Environ Health Perspect 2008 Jan;116(1):39-44.	Urine	HPLC-MS/MS	online solid-phase extraction (SPE)
2	Wolff MS, Teitelbaum SL, Windham G et al.	Pilot study of urinary biomarkers of phytoestrogens, phthalates, and phenols in girls.	Environ Health Perspect 2007 Jan;115(1):116-21.	Urine	HPLC-MS/MS	SPE

表3 フタル酸エステル類の測定方法の一覧

1	Colon I, Caro D, Bourdony CJ et al.	Identification of phthalate esters in the serum of young Puerto Rican girls with premature breast development.	Environ Health Perspect. 2000 Sep;108(9):895-900.	Blood	GC/MS	Serum samples were transported to the analytical laboratory in glass tubes stored at 0° C. Precipitation of serum and plasma proteins was accomplished by adding 1 mL acetonitrile to 1.0 mL sample.
2	Calafat AM, Needham LL, Silva MJ et al.	Exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate among premature neonates in a neonatal intensive care unit.	Pediatrics. 2004 May;113(5):e429-34.	Urine	RPHPLC-IDMS/MS	SPE
3	Sathyanarayan S, Calafat AM, Liu F et al.	Maternal and infant urinary phthalate metabolite concentrations: are they related?	Environ Res. 2008 Nov;108(3):413-8.	Urine	HPLC-IDMS	SPE
4	Sathyanarayan S, Karr CJ, Lozano P et al.	Baby care products: possible sources of infant phthalate exposure.	Pediatrics. 2008 Feb;121(2):e260-8.	Urine	HPLC-IDMS/MS	solid-phase extraction.
5	Teitelbaum SL, Britton JA, Calafat AM et al.	Temporal variability in urinary concentrations of phthalate metabolites, phytoestrogens and phenols among minority children in the United States.	Environ Res. 2008 Feb;106(2):257-69.	Urine	HPLC-IDMS/MS	online solid-phase extraction (SPE)
6	Wolff MS, Teitelbaum SL, Windham G et al.	Pilot study of urinary biomarkers of phytoestrogens, phthalates, and phenols in girls.	Environ Health Perspect. 2007 Jan;115(1):116-21.	Urine	HPLC-IDMS/MS	SPE
7	Weuve J, Sanchez BN, Calafat AM et al.	Exposure to phthalates in neonatal intensive care unit infants: urinary concentrations of monoesters and oxidative	Environ Health Perspect. 2006 Sep;114(9):1424-31.	Urine	RPHPLC-IDMS/MS	SPE
8	Swan SH, Main KM, Liu F et al.	Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure.	Environ Health Perspect. 2005 Aug;113(8):1056-61.	Urine	HPLC-IDMS/MS	online solid-phase extraction (SPE)
9	Koo HJ, Lee BM.	Human monitoring of phthalates and risk assessment.	J Toxicol Environ Health A. 2005 Aug;27(8):1379-92.	Urine	HPLC	The samples were then treated with 200 µl of ammonium acetate (1 M, pH6.5) and β-glucuronidase (to release the phthalate monoesters from their conjugated forms), and this was followed by hexane (2 ml) dissolution.
10	Koch HM, Preuss R, Drexler H et al.	Exposure of nursery school children and their parents and teachers to di-n-butylphthalate and butylbenzylphthalat	Int Arch Occup Environ Health. 2005 Apr;78(3):223-9.	Urine	RPHPLC-MS/MS	Phthalate metabolites were stripped from the urinary matrix by on-line extraction on a restricted-access material (LiChrospher ADS-8, Merck, Darmstadt) precolumn.
11	Calafat AM, Needham LL, Silva MJ et al.	Exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate among premature neonates in a neonatal intensive care unit.	Pediatrics. 2004 May;113(5):e429-34.	Urine	RPHPLC-IDMS/MS	SPE

図1 ヒト卵胞癌細胞 (BG1Luc4E2)における各種化学物質の CYP17A1 mRNA の応答性

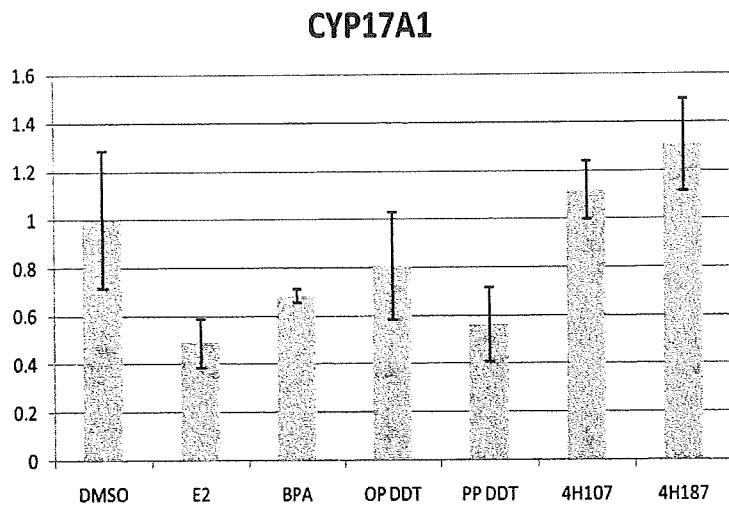
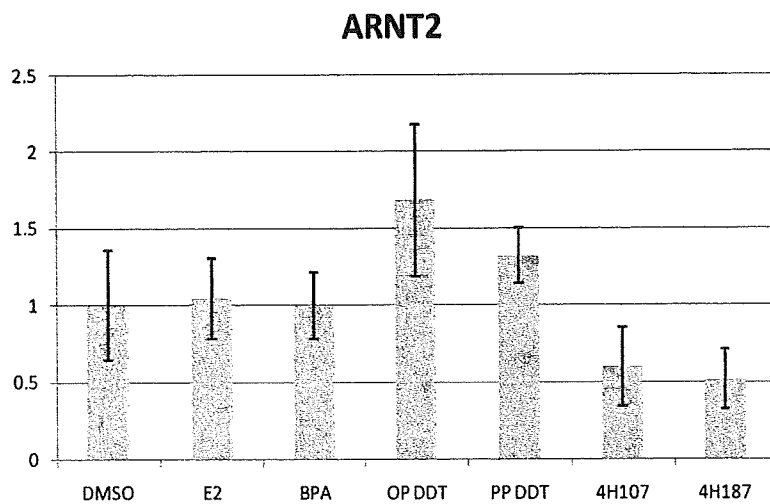


図2 ヒト卵胞癌細胞 (BG1Luc4E2)における各種化学物質の ARNT2 mRNA の応答性



研究成果の刊行一覧表

別紙4

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Fukami M, Wada Y, Okada M, Kato F, Katsumata N, Baba T, Morohashi K, Laporte J,	<i>CXorf6</i> (<i>MAMR1</i> : 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
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	
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
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
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
Kojima Y, Sasaki S, Shinoura H, Hayase M, Kubota Y, Hayashi Y, Tsujiimoto G, Kohri K.	Change of Expression Levels of Alpha1-Adrenoceptor Subtypes by Administration of Alpha1-Adrenoceptor-Subtype-Selective Antagonist Naftopidil in Benign Prostate Hyperplasia Patients.	Prostate.	67	1285-1292	2007

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.
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
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 Nephro	39	771-774	2007
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
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
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 Endocrino	68	791-9	2008
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

Kojima Y, Sasaki S, Shinoura H, Hayase M, Kubota Y, Hayashi Y, Tsujiimoto 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
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
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
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
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.	15	646-8	2008
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
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

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		977-81	2008
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
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 De	in press		
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		
Mizuno K, Hayashi Y, Kojima Y, Nakane A, Tozawa K, Kohri K	Activation of NF-kappaB associated with germ cell apoptosis in testes of experimentally induced cryptorchid rat model.	Urology.	in press		
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		
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.		
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,idic(Y) mixed gonadal dysgenesis.	J Pediar Surg	n press		

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		
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		
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		
Kojima Y, Kurokawa S, Mizuno K, Umamoto 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
Hayashi Y, Kojima Y.	Current concepts in hypospadias surgery.	Int J Urol	15	651-664	2008
Kojima Y, Sasaki S, Hayashi Y, Tsujimoto G, Kohri K.	Subtypes of alpha1-adrenoceptors in BPH: future prospects for personalized medicine.	Nat Clin Pract	6	44-53	2009
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	Int J Urol.	14	:647-9	2007
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