

内分泌かく乱物質の生殖機能と次世代への影響、特に生殖泌尿器系・先天異常
の成因に関する疫学的研究

主任研究者 岸 玲子 北海道大学医学部教授
予防医学講座公衆衛生学分野

研究要旨

内分泌かく乱化学物質の多くは、催奇形性と神経発達の異常等の次世代影響が大きいのが特徴である。本研究では、内分泌かく乱物質の生殖機能と次世代への影響、特に生殖泌尿器系・先天異常の成因を明らかにするために、尿道下裂、停留精巣等の先天異常、不育症、不妊・子宮内膜症等に関する疫学調査と実験動物を用いた曝露実験を行う。尿道下裂、停留精巣等の先天異常の疫学研究では、まず population-based で発生動向を把握し、ついで症例対照研究で患児の生殖器が分化形成する時期の親の内分泌かく乱化学物質への曝露状況を調査する。同時に臍帯血など生体試料中の内分泌かく乱化学物質の濃度の測定を行う。また、不育症、不妊・子宮内膜症に関しては、症例対照研究を行い、内分泌かく乱化学物質との関連を検討する。内分泌かく乱化学物質を用いた曝露実験も同時に行い、次世代の神経内分泌系の影響とそのメカニズムを検討する。

現在、疫学研究および動物実験を継続中であるが、初年度に行った研究から若干の知見が得られた。尿道下裂症例では、LH-RH に対し過剰反応を示したが、hCG 刺激に対してテストステロンの反応は乏しかった。これらの結果から、尿道下裂症例では思春期前の段階から既に何らかの精巣機能障害、特にライディヒ細胞の機能障害が存在することが示唆された。また、不育症例では、グルタチオン転移酵素遺伝子の M1 型の機能欠損型の頻度が高く、妊娠 6-7 週における末梢血 NK 細胞の高活性と染色体正常流産とに関連がみられるなど新しい知見が得られた。スチレンの妊娠ラットへの曝露実験からは、生後直後の仔にセロトニンの減少がみられ、また生後離乳期の 21 日目ではセロトニンの代謝物 5-HIAA の減少と 5-HIAA/5-HT 比の低下がみられた。これらより妊娠中の胎仔脳の発達にとって鋭敏な時期における神経障害作用のある化学物質の曝露は、仔の生後発達に影響を与える可能性が示唆された。

今後、population-based の疫学研究、症例対照研究および動物実験を継続し、内分泌かく乱物質の生殖機能と次世代への影響を詳細に検討する予定である。

分担研究者

小柳 知彦 北海道大学医学部教授
藤本征一郎 北海道大学医学部教授

研究協力者

佐田 文宏、	小橋 元
野々村克也、	柿崎 秀宏
山田 秀人、	星 信彦
和田真一郎、	福士 勝
村雲 雅志、	奥山 和彦
岸田 達朗、	平山 恵美
戸崎 静香、	貢 英彦
笠井世津子、	羽二生知美
片倉 洋子、	池田 聡子
三宅 浩次	

関係の深い薬物代謝酵素等の遺伝子多型について検討する。このような遺伝子多型による個体の感受性の検討は予防上も重要である。さらに症例の術後の follow-up に併せて、児の神経発達や生殖機能の追跡調査を行う。以上の研究は、WHO等で研究の必要性が指摘されながら、科学的な根拠がこれまで乏しかった生殖機能や次世代影響について、日本の疫学データの蓄積をもって応えるもので確実な成果が期待される。

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質の多くは、催奇形性と神経発達の異常等の次世代影響が大きいのが特徴である。今回の研究では、尿道下裂、停留精巣等の生殖尿路系の先天異常の疫学研究を population-based で行い、発生率そのものが近年、真に増加しているかどうかを検討する。ついで、症例対照研究で、症例の母および父が、患児の生殖器が分化形成する時期に、内分泌かく乱化学物質（有機塩素系殺虫剤、PCB、あるいは、医薬品や植物性エストロゲン等）への曝露の有無、曝露量、種類等を調査する。同時に臍帯血や母親の静脈血等を保存し、内分泌かく乱の疑いのある環境化学物質の濃度の測定を行う。これらの環境要因の検討と同時に、内分泌かく乱化学物質の代謝に

子宮内膜症は慢性骨盤痛や不妊をきたす疾患であり、生殖年齢にある女性の QOL、あるいは妊孕能を障害し、少子化にも関与していく。さらに有病率も高く、本疾患の成因を明らかにすることの社会的意義は大きい。その発症に関しては未だ不明であるが、近年増加傾向にあり、現代のライフスタイルや生活環境と関連している可能性が考えられる。さらに、ダイオキシンとの関係が報告され始めており、内分泌かく乱化学物質と子宮内膜症の関連を調査することは意義が深く、その解明が発症予防につながり、多くの女性にとって苦しみから解放されることにつながる。

不妊・不育症に関しては、現在わが国では生産率の低下が進行中であり、生産年齢層の減少を来し、高齢化社会におこる諸問題をさらに深刻化させることが危惧される。乏精子症、女性の排卵障害、生殖器の奇

形等は内分泌環境や発生時の母体内での影響が強いとされ、内分泌かく乱化学物質の関与が予想される。生殖年齢にある女性の約1割を占めるといわれる不妊症の予防は生産年齢層の上昇のほか、医療経済的にも莫大なメリットがあり、本疾患の解明、予防は社会的にきわめて大きいと推測される。

B. 研究方法

尿道下裂、停留精巣等の生殖尿路系の先天異常の患者および不妊症の患者を対象に、内分泌かく乱化学物質曝露との関連を明らかにするために、以下の項目の調査研究を行う。

1. 曝露評価、生活習慣、栄養摂取量等に関する質問紙調査（担当：岸、小柳、佐田、野々村、柿崎、村雲、笠井、羽二生）

初年度に、職業、生活習慣、栄養摂取量、疾病の有無、医薬品の服用の有無、種々の曝露の有無等を含めた質問紙調査票を作成する。尿道下裂の患者においては、まず、北大泌尿器科で手術を受けた症例約180名に郵送法にて、次に手術時または術後フォロー時に、対照群においては、生下時、3ヶ月健診および3歳時健診において、親を対象に質問紙調査を実施する。次年度に、停留精巣と精巣がんの患者の親を対象に、同様

に質問紙調査を実施する。これら疾病を引き起こすリスク要因となる化学物質を選定し、測定の前準備を進める。

2. 内分泌かく乱化学物質の選定および測定（担当：岸、佐田、小橋）

初年度に実施した質問紙調査、内分泌かく乱化学物質に関する文献を基に、実際に測定する化学物質を選定し、予備的に血中濃度を測定するなど、実際測定する準備を進める。

尿道下裂等の先天異常の患者と親および対照群とする妊婦は出産時に採血を行い、測定用として血漿を冷凍保存しておく。また、次世代影響についても検討するため、生下時に臍帯血も血漿を保存しておく。最終年度にまとめて測定を行う。

3. 次世代影響に関する実験的研究（担当：岸、佐田、小橋、片倉）

実験的に発達の初期から、成長後までそれぞれの時期に対応した鋭敏な次世代影響の検出手法の開発を行う。内分泌かく乱物質を妊娠ラットに曝露し、生殖毒性の検討とともに、次世代の性分化や神経発達／行動障害の多様性の検討、次世代影響をひき起こすメカニズムを検討する。

4. 尿道下裂等の生殖尿路系の先天異常の症例対照研究（担当：小柳、野々村、柿崎、村雲、福土、岸）

北大病院を受診した尿道下裂等の

先天異常の症例対照研究を行う。尿道形成術を受けた尿道下裂症例 61 例を対象とし、尿道下裂の程度、生下時体重と手術時までの身体的発育、尿路性器合併異常、家族歴、妊娠中の薬剤投与の有無および下垂体-精巣機能に関する内分泌学的検査を検討する。内分泌学的検査は 1~6 歳の 31 例の尿道下裂症例に LH-RH 試験、hCG 負荷試験を行い、尿道下裂を認めない同年代の 18 例の健常男児と比較する。

尿道下裂発生とステロイド代謝酵素異常との関連を調査するために、手術時に尿道下裂症例から採血を行い、 3β -hydroxysteroid dehydrogenase、 17α -hydroxylase、 $17,20$ -lyase の 3 項目につきその酵素代謝活性を検討する。同年代の対照群において同様の検討を行い、尿道下裂発生に関与するステロイド代謝酵素異常を明らかにする。

基礎的研究として、想定される内分泌かく乱物質を妊娠ラットに曝露し、胎児ラットにおけるステロイド代謝酵素異常の発生の有無につき検討する。以上の検討により、内分泌かく乱物質が胎児のステロイド代謝酵素異常を引き起こすことにより尿道下裂発生に関与する可能性を明らかにする。

5. 先天異常の発生動向および不妊・不育症に対する症例対照研究(担当:

藤本、岸、山田、星、和田、奥山、岸田、平山、佐田、小橋、戸崎、貢、片倉)

北大産婦人科で経験した不育症例、不妊・子宮内膜症例に関し、内分泌かく乱物質の代謝に関与する薬物代謝酵素 (CYP1A1, CYP1B1, GSTM1) の遺伝子多型、NK 細胞活性ならびに NK サブセットによる免疫機能および先天性凝固異常症 (Factor V Leiden Mutation および MTHFR C677T Mutation) との関連を調べる。

1976 年以降現在まで、保存および follow-up されている胎児形態異常や原発性無月経症等の家系を対象とし、保存されている羊水および羊水細胞、胎盤絨毛、胎児皮膚等、胎児由来組織を用い、内分泌かく乱化学物質の定量を行い、後方視的に環境要因と遺伝要因の相互作用を検討する。

6. 遺伝子多型および機能の解析(担当: 佐田、戸崎、貢、片倉)

内分泌かく乱化学物質の代謝に関連のあると考えられている CYP1A1、1B1、3A4、GSTM1、Ah 受容体等の薬物・ステロイド代謝酵素、核内受容体の遺伝子多型の解析を行う。尿道下裂等の先天異常の患者と親および不育・不妊症例および対照群とする妊婦は出産時に採取した血液から、DNA 抽出し、PCR-RFLP 法により、遺伝子型をスクリーニングし、一部はシーケンスも行う。機能の不明な変異に関しては、in vitro の

発現系を用い、薬物動態の解析を行う。最終年度に、これらの結果を基に、内分泌かく乱化学物質の、次世代の先天異常の神経内分泌系への影響や生殖毒性を総合的に検討する。

（倫理面への配慮）

疫学調査におけるインフォームドコンセントはヘルシンキ宣言に基づいて行われる予定である。患者または家族が研究への参加を自発的に中止しても不利益を被らないよう配慮する。対象者のプライバシーの保持には細心の注意を払い、対象者が研究に参加することによって不利益を被ることがないように配慮する。実験動物の扱いに関しては、北海道大学の指針に従う。以上のように、本研究は、倫理面および動物愛護上の十分な配慮のうえ行う。

C. 研究結果

1. 曝露評価、生活習慣、栄養摂取量等に関する質問紙調査

北大病院泌尿器科で経過観察中の過去 12 年間に尿道下裂の手術を受けた約 200 症例（道内在住者）のうち、104 名に郵送法により質問紙調査を実施したところ、57 名より回答が得られた（回収率 56%）。今後、尿道下裂の残りの症例と対照群に調査を実施し、停留精巣、その他の先天異常および精巣がんの症例に対しても、質

問紙調査票を作成し、順次調査を実施する予定である（分担研究書参照）。

2. 内分泌かく乱化学物質の選定および測定

1. の調査結果および文献より、測定物質を選定作業中である。現在、ダイオキシン類、ポリ塩化ビフェニール（PCB）、コプラナー PCB、クロルニトルフェン（CNP）、植物性エストロゲン（isoflavonoids, isoflavan, lignans）などについて検討を行っている。

3. 次世代影響に関する実験的研究

スチレンを妊娠 6～20 日のラットに曝露した場合の、新生仔ラットの脳内神経化学物質濃度への影響を明らかにした。セロトニン系では生後直後にセロトニンの減少がみられた。また生後離乳期の 21 日目ではセロトニンの代謝物 5-HIAA の減少と 5-HIAA/5-HT 比の低下がみられた（分担報告書参照）。今後 in vivo 曝露実験を継続し、次世代の神経内分泌系および生殖系への影響を、遺伝子発現レベルを含め詳細に検討する予定である。

4. 尿道下裂等の生殖尿路系の先天異常の症例対照研究

尿道下裂の症例に関して、尿道下裂の程度、生下時体重と手術時までの身体的発育、尿路性器合併症、家族歴、妊娠中の薬剤投与の有無およ

び下垂体—精巣機能に関する内分泌学的検査により、これら要因と疾病との関連を明らかにした（分担報告書参照）。

5. 先天異常の発生動向および不妊・不育症に対する症例対照研究

不育症、不妊・子宮内膜症の症例に関して、薬物代謝酵素・凝固因子などの遺伝子多型、NK 細胞による免疫機能と疾病の関連を明らかにした（分担報告書参照）。また、先天異常の発生動向を把握するため、保存検体の性状、量などをまとめ、今後の研究の準備とした（分担報告書参照）。

6. 遺伝子多型および機能の解析

テストステロンやエストラジオールの代謝に関与する CYP3A4 遺伝子のエクソン7にある 222 番目のセリンがプロリンに代わる変異型遺伝子 CYP3A4*2 の機能を、バキュロウィルスを用いた cDNA 発現系を用いて明らかにした。CYP3A4*2 は、ニフェジピンに対して、野生型に比べると低い固有クリアランスを持つが、テストステロンの 6 β の水酸化反応に対しては、野生型と有意差は認められなかった（分担報告書参照）。今後、尿道下裂、停留精巣など先天異常に関し、親の機能異常を伴う遺伝子型による次世代影響を、不育症、不妊症および子宮内膜症における症例の遺伝子型の関与を検討する予定

である。

D. 考察

現在、内分泌かく乱作用を有すると疑われる化学物質の多くが、鳥類、ハチュウ類等における観察や in vitro の実験に基づいたものであり、ヒトにおける影響は不明である。実験動物において、ある種の化学物質は、エストロゲン作用や抗アンドロゲン作用を有し、精子生成能力、生殖管異常等の雄性生殖器系の異常を引き起こすことが報告されている。ヒトの場合の胎生期の曝露と性腺の分化と形成に及ぼす影響は不明であるが、これまでに尿道下裂、停留精巣等の生殖尿路系の先天異常の患者の疫学調査はこれまでほとんど行われていない。また、不妊の原因は様々であるが、内分泌かく乱化学物質との関連は不明である。

尿道下裂の発生原因は、初産あるいは高齢出産のような母親側の因子、胎生中の変異原への曝露等の環境因子と遺伝的要因の相互作用の結果として発生するのではないかと考えられている。また尿道下裂の発生動向は、1990 年代以降では、米国、デンマーク、ノルウェー等で増加傾向が報告されているが、日本では、欧米諸国に比べると発生率は少ないと言われるものの、精度の高い疫学デー

タはいまだ乏しい。1970年代に妊娠テストや妊娠継続のために使われた合成ホルモン剤（DES）の胎児への曝露が尿道下裂を引き起こし、発生の上昇と関連があるとする報告があった。また、ラットによる動物実験で、胎児期のDES曝露が尿道下裂を引き起こすことが示されている。本研究では、尿道下裂等の先天異常の患者および家族の内分泌かく乱化学物質の曝露状況を詳細に調査すると同時に、内分泌かく乱化学物質の代謝に関連のある遺伝子の多型を解析することで、遺伝要因の評価も併せて行うことが独創的な点である。また、尿道下裂症例におけるLH-RH試験、hCG負荷試験結果より、思春期前の段階から既に何らかの精巣機能障害、特にライディヒ細胞の機能障害が存在することが示唆された。

Rierら（1993）がアカゲザルを用いたダイオキシンを曝露実験により、子宮内膜症を発症させることに成功し、Mayaniら（1997）は子宮内膜症の患者血液中のダイオキシン濃度を調べ、検出率が高かったと報告している。精巣機能に関してMablyら（1992）はラットにダイオキシンを投与することにより精子数が減少することを報告している。また、Heimlerら（1998）はダイオキシンがラットの卵巣内の卵胞数の減少と関連があることを報告している。ヒトを対象にした遺伝子多型との関連

に関する研究としては、Baranovaら（1997, 1999）が、子宮内膜症患者にGSTM1の完全欠損型およびNAT2の代謝遅延型の頻度が高いことを示し、Fritscheら（1998）は、CYP1A1遺伝子の変異が、Dowsingら（1999）は、アンドロゲンレセプター遺伝子のCAG繰り返し部分の長さが、男性不妊のリスクを高めることを示している。いずれも内分泌かく乱化学物質の生殖機能への影響の可能性を指摘している。不育症（習慣性流産）に関しては、ナチュラルキラー（NK）細胞系の免疫異常、凝固系の異常との関連を示唆する報告が多く出されている。本研究では、不育症とグルタチオン転移酵素遺伝子のM1型の機能欠損型との関連、妊娠6-7週における末梢血NK細胞の高活性と染色体正常流産との関連など新しい知見が得られた。

内分泌かく乱作用を有することが疑われている有機溶剤スチレンの妊娠ラットへの曝露実験から、セロトニン系では生後直後の仔ラットにセロトニンの減少がみられた。また生後離乳期の21日目ではセロトニンの代謝物5-HIAAの減少と5-HIAA/5-HT比の低下がみられた。これらより妊娠中の胎仔脳の発達にとって鋭敏な時期における神経障害作用のある化学物質の曝露は仔の生後発達に影響を与える可能性が示唆された。今後、曝露実験を継続し、次世代の神経内分泌系の遺伝子発現

量なども検討する予定である。

E. 結論

内分泌かく乱物質の生殖機能と次世代への影響、特に生殖泌尿器系・先天異常の成因を明らかにするために、尿道下裂、停留精巣等の先天異常、不育症、不妊・子宮内膜症等に関する疫学調査と実験動物を用いた曝露実験を行った。尿道下裂症例では、LH-RH に対し過剰反応を示し、hCG 刺激に対してテストステロンは低反応を示したことから、思春期前の段階から既に何らかの精巣機能障害、特にライディヒ細胞の機能障害が存在することが示唆された。また、不育症では、グルタチオン転移酵素遺伝子の機能欠損型の頻度が高いこと、妊娠 6-7 週における末梢血 NK 細胞の高活性と染色体正常流産とに関連がみられることなど新しい知見が得られた。スチレンの妊娠ラットへの曝露実験から、生後直後の仔にセロトニンの減少がみられ、また生後離乳期の 21 日目ではセロトニンの代謝物 5-HIAA の減少と 5-HIAA/5-HT 比の低下がみられたことより、妊娠中の胎仔脳の発達にとって鋭敏な時期における神経障害作用のある化学物質の曝露は仔の生後発達に影響を与える可能性が示唆された。

今後、population-based の疫学研究、

症例対照研究および動物実験を継続し、内分泌かく乱物質の生殖機能と次世代への影響を詳細に検討する予定である。

F. 研究業績

1. 論文発表

Kishi R, Eguchi T. Effects of low-level occupational exposure to styrene on color vision, dose-relation with a urinary metabolite. *Environ Res*, in press.

Katakura Y, Kishi R, Ikeda T, Miyake H. Effects of prenatal styrene exposure on postnatal development and brain serotonin and catecholamine levels in rats. *Environ Res*, in press.

Kishi R, Tozaki S, Katakura Y, et al. Contrast vision dysfunction among styrene-exposed workers. *Neurotoxicology*, in press.

Katakura Y, Kishi R, Ikeda T, Miyake H. Effects of prenatal exposure to styrene on neurochemical levels in rat brain. *Toxicol Lett* 105:239-249, 1999.

Sata F, Sapone A, Elizondo G, Stocker P, Miller VP, Zheng W, Raunio H, Crespi CL, and Gonzalez FJ: CYP3A4 allelic variants with amino acid substitutions in

exon 7 and 12: evidence for an allelic variant with altered catalytic activity. Clin Pharmacol Ther 67: 48-56, 2000.

Saarikoski ST, Sata F, Husgafvel-Pursiainen K, Rautalahti M, Haukka J, Jarvisalo J, Impivaara O, Vainio H, and Hirvonen A: CYP2D6 ultrarapid metabolizer genotype as a potential modifier of smoking behavior. Pharmacogenetics 10:5-10, 2000.

Hoshi N, Hattori R, Hanatani K, Okuyama K, Yamada H, Kishida T, Yamada T, Sagawa T, Sumiyoshi Y, Fujimoto S: Recent trends in the prevalence of Down syndrome in Japan, 1980-1997. Am J Med Genet. 84:340-345, 1999.

Yamada T, Hoshi N, Okuyama K, Negishi H, Sudo S, Kishida T, Yamada H, Sagawa T, Fujii H, Ishizu A, Ishikura H, Fujimoto S: Morphological aspects of ectopia cordis: four case reports and a review of the literature. J Obstet Gynaecol Res. 25:237-243, 1999.

Kobashi G, Hata A, Shido K, Kato EH, Yamada H, Fujimoto S, Kishi R, Kondo K: Association of a variant of the angiotensinogen gene with pure type of hypertension in pregnancy in the

Japanese: Implication of a racial difference and significance of an age factor. Am J Med Genet. 86:232-236, 1999.

Kobashi G, Yamada H, Asano T, Nagano S, Hata A, Kishi R, Kondo K, Fujimoto S: The factor V Leiden mutation is not a common cause of pregnancy-induced hypertension in Japan. Semin Thromb Hemost. 25:487-489, 1999.

Yamada H, Kato EH, Ebina Y, Moriwaki M, Yamamoto R, Furuta I, Fujimoto S: Fetal treatment of congenital heart block ascribed to anti-SSA antibody: case reports with observation of cardiohemodynamics and review of the literature. Am J Reprod Immunol. 42:226-232, 1999.

Yamada H, Tsutsumi A, Ichikawa K, Kato EH, Koike T, Fujimoto S: IgA class anti- β 2-glycoprotein I in women with unexplained recurrent spontaneous abortion. Arthritis Rheum 42:2727-2728, 1999.

Yamada H, Negishi H, Ebina Y, Kato EH, Kobashi G, Sagawa T, Sakuragi N, Fujimoto S: Prenatal diagnosis and fetal therapy for congenital cytomegalovirus infection: a trial of intraperitoneal

hyperimmunoglobulin injection. Virus Infection Seminar 1:27-34, 1999.

Yamada H, Kato EH, Ebina Y, Kishida T, Hoshi N, Kobashi G, Sakuragi N, Fujimoto S: Factor XII deficiency in women with recurrent miscarriage. Gynecol Obstet Invest 49: 80-83, 2000.

Kishida T, Hoshi N, Hattori R, Negishi H, Yamada H, Okuyama K, Hanatani K, Takagi T, Sagawa T, Fujimoto S: The efficacy of maternal serum screening in the prenatal detection of fetal chromosome abnormalities in Japanese women. Fetal Diagn Ther 15: 112-117, 2000.

小柳知彦：尿道下裂に対する形成術式の開発と確立。日本医師会雑誌 平成 12 年 1 月 1 日号。

星 信彦，半田 康，藤本征一郎：産婦人科領域における性分化異常症の細胞・分子遺伝学的解析。性差医学 5：70-77, 1999.

星 信彦，山田秀人，藤本征一郎：先天形態異常と染色体。産科と婦人科 66：894-900, 1999.

2. 学会発表

Sata F, Sapone A, Elizondo G, Raunio H

and Gonzalez FJ: A CYP3A4 polymorphism involving an amino acid substitution in exon 7. 11th International Conference on Cytochrome P450, Sendai, August 29-September 2, 1999

Yamada H, Kobashi G, Kato EH, Fujimoto S: Recurrent pregnancy loss and thrombophilia. 44th Annual Meeting of Society of Thrombosis and Hemostasis Research, Japanese-German Symposium on Perinatal Hemostasis and Thrombosis, Freiburg, January 16-19, 2000.

Yamada H, Kobashi G, Kato EH, Suzuki S, Fujimoto S: Recurrent pregnancy loss and thrombophilia. Symposium on Perinatal Thrombosis and Hemostasis, Sapporo, March 25, 2000.

笠井世津子、羽二生知美、佐田文宏、岸 玲子、小柳知彦、野々村克也、柿崎秀宏、村雲雅志：尿道下裂のリスク要因に関する疫学研究。第 11 回日本疫学会学術総会発表予定。

G. 知的所有権の取得状況
該当なし