

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
総括研究報告書

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 北海道大学大学院医学研究科教授
(予防医学講座公衆衛生学分野)

研究要旨

北海道における尿道下裂患児の出生状況を 1985 年～1998 年にわたって調査した。この間の有病率は男児出生 1 万人あたり 7.6 人と推定され、この間では増加・減少の傾向は認められなかった。また尿道下裂の重症度別の割合にも年次変動を認めなかった。北海道においては尿道下裂に影響する外的要因の関与を受けにくい環境にあると推定され、この結果を尿道下裂が増加しているとされる他地域と詳細に比較することで、尿道下裂発症に影響する環境因子を明らかにしていくとともに、尿道下裂の成因に関する生物学的な機序そのものを解明していく必要がある。また今後調査していくにあたり、こうした先天疾患に対する登録制度の整備が強く望まれる。

北海道大学附属病院泌尿器科外来にて経過観察中の尿道下裂の症例 136 名に生活習慣や環境曝露に関する調査票を郵送し、98 名から回収した（回収率 72%）。対象者の約半数が重症型の尿道下裂であった。合併奇形としては、停留精巣（18.4%）が最も多かった。一回以上の流産を経験した母親は 15.2%であった。妊娠判明後、母親の飲酒、喫煙の割合は、ともに著明な低下が認められた。職業性曝露としては、父親では有機溶剤 11 例、石油製品 10 例、殺虫剤・除草剤など 5 例、母親では医療・介護職の消毒薬・アルコール・エックス線など 5 例であった。2500g 未満の低出生体重児が 39%を占め、高値を示していた。

同科で経験した尿道下裂 6 症例とその両親（5 家族）について、テストステロン生合成系における異常の有無を調べるため、6 中間代謝産物を測定し、前駆物質と生成物質との比を指標として、テストステロン生合成において重要な 3 つの酵素（3-β-ヒドロキシステロイド脱水酵素、17-β-水酸化酵素、17-, 20-リアーゼ）の活性を推定した。6 症例の尿道下裂の程度は遠位型が 2 例、近位型が 4 例であった。遠位型の症例ではとくに合併症や妊娠中の異常を認めなかったのに対し、近位型では停留精巣の合併を 1 例に認めたほか、兄弟における発生例を含んでおり、この兄弟例ではいずれも妊娠中に切迫早産の既往があった。遠位型 1 例と近位型 3 例（うち 2 例は兄弟）において 3-β-ヒドロキシステロイド脱水酵素（3-HSD）と 17-, 20-リアーゼ活性の単独または両方の低下を認めた。遠位型症例の父親には 3-HSD および 17-, 20-リアーゼ活性の低下が、また近位型兄弟例の母親に 17-β-水酸化酵素と 17-, 18-リアーゼ活性の低下が認められた。まだ少ない症例の検討ではあるが、尿道下裂症例にステロイド代謝異常が高頻度で認められ、また代謝異常が家族性にみられることが示唆された。

北海道大学附属病院産婦人科を受診した不育症および不妊症の症例対照研究により、GSTM1 遺伝子完全欠損型は、不育症・不妊症とともに危険因子となることが示唆された。また、高齢妊娠の適応で妊娠 16 週時に出生前羊水染色体検査を受け、胎児染色体核型が正常であった女性の 10 年間にわたり妊娠 16 週時の BPA 濃度を解析した結果、母体血では減少

傾向が認められた。羊水の BPA 濃度は、母体血中濃度に比較して低レベルであった。したがって、母体血から羊水への BPA の移行ないし蓄積は軽微であると考えられた。

スチレン曝露 in vivo 実験により、ラットのプロラクチンなどが変化し、内分泌かく乱作用のマーカ―として神経内分泌系の測定が有効であることが示唆された。また、スチレンモノマー代謝酵素活性は、成熟ラットでは雌雄による性差がみられ、CYP2C11/6 は成熟雄で活性が高かった。一方、妊娠中はスチレンモノマーの薬物動態が非妊娠時とは異なり、酵素活性が減少していた。

分担研究者

小柳 知彦 北海道大学大学院医学研究
科教授(外科治療学講座腎泌尿器外科学
分野)

藤本征一郎 北海道大学大学院医学研究
科教授(生殖・発達医学講座婦人科学分
野)

研究協力者

佐田 文宏(公衆衛生学分野)

片倉 洋子(同上)

貢 英彦(同上)

笠井世津子(同上)

梅村 朋弘(同上)

倉橋 典絵(同上)

野々村克也(腎泌尿器外科学分野)

柿崎 秀宏(同上)

村雲 雅志(同上)

山田 秀人(婦人科学分野)

三國 雅人(同上)

平山 恵美(同上)

奥山 和彦(生殖・発達医学講座周産期
医学分野)

古田伊都子(同上)

富樫 正樹(市立札幌病院泌尿器科)

関 利盛(同上)

三上 篤(札幌市衛生研究所)

那須 民江(信州大学医学部公衆衛生学
講座)

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、患児の出生前、特に生殖器が分化形成する時期に、内分泌かく乱物質(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。同時に患児とその両親から採血し、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、内分泌かく乱物質の代謝に関係の深い異物代謝・ステロイド代謝酵素等の遺伝子多型を解析し、酵素活性の測定も行う。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。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。

諸外国の報告では、尿道下裂の出生時有病率については0.5~12(対1万男児出生)と大きなばらつきがある。日本においては2つの hospital-based survey があり、最近の出生時有病率は3~12(対1万男児出生)とされている。尿道下裂の成因に関しては不明な点が多くさまざまな説が提唱

A . 研究目的

内分泌かく乱物質の多くは、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

されているが、近年では胎児期の内分泌環境の異常がクローズアップされており、内分泌かく乱物質との関連からも深い関心が持たれている。本年度の研究においてはステロイド代謝経路において重要な中間代謝産物について測定系を確立し、実際に尿道下裂患児およびその両親についてテストステロン生合成系に問題がないかどうか検索を行う。

難治性不育症（習慣流産）においては、約半数はその原因が不明である。近年、免疫学的異常や凝固能異常がその発症機構に関与していることを示唆する研究報告が散見できるが、根本的な原因解明は未だなされていない。難治性不妊症に関して、現在わが国では出生数の低下が進行中であり、出産人口の一層の減少を来し、高齢化社会におこる諸問題をさらに深刻化させるところが危惧される。子宮内膜症は生殖年齢層の女性の妊孕能を障害し、不妊症や少子化にも関与する。有病率も高く、本疾患の成因を解明することは社会的に見ても意義は大きいといえる。近年増加傾向にあり、ダイオキシンとの関連も報告されている。先天異常に関しては、多遺伝子要因ならびに多くの環境要因が複雑に交絡して発症するものと考えられている。これら疾患に対して内分泌かく乱物質の関与の有無を調べることは斬新な手法であり、有用な解析結果が得られる可能性が極めて高いと考えられる。

スチレンモノマーの産業分野での用途の広さ、また日常的にも食品用容器としての使用量の多さにともない、スチレンの取り扱い作業者の数も多い。スチレンは変異原

性や催奇形性についての疑いもあり、ヒトの疫学でも月経障害などへの影響について検討されている。実験動物を用いて、内分泌かく乱作用を有しているのかどうかを血清中のホルモンを測定し、発生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方法の開発を検討する。今までの毒性試験などでは扱われにくい、神経行動学的評価にもつながるような次世代影響を引き起こすメカニズムについても考慮し、生殖毒性の有無をみる上でも必要と思われる雌雄による代謝の差、妊娠中の変化を調べるために体内での代謝酵素についても検討を行う。

B．研究方法

1．先天性外陰奇形（尿道下裂）の発生に関する疫学的研究：北海道における年次別発生率の推移

北海道内の主要な病院において 1983 年から 2000 年までの間に初回手術を受けた尿道下裂症例について、生年月日、手術時年齢、尿道下裂の程度を調べた。各病院から得られたデータを集計して年別の尿道下裂患者数を求め、北海道の男児出生数と比較して有病率を推定した。

2．尿道下裂・停留精巣等の尿路生殖器系先天異常に関する症例対照研究

(1) 対象

北海道大学附属病院および札幌市立病院泌尿器科外来にて経過観察中の症例を対象とした。対照群は、病院対照として北海道大学附属病院小児科入院中の患児とその両親、また地域対照として、札幌市の複数の

区の住民台帳から出生年をマッチさせた対照を選定して行なう。

(2) 質問紙調査法

患児の妊娠・出産の経過、家族歴、両親の産婦人科・泌尿器科疾患を含む既往歴、環境要因・生活習慣に関する質問紙調査票を患児の保護者宛てに郵送する。新規症例については、入院中に調査を行い回収する。

3. 尿道下裂患児とその両親のステロイド代謝に関する研究

北海道大学附属病院泌尿器科で尿道下裂形成術を受けた症例のうち、協力の得られた5組の家族を対象として、血清中のステロイド代謝産物を測定するために、患児から2ml、両親から3mlの静脈血をヘパリン添加採血管に採取して、すみやかに血清を分離し-20℃で冷凍保存した。測定の対象としたのはヒト副腎におけるテストステロン生合成系の6中間代謝産物で、前駆物質と生成物質との比を指標として、テストステロン生合成において重要な3つの酵素(3βヒドロキシステロイド脱水酵素、17β水酸化酵素、17-, 20-リアーゼ)の活性を推定した。中間代謝産物の分析は液体クロマトグラフィー法で行い、高感度セミマイクロカラム対応システムを用いた。

4. 不妊・不育症患者における異物代謝酵素遺伝子多型解析ならびに母体血・羊水中のビスフェノールA濃度の年次推移

北海道大学医学部附属病院産婦人科を受診した子宮内膜症・不妊・不育症の患者血液およびDNAを用いて、異物・ステロイド代謝酵素遺伝子GSTM1、NQO1、CYP1A1、

CYP17の遺伝子多型をPCR-RFLP法を用いて解析を行った。また、1989年から1998年の期間に同科において、高齢妊娠の適応で妊娠16週時に出生前羊水染色体検査を受け、胎児染色体核型が正常であった女性のうち、無作為抽出した200人、胎児染色体核型が異常であった女性71人および2001年から現在までに北海道大学医学部附属病院において妊娠36週から40週までに分娩した女性11人の母体血と羊水中のビスフェノールA(BPA)を測定し、両者の濃度相関ならび年次変化を調べた。

5. 生殖毒性の早期影響マーカーとしての神経内分泌動態と次世代影響に関する実験的研究：内分泌動態の変化とスチレン代謝における性差、週齢差、妊娠による代謝酵素活性の変化

8週齢のWistar系ラットを用い、吸入曝露処置群、皮下投与群および対照群に分け、2週間の曝露後、直ちに採血し、血漿成分を分離して、血漿中のプロラクチン(PRL)、黄体形成ホルモン(LH)、成長ホルモン(GH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)レベルを、酵素結合免疫測定法(ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay)で測定した。また、新生仔(0日、誕生後12時間以内)、離乳直後(誕生後21日目)、成熟ラット(18週目)を用い、肝と肺のミクロソーム分画のミクロソーム蛋白、チトクロームP450量および酵素活性の測定を行った。

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

。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。遺伝子解析研究を含む疫学研究は、原則として北海道大学医学研究科および協力研究機関の倫理委員会に倫理申請書、研究計画書を提出し、審査・承認を経て実施する。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、本研究で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 . 先天性外陰奇形（尿道下裂）の発生に関する疫学的研究：北海道における年次別発生率の推移

北海道における尿道下裂患児の出生状況を 1985 年～1998 年にわたって調査した。この間の有病率は男児出生 1 万人あたり 7.6 人と推定され、この間では増加・減少の傾向は認められなかった。また尿道下裂の重症度別の割合にも年次変動を認めなかった。日本の中でも（少なくとも北海道においては）尿道下裂に影響する外的要因の関与を受けにくい環境にあると推定された。この結果を他地域と比較することで、尿道下裂発症に影響する環境因子を明らかにする必要がある。

2 . 尿道下裂・停留精巣等の尿路生殖器系先天異常の発生要因に関する症例対照研究

北海道大学附属病院泌尿器科外来にて経過観察中の、過去 15 年間に生まれた尿道下

裂の症例を対象に、136 名に調査票を郵送し、98 名から回収した（回収率 72%）。出生年は 1984 年～1998 年で、患児の出生時の父親の年齢は平均 32.1 歳（標準偏差 4.5 歳）、母親の平均年齢は 29.7 歳（標準偏差 4.3 歳）であった。病院診療録に基づく病型分類では、およそ半数が重症型の尿道下裂であった。尿道下裂児が持つ合併奇形としては、停留精巣（18.4%）、そけいヘルニア（3.1%）、口蓋裂（2.0%）、鎖肛（1.0%）などが認められた。また、43.0%が帝王切開による分娩であり、その理由は胎児仮死（尿道下裂児 98 例の 13.3%）、IUGR（8.2%）、胎盤機能不全（3.1%）、妊娠中毒症（3.1%）などであった。患児らの出生時体重は、平均 2405g（標準偏差 840.4g）であった。2500g 未満の低出生体重児が 38.8%を占め、1500g 以下の極小低出生体重児が 9.2%、1000g の超低出生体重児が 7.1%を占めている。一回以上の流産を経験した母親は 15.2%で、中には 4 回もの流産を経験したものが 2 例あった。飲酒率は、妊娠前で父親 76.8%、母親 20.6%である。妊娠判明後は、父親 71.9%、母親 2.2%で、母親の飲酒率に著明な低下が認められた。喫煙率は、妊娠前で父親 86.7%、母親 60.2%である。妊娠判明後は、父親 82.7%、母親 9.2%で、飲酒率同様、母親の喫煙率でも著明な低下が認められた。職場での職業性曝露の内容をみると、父親の職場での有害物質への曝露は 27 例で、有機溶剤への曝露例が 11 例、石油製品への曝露例が 10 例、殺虫剤・除草剤などへの曝露が 5 例認められたが、そのうち農業従事者は 2 例であった。母親の有害物質への職業性曝露は 9 例であり、医療・介護職の消毒薬・

アルコール・エックス線等への曝露が5例、パーマ液、染毛剤など美容師が2例、工場労働者の有機溶剤への曝露が2例であった。農薬への曝露は、農業従事者と家庭菜園において2例認められた。対照群との比較解析は、現在準備中であるが、低出生体重児の占める割合は、1990年代は6-7%であるのに対し、今回の尿道下裂症例においては、2500g未満の低出生体重児が39%を占め、高値を示している。現在、比較する対照症例のデータを収集中である。

3. 尿道下裂患児とその両親のステロイド代謝に関する研究

対象とした尿道下裂6症例の尿道下裂の程度は遠位型が2例、近位型が4例であった。遠位型の症例ではとくに合併症や妊娠中の異常を認めなかったのに対し、近位型では停留精巣の合併を1例に認めたほか、兄弟における発生例を含んでおり、この兄弟例ではいずれも妊娠中に切迫早産の既往があった遠位型1例と近位型3例（うち2例は兄弟）において3βヒドロキシステロイド脱水酵素（3βHSD）と17β-, 20-リアーゼ活性の単独または両方の低下を認めた。遠位型症例の父親には3βHSDおよび17β-, 20-リアーゼ活性の低下が、また近位型兄弟例の母親に17β水酸化酵素と17β-, 18-リアーゼ活性の低下が認められた。

4. 不妊・不育症患者における異物代謝酵素遺伝子多型解析ならびに母体血・羊水中のビスフェノールA濃度の年次推移

1) GSTM1 遺伝子の完全欠損型は、不育症では65%、不妊症では51%の頻度で見られ

たのに対し、対照群では22%に過ぎず、不育症においては、オッズ比5.1（95%信頼区間2.3~11.1）、不妊症では、オッズ比3.7（95%信頼区間1.7~8.2）となり、GSTM1 遺伝子完全欠損型は、不育症、不妊症の危険因子になることが示唆された。NQO1 遺伝子のHinfI多型（P187S）は、不育症ではC/C型44%、C/T型43%、T/T型13%みられ、不妊症ではC/C型52%、C/T型40%、T/T型8%みられた。一方、対照群ではC/C型59%、C/T型32%、T/T型9%みられた。NQO1 遺伝子HinfI多型は、いずれの疾病にも有意な影響を与えなかった。CYP1A1 遺伝子MspI多型（3'側）に関しては、不妊症では野生型のホモ接合の割合が多く、ヘテロ接合の割合が少ない傾向がみられた。

2) 母体血のビスフェノールA（BPA）濃度は、近年、減少傾向が認められた。一方、羊水のBPA濃度は、母体血中濃度に比較して低いレベルであった。妊娠16週では母体血から羊水へのBPAの移行ないし蓄積は軽微であると考えられた。しかしながら、羊水BPA濃度が2ng/ml以上を示した8例（2.80~5.62ng/ml）のうち7例では、羊水BPA濃度が母体血濃度を超えていたことから、症例によっては羊水へのBPAの移行および蓄積が認められ、したがってBPAの胎児に対する影響は無視できないと考えられた。

3) 分娩時母体血、臍帯血および羊水のBPA濃度（ $M \pm SD$ ng/ml）はそれぞれ、 3.58 ± 1.37 、 5.63 ± 2.91 、 4.40 ± 2.36 であった。有意差はなかったが、臍帯血や羊水のBPA濃度は母体血より高値であった。

5. 生殖毒性の早期影響マーカーとしての神経内分泌動態と次世代影響に関する実験的研究：内分泌動態の変化とスチレン代謝における性差、週齢差、妊娠による代謝酵素活性の変化

予備的実験であるが、内分泌かく乱作用が疑われているスチレンモノマーと神経内分泌動態について検討した。吸入曝露ラットでは雌のみ PRL レベル、LH レベルともに増加を示したが、TSH、GH レベルでは差はみられなかった。皮下投与雄ラットでは、スチレンモノマー曝露で LH レベルが増加し、TSH が減少した。一方、皮下投与雌ラットでは、LH レベルと GH レベルが増加した。雌雄ともに PRL での変化はみられなかった。

ミクロソーム蛋白量は、3 週齢(21 日目)では雄のほうが雌より多かったが、チトクローム P450 量に差はみられなかった。一方、成熟ラット(18 週齢)ではミクロソーム蛋白量に雌雄間で差がなく、P450 量は雄で多かった。18 週齢の成熟ラットでは P450 量に性差がみられた。雄では 3 週齢(21 日目)に比べ、ミクロソーム蛋白量、P450 量が増加していた。雌では、ミクロソーム蛋白量は、若齢ラット(新生仔、3 週齢)より増えていたが、P450 量は同じレベルであった。一方、3 週齢の P450 量は、新生仔ラットより多かった。チトクローム P450 量は妊娠後期(妊娠 21 日目)で妊娠前期、妊娠中期(妊娠 10 日目)と比べて減少していた。スチレンの P450 代謝酵素活性は、雄のほうが高く、成熟ラットでは 3 週齢ラットに比べ、倍近い活性がみられた。雌では週齢による差はみられなかった。妊娠後期になると非妊娠

時より低い活性であった。妊娠時期による差は妊娠週齢に伴って漸減傾向がみられた。抗 CYP2C11/6 モノクロナール抗体で処理をした場合、CYP2C11/6 は、成熟ラット(18 週齢)で未熟ラットに比べ、高い活性を示した。また、雌では妊娠後期(妊娠 21 日目)で減少していた。CYP2E1 は 3 週齢では雌雄とも同程度発現しており、雄 3 週齢で 60%、雌 3 週齢で 66%の抑制がみられた。

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依然不明である。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かった。

尿道下裂のような先天性疾患の正確な有病率を知るためには全出生児を対象にした診断・疾患登録が必要であるが、残念ながら本邦にはそのようなシステムが存在しない。北海道の 1970 年代以降の総人口は 560 万人前後でほとんど一定している。各地域の中核病院から、尿道下裂の治療は北海道大学附属病院に集中し、北海道外からの患者も集まっているという特徴がある。本研究による北海道の児の推定有病率は、男児

出生 1 万人あたり 7.6 で、従来の報告のなかではやや低いほうに位置しており、また 1985 年から 1997 年の間で変動がないことが明らかとなった。全世界的に尿道下裂をはじめとする男性生殖器の疾患は増加傾向にあると考えられており、その原因として外因性の内分泌かく乱物質の関与が指摘されている。とくに近位型尿道下裂の発生には胎児期の内分泌環境が強く関わると考えられており、近位型が増加している地域では、内分泌かく乱物質が増加していることを反映していると推定されている。しかし、今回の検討では、こうした流れとは関係なく、尿道下裂の発生率はこの十数年では特に変動を認めなかった。

北海道は周囲を海に囲まれており、食事として摂取する海産物が多い。また広大な土地を利用した農業も盛んで、収穫量の多い大豆をはじめとする豆類や乳製品の摂取も多い。これらの要素は、一見すると内分泌かく乱物質への曝露の機会を多くするように思える。しかしながら、近海に流入する河川地域に大規模な工業地域をもたないこと、魚介類の中でも生物濃縮が顕著な例としてあげられる南方系の回遊魚が少ないこと、冷涼な気候のため農薬の使用量が少ないこと、さらに全体の土地が広く人口密度も低いためにゴミ処理場・焼却炉などの影響が希釈されやすいことなど、現在一般に考えられている内分泌かく乱物質の影響が比較的少ない地域であるかもしれない。したがって、現在尿道下裂が増加している地域と慎重に比較検討することで、外的因子の関与が明らかになっていくと思われる。

最近のニューヨーク州における報告

(Fisch et al., 2001) では、1983 年から 1996 年の間において尿道下裂の有病率は変動していないものの、出産時の母親の年齢が高齢であるほど発症の危険が高いとされている。また母親の摂取する植物性エストロゲンの影響を指摘する報告もある(North et al., 2000)。日本においても結婚・出産年齢は近年明らかに高齢化しているほか、食生活の変化も顕著である。母体の内分泌環境に加え、外因性内分泌かく乱物質の蓄積の問題が懸念される。こうしたデータを今後長期にわたって集積していく必要がある。また今後調査していくにあたり、こうした先天疾患に対する登録制度の整備が強く望まれる。

尿道下裂には陰嚢内容の異常が高頻度に合併することが知られており、本研究で扱った症例においても停留精巣をはじめ、無精巣症や精巣形成不全など明らかなテストステロン分泌障害例が含まれていた。また妊娠中のプロゲステロン投与と尿道下裂との関係は有名であるが、プロゲステロンはステロイド代謝経路において重要な 3 ヒドロキシステロイド脱水素酵素活性を低下させることが知られている。こうしたことから、尿道下裂の成因として胎児の精巣機能やステロイド代謝の異常が深く関与することが指摘されてきた。とくに重度の尿道下裂においては、精巣が正常位置に下降している例でも 5 % 程度の症例でテストステロン生合成異常を伴う場合があることが報告されており (Savage et al., 1978; Campo et al., 1981)、ステロイド代謝における何らかの異常が推定されていた。最近、Aaronson ら (1997) は、尿道下裂の症例のうち約 5

割に、3 ヒドロキシステロイド脱水素酵素、17 水酸化酵素、17、20 リアーゼの3種類の酵素が単独または複合して異常を示したことを報告し、尿道下裂の成因としてのステロイド代謝異常の重要性を具体的に指摘した。

今回の検討では、まだ少数例のみの解析ではあるものの、尿道下裂の患児にステロイド代謝異常が想像以上に多いことがうかがわれ、尿道下裂の成因としての胎児期のテストステロン生合成異常の意義を大きくクローズアップするものである。

従来から尿道下裂の家族発生については日本で6%、欧米で21%とする報告がある(榊原ら, 1985; Bauer et al., 1981)。また尿道下裂患児の次子が尿道下裂である確率は12~17%と報告(Bauer et al., 1981; Stoll et al., 1990)されており、尿道下裂症例のうちには明確な遺伝性のあるものが含まれることが想定されてきた。最近、尿道下裂の孤発例で5 α -リダクターゼ2型遺伝子の変異が報告され(Silver & Russell, 1999) 家族歴のない軽症例でも遺伝要因の関与が示唆された。今後詳細な解析とくに遺伝子多型の解析を進めることで、尿道下裂の病因についての理解が深まり、また早期診断・早期治療への展望が拓けてくるであろう。

精巣下降は機械的因子とホルモン因子の相互作用によって生まれる結果と考えられ、詳細な下降メカニズムは不明であるが、第1相の腹腔内下降 transabdominal phase と第2相の鼠径陰嚢部下降 inguinoscrotal phase の2段階に分かれていると考えられている。第1相は、アンドロゲンの関与は

少なく非アンドロゲンのホルモンや、胎児の精巣から分泌されるミューラー管発育阻止物質(MIS)が腹腔内精巣下降をコントロールしていると考えられ、第2相は、胎児のLeidig細胞から分泌されるアンドロゲン依存性だと考えられている。過去の疫学研究において多く指摘されている、母親の妊娠中の内外からのエストロゲン曝露は、精巣下降第1相において関係するといわれるMISの作用を阻害し、また、胎児のLeidig細胞の前駆細胞を抑制することで第2相に関係するといわれるテストステロンの分泌を阻害し、停留精巣の発生に関連すると考えられる。本研究においては、内分泌かく乱物質に曝露された母親のホルモン動態の影響と停留精巣との関連を調べることを主目的としているが、今後、尿道下裂の場合と同様に、食餌性植物エストロゲンとの関連、ホルモンの変化に影響を与える代謝酵素の遺伝子多型を解明することが必要である。

難治性不育症・不妊症の原因は不明であるが、いずれも多因子性疾患と考えられている。遺伝要因としては、これまでに凝固系因子や代謝酵素などの遺伝子多型が報告されている。不育症とGSTM1遺伝子に関しては、完全欠損型の場合、疾病のリスクを高めるとする報告(Hirvonen et al., 1996)と有意な影響は与えないという報告(Mendola et al., 1998)があり、一致した結果は得られていない。子宮内膜症患者では、GSTM1の完全欠損型およびNAT2の代謝遅延型の頻度が高いという報告がある(Baranova et al., 1997; 1999)。本研究の結果から、日本人の場合には、GSTM1遺伝

子完全欠損型は不育症・不妊症ともに危険因子になることが示唆された。

内分泌かく乱物質のうちビスフェノール A (BPA) に着目し、10 年間にわたり妊娠 16 週時の BPA 濃度を解析した結果、母体血では減少傾向が認められた。羊水の BPA 濃度は、母体血中濃度に比較して低レベルであった。したがって、母体血から羊水への BPA の移行ないし蓄積は軽微であると考えられた。しかしながら、症例によっては羊水への BPA の移行および蓄積が認められ、BPA の胎児に対する影響は無視できないと考えられた。今後、胎児染色体異常、胎児奇形例での BPA 濃度を解析することによって、BPA の胎児に対する影響を明らかにしていきたい。

スチレンモノマー曝露作業者では、プロラクチンレベルが有意に増加したと報告がある (Bergamaschi, 1997; Mutti & Smargiassi, 1998)。我々の動物実験の結果では、予備的検討ではあるが、実際に 100ppm 2 週間曝露でプロラクチンレベルが増加し、過去の疫学的報告を裏付ける結果となった。また、全てのスチレン曝露群において、LH レベルが増加を示した。また、雌雄の差なく、スチレン曝露で LH を増加させるという結果であった。このことはスチレンに内分泌かく乱作用がある可能性を示唆している。つまり、スチレン自体にエストロゲン様作用があるのではなく、エストロゲンを制御する働きのある LH に作用することで内分泌作用に影響を及ぼす可能性も考えられる。今後の課題として、実際の性ホルモンの動態を明確にすることがあげられる。さらに、プロラクチン抑制作用があるといわれるド

ーパミン、GABA といった神経伝達物質についても検討し、スチレンが線条体など脳内の組織学的にどのような変化をおよぼしているかを明らかにすることが必要と思われる。

スチレンモノマーによる生殖・次世代影響のメカニズムを解明するために代謝酵素に対するの影響を検討した。大抵の動物では肝ミクロソーム酵素活性のレベルは発達段階によって異なり未成熟な時期では活性は低い、しかし生後急速に増加し、外来性化学物質に対する代謝も行われる。チトクローム P450 はその isozyme によっては性特異性を持ち、発達に伴って調整されている。スチレンの場合も酵素活性は未成熟ラットで低く、思春期 (青春期) 以降に活性が高くなっていった。今回の実験からこれは雄特異的 CYP2C11/6 の発現によるものとみられる。この性差は CYP2C11/6 の体内分布によると考えられ、この分子種に対する親和性の違いによるものと思われる。またこの分子種は性ホルモンの代謝に関連していることから、性ホルモン動態との関連も考慮に入れる必要があると考えられる。

妊娠にともなう代謝酵素誘導への影響に関しては、チトクローム酵素経路の代謝に変化がみられるが、そのメカニズムについてはよく知られていない。CYP2E1 は性差による影響はあまり受けていなかったが、妊娠後期では発現量が減少し、酵素活性が低下していた。P450 の isozymes 全体が妊娠にともなって減少するといわれているが、妊娠時のスチレンなどの炭化水素の代謝に及ぼす影響を調べるためには、胎仔への影響は、成熟動物とは異なることを考慮する

必要があると思われる。

E . 結論

北海道における尿道下裂患児の出生状況を 1985 年～1998 年にわたって調査した。この間の有病率は男児出生 1 万人あたり 7.6 人と推定され、この間では増加・減少の傾向は認められなかった。今後調査していくにあたり、こうした先天疾患に対する登録制度の整備が強く望まれる。

北海道大学附属病院泌尿器科にて経過観察中の尿道下裂の症例 136 名に生活習慣や環境曝露に関する調査票を郵送し、98 名から回収した（回収率 72%）。対象者の約半数が重症型の尿道下裂であった。合併奇形としては、停留精巣（18.4%）が最も多かった。一回以上の流産を経験した母親は 15.2%であった。妊娠判明後、母親の飲酒、喫煙の割合は、ともに著明な低下が認められた。職業性曝露に関しては、父親では有機溶剤、石油製品、母親では医療・介護職の消毒薬・アルコール・エックス線などが多かった。2500g 未満の低出生体重児は 39%を占め、高値を示していた。今後対照群と比較し、相対危険度を算定する必要がある。

同科で経験した尿道下裂 6 症例とその両親（5 家族）について、テストステロン合成系における異常の有無を調べるため、6 中間代謝物を測定して、その比をとることによって代謝酵素の活性を求めた。6 症例の尿道下裂の程度は遠位型が 2 例、近位型が 4 例であった。遠位型 1 例と近位型 3 例（うち 2 例は兄弟）において 3 ヒドロキシステロイド脱水酵素（3 HSD）と 17-, 20-リアーゼ活性の単独または両方の

低下を認めた。遠位型症例の父親には 3 HSD および 17-, 20-リアーゼ活性の低下が、また近位型兄弟例の母親に 17 水酸化酵素と 17-, 18-リアーゼ活性の低下が認められた。

北海道大学附属病院産婦人科を受診した不育症および不妊症の症例対照研究より、GSTM1 遺伝子完全欠損型は、不育症・不妊症ともに危険因子となることが示唆された。また、高齢妊娠の適応で妊娠 16 週時に出生前羊水染色体検査を受け、胎児染色体核型が正常であった女性の 10 年間にわたり妊娠 16 週時の BPA 濃度を解析した結果、母体血では減少傾向が認められた。羊水の BPA 濃度は、母体血中濃度に比較して低レベルであった。したがって、母体血から羊水への BPA の移行ないし蓄積は軽微であると考えられた。

スチレン曝露 *in vivo* 実験により、ラットのプロラクチンなどが変化し、内分泌かく乱作用のマーカーとして神経内分泌系の測定が有効であることが示唆された。また、スチレンモノマー代謝酵素活性は成熟ラットでは雌雄による性差がみられ、CYP2C11/6 は成熟雄で活性が高かった。一方、妊娠中はスチレンモノマーの薬物動態が非妊娠時とは異なり、酵素活性が減少していた。

F . 研究発表

1 . 論文発表

Kishi R, Eguchi T, Yuasa J, Katakura Y, Arata Y, Harabuchi I, Kawai T, Masuchi A. Effects of Low-Level Occupational Exposure to Styrene on Color Vision: Dose Relation with a Urinary Metabolite.

- Environ Res 85:25-30, 2001.
- Kishi R, Tozaki S, Gong YY. Impairment of neurobehavioral function and color vision loss among workers exposed to low concentration of styrene--a review of literatures. *Ind Health* 38:120-126, 2000.
- 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* 85:41-47, 2000.
- 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.
- Koyanagi T, Nonomura K, Kakizaki H, Murakumo M. One-stage urethroplasty with parametatal foreskin flap (OUPF)-Quest for single-stage repair applicable to all types of hypospadias. *Asian Medical Journal* 43: 517-531, 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.
- Yamada H, Hoshi N, Kato EH, Ebina Y, Kishida T, Sagawa T, Matsuno K, Fujimoto, S. Novel mutation (E113X) of antithrombin III gene (AT3) in a woman with gestational recurrent thrombosis. *Am J Med Genet* 91:348-350, 2000.
- Kobashi G, Yamada H, Asano T, Nagano S, Hata A, Kishi R, Fujimoto S, Kondo K. Absence of association between a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and preeclampsia in Japanese women. *Am J Med Genet* 93:122-125, 2000.
- Yamamoto R, Azuma M, Wakui Y, Kishida T, Yamada H, Okuyama K, Sagawa T, Shimizu K, Satomura S, Fujimoto S. Alpha-fetoprotein microheterogeneity: a potential biochemical marker for Down's syndrome. *Clin Chim Acta* 304:137-141, 2001.
- Yamada H, Kato EH, Kobashi G, Ebina Y, Shimada S, Morikawa M, Yamada T, Sakuragi S, Fujimoto S. Recurrent pregnancy loss: etiology of thrombophilia. *Semin Thromb Hemost*, 2001 (in press).
- Kobashi G, Hata A, Shido K, Yamada H, Kato EH, Kanamori M, Kishi R, Fujimoto S, Kondo K. Multivariate analysis of genetic and acquired factors: T235 variant of angiotensinogen gene as a potent independent risk factor for preeclampsia. *Semin Thromb Hemost*, 2001 (in press).
- Yamada H, Kato EH, Kobashi G, Ebina Y, Shimada S, Sakuragi S, Fujimoto S. High NK cell activity in early pregnancy correlates with subsequent abortion with normal chromosomes in women with recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol*, 2001 (in press).

Tsutsumi A, Atsumi T, Yamada H, Kato EH, Ichikawa K, Fujimoto S, Koike T. Anti-phosphatidylserine/prothombin antibodies are not frequently found in patients with unexplained recurrent miscarriages. *Am J Reprod Immunol*, 2001 (in press).

山田秀人, 平山恵美, 森川 守. ガンマグロ
プリン大量療法. 不育症診療の新展開.
産科と婦人科 68 (6), 2001 (印刷中).

2. 学会発表

Yamada, H., Kato, E.H., Fujimoto, S. Massive immunoglobulin treatment in women with four or more recurrent spontaneous primary abortions of unexplained etiology. 6th International Symposium Japanese-German Society of Obstetrics and Gynecology, Erlangen, June, 2000.

Sata F, Yamada H, Wada S, Kobashi G, Tozaki S, Tanabe H, Hirayama EK, Fujimoto S, Kishi R. Glutathione S-transferase M1 polymorphism and susceptibility to female infertility and recurrent spontaneous abortion. 3rd Asian-Pacific Congress of Epidemiology, Kita-kyushu, September, 2001.

G. 知的所有権の取得状況

なし

参考文献

Aaronson IA, Cakmak MA, Key LL: Defects of the testosterone biosynthetic pathway

in boys with hypospadias. *J Urol* 157, 1884-1888, 1997.

Baranova H, Canis M, Ivaschenko T, Albuissou E, Bothorishvilli R, Baranov V, Malet P, Bruhat MA. Possible involvement of arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1 genes in the development of endometriosis. *Mol Hum Reprod* 5:636-641, 1999.

Baranova H, Bothorishvilli R, Canis M, Albuissou E, Perriot S, Glowaczower E, Bruhat MA, Baranov V, Malet P. Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism and susceptibility to endometriosis in a French population. *Mol Hum Reprod* 3:775-780, 1997.

Bauer SB, Retik AB, Colodny AH: Genetic aspect of hypospadias. *Urol Clin North Am* 8: 559-564, 1981.

Bergamaschi E, Smargiassi A, Mutti A, Cavazzini S, Vettori MV, Alinovi R, Franchini I, Mergler D. Peripheral markers of catecholaminergic dysfunction and symptoms of neurotoxicity among styrene-exposed workers. *Int Arch Occup Environ Health* 69:209-214, 1997

Campo S, Monteagudo C, Nicolau G et al.: Testicular function in prepubertal male pseudohermaphroditism. *Clin Endocr* 14:11, 1981.

Fisch H, Golden RJ, Libersen GL et al.: Maternal age as a risk factor for hypospadias. *J Urol* 165: 934-936, 2001.

Hirvonen A, Taylor JA, Wilcox A, Berkowitz G, Schachter B, Chaparro C, Bell DA.

- Xenobiotic metabolism genes and the risk of recurrent spontaneous abortion. *Epidemiology* 7:206-208, 1996.
- Mendola P, Moysich KB, Freudenheim JL, Shields PG, Schisterman EF, Graham S, Vena JE, Marshall JR, Ambrosone CB. Risk of recurrent spontaneous abortion, cigarette smoking, and genetic polymorphisms in NAT2 and GSTM1. *Epidemiology* 9:666-668, 1998.
- Mutti A, Smargiassi A. Selective vulnerability of dopaminergic systems to industrial chemicals: risk assessment of related neuroendocrine changes. *Toxicol Ind Health* 14:311-323, 1998.
- North K, Golding J, The Alspac Study Team: A maternal vegetarian diet in pregnancy is associated with hypospadias. *BJU Int* 85:107-113, 2000.
- Savage MO, Chaussain JL, Evain D et al.: Endocrine studies in male pseudohermaphroditism in childhood and adolescence. *Clin Endocr*, 8: 219, 1978.
- Silver RI, Russell DW. 5alpha-reductase type 2 mutations are present in some boys with isolated hypospadias. *J Urol* 162:1142-1145, 1999.
- Stoll C, Alembik Y, Roth MP et al.: Genetic and environmental factors in hypospadias. *J Med Genet* 27: 559-563, 1990.
- 榭原尚行、野々村克也、松野正、他：尿道下裂の臨床、内分泌学的検討。日泌尿会誌 76: 716-722, 1985.