

厚生労働科学研究費補助金
食品・化学物質安全総合研究事業

前向きコホート研究による先天異常モニタリング、
特に尿道下裂、停留精巣のリスク要因と
内分泌かく乱物質に対する感受性の解明

平成 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野 岸 玲子

分担研究者

北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野	佐田 文宏
北海道大学大学院医学研究科外科治療学講座腎泌尿器外科学分野	小柳 知彦
北海道大学大学院医学研究科生殖・発達医学講座周産期医学分野	水上 尚典
札幌医科大学産婦人科学講座	工藤 隆一
旭川医科大学産婦人科学講座	石川 睦男
北海道大学大学院獣医学研究科環境獣医学講座毒性学分野	藤田 正一
星薬科大学薬品分析化学講座	中澤 裕之

平成 15 (2003) 年 3 月

目次

I. はじめに	1
II. 総括研究報告書	
前向きコホート研究による先天異常モニタリング、特に尿道下裂、停留精巣のリスク要因と内分泌かく乱物質に対する感受性の解明（岸 玲子ほか）	2
III. 分担研究報告書	
1. 前向きモニタリング研究の概要、研究経過報告（岸 玲子ほか）	19
2. 尿道下裂のリスク要因に関する症例対照研究（岸 玲子ほか）	27
3. 尿道下裂患者のステロイド合成関連酵素 CYP17 遺伝子多型（岸 玲子ほか）	36
4. 母親の異物代謝酵素の遺伝子多型と尿道下裂の発生との関連（岸 玲子ほか）	42
5. 停留精巣の遺伝要因－異物代謝酵素の遺伝子多型（岸 玲子ほか）	46
6. 当科で経験した胎児の形態異常と超音波検査について（工藤 隆一ほか）	50
7. 婦人科疾患（良性卵巢腫瘍）患者におけるダイオキシン類の汚染状況に関する検討（石川 睦男ほか）	53
8. 不育症発症機構に関わる免疫学的異常の解明（水上 尚典ほか）	55
9. 妊娠期における母体側の遺伝的感受性－不育症例における遺伝子多型解析（佐田 文宏ほか）	59
10. cytochrome P450 など異物代謝酵素遺伝子の多形解析と毒性評価（藤田 正一ほか）	65
11. 内分泌かく乱化学物質のヒト暴露評価－新規高感度分析手法の構築－（中澤 裕之ほか）	76

I. はじめに

平成 14 年度より、厚生労働科学研究費補助金 食品・化学物質安全総合研究事業「前向きコホート研究による先天異常モニタリング、特に尿道下裂、停留精巣のリスク要因と内分泌かく乱物質に対する感受性の解明」を開始することができました。

尿道下裂・停留精巣をはじめとする先天異常は、最近増加しているとの報告が発表されていますが、日本では、地域の一定集団で発生率やリスク要因を評価することがいまだなされていません。

本研究の特徴は、わが国においても諸外国でもこれまでほとんど実施されていなかった前向きコホート研究の形で実施されていることです。(従来の多くの研究では対照研究による疫学研究が中心でした)

本研究では、全道各地の産婦人科の皆様方の御協力を得て、妊娠初期にインフォームドコンセントを得た妊婦さんから採血し、まずビスフェノール A・フタル酸エステル類、あるいは植物エストロゲンなど内分泌攪乱物質と栄養(葉酸など)を分析測定し、あわせて(半減期の長い)ダイオキシン類などは、分娩時に臍帯血を分析測定させていただくことにより、アウトカムである出産時点での児への影響(先天異常の有無や、子宮内発達)あるいは、生後のアレルギー等の影響を調べていきます。

これまで内分泌かく乱作用のある物質の次世代への直接的な影響と因果関係は、ほとんど解明されていません。特に、ダイオキシンなど内分泌攪乱物質や喫煙なども含めて異物(薬物)代謝酵素などの遺伝的な多型との関連も明らかにすることもハイリスクに対する予防の意味で予定しております。

本研究は、多くの産婦人科医療機関のご協力が進められていますが、今回の調査により多くの生児人口がカバーされれば、一定の地域集団での発生率の推移や地理的分布もわかります。日本ではまだごく一部の地域を除いて、地域ベースの先天異常モニタリングシステムがありませんが、北海道で、先々今回のように予防医学(公衆衛生学)と臨床医学(産科、泌尿器科、小児科など)が共同で進めるこのような協力体制が続けば、生まれてくる児の早期の医療など、種々の発展が可能になることでしょう。

最後に、本研究報告書が、多くの皆様の御協力によりまとめることができましたことに対して、関係者、協力いただいた皆様に厚く御礼申し上げます。

平成 15 年 3 月

主任研究者 岸 玲子

平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
総括研究報告書

前向きコホート研究による先天異常モニタリング、特に尿道下裂、停留精巣のリスク要因
と内分泌かく乱物質に対する感受性の解明

主任研究者 岸 玲子 北海道大学大学院医学研究科
予防医学講座公衆衛生学分野 教授

研究要旨

本研究は、妊婦を対象にした前向きコホート研究を行い、妊娠中の妊婦への内分泌攪乱物質が、胎児へどのような影響を及ぼすかを解明し、予防に役立てることを目的としている。わが国においても、諸外国でもこれまで全く実施されていなかった前向きコホート研究の形で、妊娠初期の 12 週までに、同意を得た妊婦から採血し、ビスフェノール A・フタル酸エステル類、ダイオキシンなど内分泌攪乱物質の濃度を測定し、アウトカムである出産時点での児への影響（先天異常の有無など）を確認することにより、内分泌攪乱物質と尿道下裂・停留精巣をはじめとする、先天異常との直接的な因果関係を評価することが可能になる。

本研究を進めるのに際し、（1）マーカー奇形の選定と手引き書・新生児個票の作成、（2）妊婦への説明・同意書、医療機関に対する趣意書の作成、（3）調査票の作成、（4）採血スピッツの選定と汚染状況の確認、（5）妊婦からの採血・調査票回収、（6）化学物質の新規高感度分析手法の構築、及び（7）遺伝的感受性解析用 DNA マイクロアレイの開発等を行っている。現在まで、11 病院の協力を得て、初期採血の回収が始まっている。

来年度末までは、少なくとも 50 病院以上の協力を得る予定で、北海道全体で大学病院など大病院のみならず偏りのない 5,000 人～20,000 人の妊婦の参加が得られるよう努力している。本研究では、今後、コホート内症例対照研究の形で、マーカー奇形となる先天異常と妊娠 12 週の器官形成期の内分泌かく乱化学物質曝露などの関連を検討する。曝露評価における分析は、信頼性の高い LC/MS 法を採用して微量分析法で、ビスフェノール A は、生体内代謝の第 II 相反応（抱合反応）において、UDP-グルクロン酸転移酵素により、グルクロン酸抱合分解酵素である β -グルクロニダーゼを利用して、フリー体の総量を算出する。ダイオキシン、PCB については半減期が長いので、出産時の母体血および臍帯血を用いて検討する予定でサンプルの収集を開始している。

継続して実施してきた症例対照研究より、尿道下裂で、出生時低体重でのオッズ比 (OR) は 4.92、95%信頼区間 (CI) は 2.38-10.19、帝王切開による出生では OR 3.28、95%CI 1.70-6.32 であった。患児の CYP17 遺伝子多型、母親の CYP1A1、GSTM1、GSTT1 遺伝子多型と疾患との関連はみられなかった。停留精巣の症例対照研究においても、患児の CYP1A1、GSTM1、GSTT1 遺伝子多型と疾患との関連はみられなかった。また、通常の妊婦の超音波スクリーニングにおいて、胎児の形態異常は認められなかった。

なお、関連研究で子宮内膜症性嚢胞を含む卵巣腫瘍患者の皮下脂肪のダイオキシン類濃度の平均値は 24.92 (pgTEQ/gfat)、現段階で子宮内膜症患者とその他の良性卵巣腫瘍

患者の間で、ダイオキシン類濃度に有意な差は認められなかった。そのほか、不育症(習慣流産)の症例対照研究等を行った。染色体正常流産に至った群では、正常分娩群や染色体異常流産群に比較して、MIF濃度が有意に低値であった。不育症とIL6、CYP17、IL1 β 、CYP1A2遺伝子の多型との関連がみられた。今後、DNAマイクロアレイを用い、先天異常の感受性遺伝子の解析を行う予定である。

分担研究者

佐田 文宏
北海道大学大学院医学研究科
予防医学講座公衆衛生学 講師
小柳 知彦
北海道大学大学院医学研究科
外科治療学講座腎泌尿器外科学 教授
水上 尚典
北海道大学大学院医学研究科
生殖・発達医学講座周産期医学 教授
工藤 隆一
札幌医科大学産婦人科学 教授
石川 睦男
旭川医科大学産婦人科学 教授
藤田 正一
北海道大学大学院獣医学研究科
環境獣医学講座毒性学 教授
中澤 裕之
星薬科大学薬品分析化学 教授

研究協力者

貢 英彦、笠井世津子、倉橋 典絵
西條 泰明、宇津木 恵、玉置 淳子
近藤 朋子、小池 晶、山田 彩子
田中 和美、鳴神 雅史、櫻町 円香
原口 貴史
北海道大学大学院医学研究科
予防医学講座公衆衛生学分野
兼元 敏隆
北海道産婦人科医会 会長
櫻木 範明
北海道大学大学院医学研究科
生殖・発達医学講座婦人科学 教授

野々村 克也

北海道大学大学院医学研究科
外科治療学講座腎泌尿器外科学 助教授
村雲 雅志
北海道大学大学院医学研究科
外科治療学講座腎泌尿器外科学 助手
柿崎 秀宏
北海道大学医学部附属病院
泌尿器科 講師
柴田 隆
北海道大学医学部附属病院
泌尿器科 助手
山田 秀人
北海道大学大学院医学研究科
生殖・発達医学講座周産期医学 助教授
平山 恵美、片山 宙門
北海道大学医学部附属病院産科婦人科
奥山 和彦
北海道大学医学部附属病院
周産母子センター 助教授
長 和俊
北海道大学医学部附属病院
周産母子センター 講師
遠藤 俊明
札幌医科大学産婦人科 助教授
林 卓宏
札幌医科大学産婦人科 助手
藤松 正明、山崎 清大
札幌医科大学産婦人科
山下 剛
旭川医科大学産婦人科 講師
田熊 直之、福家 信二
旭川医科大学産婦人科 助手

芳賀 宏光
旭川赤十字病院 院長
長谷川 天洙、玉手 健一
旭川赤十字病院産婦人科 部長
数坂 昭夫
北海道大学大学院獣医学研究科
環境獣医学講座毒性学 助教授
石塚 真由美
北海道大学大学院獣医学研究科
環境獣医学講座毒性学 助手
吉村 吉博
星薬科大学薬品分析化学 助教授
井之上浩一
星薬科大学薬品分析化学 助手
川口 研
星薬科大学薬品分析化学
多田 実
埼玉県立小児医療センター泌尿器科
辻 克和
社会保険中京病院泌尿器科
黒川 泰史
徳島大学医学部泌尿器科

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質の多くは、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、停留精巣等の先天異常の疫学研究を population-based で行い、リスク要因を検討する。まず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。同時に、前向きコホート研究で、同意を得られた妊婦を対象に、妊娠時の母体血、出産時の母体血、臍帯血を保存し、内分泌かく乱物質（ビスフェノール A、フタル酸エステル、PCB、ダイオキシン類、植物エストロゲン、有機塩素系殺虫剤等）の濃度の直接的な曝露量の測定を行い、内分泌かく乱物質と疾患との直接的な関連を追求

する。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薬物代謝酵素等の遺伝子多型についても検討する。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。

尿道下裂の発生動向は、1990年代以降、米国、デンマーク、ノルウェー等で増加傾向が報告されており、日本でも、最近、日本産婦人科医会でのモニタリングでは、1万出生あたり、1.4(1975)、2.8(1985)、3.5(1998)という結果であり、増加傾向にあると報告されている。しかし、現在行われているモニタリングは、全出生数の1割を把握するに過ぎない上、疾病のリスク要因については研究がなされていないので、今後は一定地域での対象を絞った詳しい疫学研究が不可欠である。平成12年度、申請者らの班研究では、1985～98年の北海道内における尿道下裂の手術例について詳細に調べたが、手術例では、男児出生1万人あたり平均7.6人で、現在のモニタリングよりも高い傾向がみられた。したがって軽症の尿道下裂の一部は、出生時に見逃され、幼児健診で発見されるケースも少なくないことが予想される。一方、停留精巣は、満1歳までは自然下降も期待されるので、出生時のモニタリングから除外されている。尿道下裂、停留精巣など生殖器異常に関しては、産婦人科と泌尿器科との協力により、専門医による一定の基準を設けたモニタリングが、真の発生率を把握し、内分泌かく乱物質との関連を明らかにするために不可欠である。当該年度には、このようなモニタリング体制を確立する。さらに、尿道下裂、その他の先天奇形の発生率については、神奈川県と比較する。不妊症、不育症など女性の生殖障害についても、これまでの研究では疫学的にその原因は解明されていない。特に環境要因と個人の素因の複合作用

については生体試料の曝露評価に基づく病因の解明が重要である。

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。

B. 研究方法

1. 地域ベースの先天異常のモニタリング

現在、日本産婦人科医会の先天異常モニタリングに参加している主要病院 13 病院に加えて、北海道全域の産科施設に参加を呼びかける。

- ①北海道内の全産婦人科を対象に呼びかけ、同意を得られた病院に協力依頼。
- ②出産後 7 日以内に、奇形のあった児の個票に記入依頼。
- ③奇形のあった児に続く 2 例を、コントロールとして個票に記入依頼。
- ④月に一度、総括表として、全分娩数などをまとめる。
- ⑤個票と、総括表は、月に一度、まとめて回収。
- ⑥集計後、発生率の地域差、季節変動などを疫学的に検討。
- ⑦神奈川県先天異常発生率と比較する。

注：1 歳までの自然下降があり得る停留精巣に関しては、出生時での診断後、1 才時まで、泌尿器科での定期的な受診による経過観察を促し、正確な発生率を把握する。

2. 前向きコホート研究による先天異常のリスク要因の解明

同意を得られた妊婦を対象に、器官形成期から、分娩時にいたる小児泌尿器系をはじめとする先天異常の成因に関する疫学研究を実施する。詳細な調査票を用いて、内

分泌かく乱物質との関連を調査し、母体血、臍帯血を保存し、子宮内発育遅延、尿道下裂、停留精巣、その他の先天異常（マーカ一奇形・異常：全 58 疾患）を有する児と、健常児との内分泌かく乱物質の直接的な曝露量を比較し、リスク評価を行う。また、出生以後の健康状態（身体発達・アレルギーなど）の評価も行い、胎児期の内分泌かく乱物質曝露状況と乳児発達の関連も明らかにする。特に、内分泌かく乱物質の代謝酵素に関する遺伝子多型の解析については、内分泌かく乱物質の曝露濃度の測定や、内分泌かく乱物質の代謝に関する遺伝子（CYP1A1, GSTM1 など）を調べ、化学物質に対する感受性を評価し、予防対策に役立てる。

- ①妊娠を継続する妊婦を対象に、妊娠 12 週までに、10ml 採血（定期採血時に追加）。
 - i) 担当医師から妊婦へ説明。
 - ii) 今回の調査（採血の同意と、出産時の採血・臍帯血の採取と、カルテの閲覧・先天異常モニタリング）むねの同意書を取り、連絡先の記載。
- ②妊娠 8 ヶ月時に、母親から 10ml 採血。
- ③出産時に臍帯血採取・採血。
 - i) 臍帯血 32ml（PCB・ダイオキシン用・児の代謝酵素の遺伝子多型解析用・児の特異的 IgE 測定用）
 - ii) 母体血 12ml 採血。（PCB・ダイオキシン用、母の代謝酵素の遺伝子多型解析用）
- ④生後 1 年で、調査票を郵送し、児の健康状態の調査

3. 尿道下裂のリスク要因に関する症例対照研究

- 1) 研究のデザイン
質問票を用いた症例対照研究。
- 2) 対象

症例：北海道大学付属病院泌尿器科外来にて経過観察中の、1984年以降に出生の尿道下裂児。調査票を郵送した症例は202名、回収は161名（回収率80%）である。対照：北海道大学付属病院小児科入院患者他、札幌市内の小児科入院・および外来患者男児とした。回収は136名（回収率66%）である。

3) 診療録からのデータ

診療録からは、停留精巣を含む合併先天奇形、染色体異常所見、その他の周産期の異常の有無と重症度分類の情報が得られている。

4) 質問票の内容

(1) 母親の病歴

- ① 妊娠前・初期の病歴・服薬歴など
- ② 月経開始時期、生理不順など
- ③ 妊娠前の婦人科病歴（子宮内膜症、不妊治療とその治療のためのホルモン製剤使用、避妊薬使用）
- ④ 過去の妊娠、出産の回数・経過、流産の回数、対象児の同胞の病歴、
- ⑤ 対象児妊娠の経過・合併症

(2) 父親の病歴

- ① 不妊治療、尿道下裂の有無
- ② 既往症・服薬歴など。

(3) 環境要因

- ① 職業性曝露（妊娠前・妊娠中に従事した業種と従事した仕事内容、使用した化学物質の種類。特に農業従事・農薬使用は独立の設問で質問。
- ② 飲酒・喫煙（過去の喫煙の有無、妊娠初期、妊娠中の飲酒喫煙の頻度と量）
- ③ 食事内容（大豆製品・魚類などの摂取頻度）
- ④ 家庭菜園・花壇の作業による農薬曝露

5) 患児のCYP17遺伝子多型解析

症例は、北海道大学付属病院泌尿器科外来にて経過観察中の尿道下裂児38例。これら症例は外来診療あるいは入院治療時に、保護者にインフォームドコンセントの上、遺伝子解析のための血液サンプルを採取し

た。対照は、泌尿器科疾患歴のない健康な男性ボランティア98名。

PCR法を用い、血液サンプルより抽出したDNAを鋳型としてPCR-RFLP法により、制限酵素MspIによってCYP17遺伝子のプロモーター領域の変異を検出した。

6) 母親の代謝酵異物素の遺伝子多型解析

北海道大学医学部附属病院泌尿器科で、尿道下裂の手術を受けた児の母親14人を症例群とし、北海道大学医学部附属病院産婦人科で産後健診をうけている、尿道下裂など先天異常をもたない男児を出産したことがある経産婦29人を対照群とした。対象者の末梢血から通常の方法でDNAを抽出し、シトクロムP450のアイソザイムであるCYP1A1、グルタチオン転移酵素のアイソザイムであるGSTM1、GSTT1の遺伝子多型を解析した。CYP1A1はMspI多型をPCR-RFLP法により対象者の遺伝子型を判定し、GSTM1、GSTT1はPCR法により、欠損の有無を判定した。

4. 停留精巣の遺伝要因—異物代謝酵素の遺伝子多型

北海道大学医学部附属病院泌尿器科・社会保険中京病院泌尿器科・徳島大学医学部附属病院泌尿器科で、停留精巣の手術を受けた男児12人を症例群とし、尿道下裂・停留精巣など先天異常をもたない健康男性32人を対照群とした。対象者の末梢血から通常の方法でDNAを抽出し、シトクロムP450のアイソザイムであるCYP1A1、グルタチオン転移酵素のアイソザイムであるGSTM1、GSTT1の遺伝子多型を解析した。CYP1A1はMspI多型をPCR-RFLP法により対象者の遺伝子型を判定し、GSTM1、GSTT1はPCR法により、欠損の有無を判定した。

5. 胎児の形態異常と超音波検査について

1988年3月から札幌医科大学産婦人科において妊婦検診を行った単胎症例のうち、妊娠17週から22週の時期に超音波スクリーニングを希望した妊婦186例、そのうち146例が分娩後当院小児科医により診察を受けており、これらの症例が対象となった。超音波スクリーニングで異常が推測された場合、必ず再度超音波検査を行い異常の有無を再確認することにした。超音波再検で異常を認めなかった場合は、超音波スクリーニング正常群に含めることにした。測定項目は、BPD（児頭大横径）、APTD（胎児腹部前後径）、TTD（胎児腹部横径）、HL（上腕骨長）、FL（大腿骨骨長）、羊水ポケット、後頭蓋窩、後頸部、側脳室 atrium を計測した。また、胎児心および外性器を中心とした詳細な観察も同時に施行した。このスクリーニング検査には通常1人約30分を要した。

また、2001年と2002年に市中病院で胎児奇形を疑い当科に紹介となりそのまま当科での分娩したそれぞれ15、12症例の確定した異常内容を検討した。

6. 婦人科疾患（良性卵巣腫瘍）患者におけるダイオキシン類の汚染状況に関する検討

子宮内膜症性嚢胞を含む卵巣腫瘍患者において、当科で核出手術、あるいは摘出手術を施行した患者から文書で同意を得、術中に創部（下腹部）の皮下脂肪約1グラムの供与を受け、CALUX法にてダイオキシン類濃度を測定した。全てのサンプルは匿名化（ナンバー化）され、個人が特定できないようにデータファイルされた。

7. 不育症発症機構に関わる免疫学的異常の解明

1) 習慣流産15人と正常女性15人における非妊娠時黄体期中期の末梢血中CD3+CD4-CD8-TCRV α 24+V β 11+NKT細胞数、CD4+ (CD8+) 細胞における細胞内IFN- γ 、IL-4、TNF- α 発現をフローサイトメーター法 (FCM) で調べ比較した。

2) 難治性習慣流産に有効である γ グロブリン大量療法 (MIVIg) の薬理作用機構を調べるために、9人のMIVIg前後の末梢血Th1/Th2サイトカイン濃度を高感度ELISA法で測定し、4人のMIVIg前後の末梢血Th1/Th2細胞比率の変化をFCMで測定し比較検討した。

3) 習慣流産78人の妊娠初期(4-6週)において、炎症性サイトカインであり細胞増殖分化に関与するMIF末梢血濃度をELISA法で測定し、その後の妊娠帰結とMIF濃度との関連を調べた。

4) マウス自然流産モデルであるCBA/J x DBA/2の系を用いて、非妊娠時ならびに妊娠時マウス子宮におけるAIF-1の発現をノーザンブロット法、RT-PCR法および免疫組織化学染色によって解析した。また、poly (I:C) (NK細胞活性化剤) によって流産を高率に惹起させてその発現を調べた。

5) 習慣流産マウスモデルにおける γ グロブリン療法の有効性を調べる目的で、CBA/J x DBA/2の系でpoly (I:C) 200 μ gを妊娠day7に腹腔内投与後、day7-9に γ グロブリン0.8g/kg/day腹腔内投与を行い、流産率の変化を調べた。

8. 妊娠期における母体側の遺伝的感受性—不育症例の異物代謝酵素等の遺伝子多型

北海道大学医学部附属病院を受診した不育症の患者および少なくとも1度正常分娩を経験した流産の既往のない性、年齢、居住地を合わせた健常女性を対象とした。対象者の末梢血から通常の方法でDNAを抽

出した。Ah 受容体、シトクロム P450 のアイソザイムである CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP17、グルタチオン転移酵素のアイソザイムである GSTM1、GSTT1、GSTP1、およびサイトカインのインターロイキンの 1 種の IL1 β 、IL6 の遺伝子多型を解析した。PCR-RFLP 法または Real-time PCR 法により、各遺伝子の遺伝子型を判定し、ロジステフィック回帰分析により、オッズ比と 95%信頼区間を求めた。同時に、質問紙調査を実施し、生活習慣、食事、居住地、職業等の環境要因の検討も行った。

9. cytochrome P450 など異物代謝酵素遺伝子の多形解析と毒性評価

1) 薬物代謝酵素の遺伝的多形解析方法の新規開発

薬物代謝酵素に存在する遺伝的多形を簡便に調べる為に、マイクロアレイを用いた方法の開発を試みた。マイクロアレイ法ではサーマルサイクラー以外の特殊な機械を必要とせず、発色によって変異アレルを検出することができ、また、一度に多数の遺伝子について調べることができる。また、PCR 簡略化によって、PCR-RFLP 法よりも簡便に遺伝多形の検出を行うことができる可能性がある。

そこで、P450、GST (グルタチオン抱合酵素) などの薬物代謝酵素から、日本人に多形が多い変異アレルを選定し、マイクロアレイの作成を行う。

2) フタル酸エステルが精巣に及ぼす影響 2-1) DBP による精巣毒性のメカニズム解明

フタル酸ジブチル (DBP: 500mg/kg)、コントロールとしてコーンオイル、そして、PPAR α のリガンドとして clofibrate (30mg/kg)、PPAR β のリガンドとして 2-bromohexadecanoic acid (2BR16C: 10mg/kg) を 7 週齢オスおよびメスラット

(Wistar 系) 4 匹ずつ、計 10 群 (オス、メス 5 群ずつ) に 1 週間、連続経口投与した。1 週間後、精巣において、フタル酸ジブチルおよび PPAR β リガンド 2BR16C 投与群の mRNA 発現プロファイルや発現レベルがどのように変動するか、その作用機構を比較検討する為 cDNA マイクロアレイを用いて調べた。

2-2) DEHP テストステロン代謝に及ぼす影響

Wistar ラットオス 3 週齢にフタル酸エステルであるジエチルヘキシルフタル酸 (DEHP) を 0、100mg、1000mg/kg/day で 5 日間経口投与し、精巣におけるテストステロン代謝活性にどのような影響を及ぼすのかを調べた。テストステロン生合成に関与する 17 β HSD、活性型テストステロン DHT 生合成に関与するステロイド 5 α 還元酵素、また、テストステロンを水酸化し、テストステロンのクリアランスに関与する CYP3A 及び CYP2C11、テストステロンをエストロゲンに変換する CYP19 (アロマターゼ) などについて発現や代謝活性を HPLC-UV やウエスタンブロッティング法、RT-PCR 法を用いて測定した。血中テストステロン濃度は ELISA 法により解析した。

10. 内分泌かく乱化学物質のヒト暴露評価 —新規高感度分析手法の構築—

1) LC/MS 法による分析手法の構築

液体クロマトグラフ/質量分析法 装置 (LC/MS) 【Agilent Technologies 社製 Agilent LC/MSD Superior Line】、HPLC 用ポンプ：島津社製 LC-10ADvp

LC 用カラム：関東化学社製 Mightysil RP-18 GP (L) (150 x 2.0 mm, 5 μ m)

LC 用ガードカラム：関東化学社製 Mightysil RP-18 GP (5 x 2.0 mm, 5 μ m)

前処理用カラム：Waters 社製 OASIS-HLB

extraction column (20 x 2.1 mm, 25 μ m)、GL Sciences 社製 Bioptic AV-2 extraction column (50 x 4.6 mm, 5 μ m)、TOSOH 社製 TSK-PRECOLUMN BSA-ODS/S (4.6 x 10 mm) を用いた。

2) GC/MS 法による分析手法の構築

ガスクロマトグラフ/質量分析装置 (GC/MS) 【Agilent Technologies 社製 Agilent 6890N GC/5973N】加熱脱着システム【Gerstel 社製 TDS2 thermodesorption system/TDS-A autosampler/CIS 4 PTV】を用いた。

3) 定量法

各標準品を化学天秤で 100 ml 用メスフラスコに 100 mg 量り取り、標準原液としてメタノールで 1.0 mg/ml とする。その後、各種濃度にメタノールを加え調製する。又、内標準物質を暫定濃度になるよう精製水で希釈する。

LC/MS-SIM もしくは GC/MS-SIM 法により、標準・試料溶液を測定し、内標準法により、ピーク面積を利用して、各濃度範囲内において、検量線を作成し、定量分析に用いた。

倫理面への配慮

疫学調査は北海道大学大学院医学研究科医の倫理委員会および遺伝子解析審査小委員会および共同研究施設の倫理規定に従って実施し、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」、「疫学研究に関する倫理指針」およびヘルシンキ宣言に基づいて行う。研究への参加は自由意志により、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う。すべての実験・研究は、北海道大学大学院医学研究科及び獣医学研究科で規定されている、ヒト組織及び動物を用いた実験指針に従う。以上のように、本研究は、倫

理面の十分な配慮のうえ行っている。

C. 研究結果

1. 地域ベースの先天異常のモニタリング、前向きコホート研究による先天異常のリスク要因の解明

1) マーカー奇形の選定と手引き書・新生児個票の作成

マーカー奇形（異常）は、特に、内分泌攪乱物質との関連が疑われている尿道下裂を始め、日本ではモニタリングされていない停留精巣の他、比較的頻度の多い（1人以上対1万人出生）外表奇形、消化器奇形、染色体異常、を含めた全58疾患を選んだ。また、診断基準を統一するために、本調査でターゲットとなっている泌尿生殖器の部分の手引き書を作成した。また、児の性、出生時体重、在胎週数、単胎・多胎などの基本的な情報や、出産時・流産時・中絶時の先天異常（形態異常）の有無、診断時期（出生前診断の有無など）の情報を、医師によって記録する新生児個票の作成も行った。

2) 妊婦への説明・同意書、医療機関に対する趣意書の作成

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」、「疫学研究に関する倫理指針」およびヘルシンキ宣言に基づいて行った。

3) 調査票の作成

妊婦の既往歴、出産歴などをはじめ、妊娠中の内分泌かく乱物質曝露が胎児に与える影響を明らかにするため、器官形成期である妊娠初期の飲酒、喫煙、服薬、経口避妊薬の服用の有無、職業性化学物質曝露の有無、栄養補助剤（サプリメント）服用の有無とその時期、また、父親の職業性化学物質曝露・喫

煙、を調査項目とし、調査票の作成を行った。

4) 採血スピッツの選定と汚染状況の確認
生体試料（血液・臍帯血）中の化学物質は、微量であり、器具の汚染によって、微量測定を困難にさせる可能性が考えられる。そこで、LC-MS および SBSE-TDS-GC/MS による高感度測定法を用いて、採血器具からのプラスチック由来化学物質（DEHP、ビスフェノール A）の汚染のないことを確認した。また、血清分離時や保存容器には、ガラス製品を用い、プラスチック製品を使用しないことで、汚染を防いでいる。

5) 妊婦からの採血・調査票回収

協力の得られた産科施設に通院する妊婦を対象に、器官形成期である妊娠初期に、本研究に同意した妊婦からの採血と、調査票を回収した。血液は、血清分離し、測定まで -80°C で冷凍保存を行っている。今後、それらの妊婦の分娩時あるいは流産時には母体血・臍帯血について生体資料を得る予定で各産婦人科とすでに採取準備をすすめている。

6) 化学物質の新規高感度分析法の構築の検討

微量の生体試料（血液）から様々な内分泌かく乱化学物質を一斉分析するため、最新の理化学的手法に加え、改良した前処理を行い、高感度かつ高精度分析手法を構築した。具体的には、測定対象物質の極性及び揮発性の物理化学的性質により下記の2種類の測定法に分け、分析を実施する。

- ・前処理用ミニカラムを装着したオンライン-カラムスイッチング-LC/MS 法・・・主にフェノール性化合物、イソフラボン、可塑剤代の測定

- ・Twister を利用した Stir Bar Sorptive Extraction / TDS-GC/MS 法・・・主に有機揮発性物質、一部フェノール性化合物の測定

- ・ダイオキシン類など半減期の長い内分泌かく乱化学物質については、分娩時の血液・臍帯血を測定にあてる。なお本研究における分析は、最も信頼性の高い LC/MS 法を採用するが、ビスフェノール A は、生体内代謝の第 II 相抱合反応において、UDP-グルクロン酸転移酵素により、ビスフェノール A-グルクロン酸抱合体となることが報告されているので、グルクロン酸抱合分解酵素である β -グルクロニダーゼを利用して、フリー体の総量を算出する予定である。

7) DNA マイクロアレイ準備状況について
薬物代謝酵素に存在する遺伝的多形を簡便に調べる為に、マイクロアレイを用いた方法を開発した。P450、GST（グルタチオン抱合酵素）などの薬物代謝酵素から、日本人に多形が多い変異アレルを選定し、コホートで症例とマッチした対照に対して内分泌かく乱化学物質とその代謝に関する感受性の個体差からリスクの評価を行う。

2. 尿道下裂のリスク要因に関する症例対照研究

1) 質問紙調査

161 例の症例から有効回答があった。conditional multivariate logistic analysis により、妊娠中毒症、切迫流産あるいは流産防止薬の投与、父の過去の喫煙を同一モデルに入れると、妊娠中毒症の OR は、1.88 (0.83-4.27)、切迫流産あるいは流産防止薬の投与は 1.92 (0.90-4.09)、父の過去の喫煙は 1.72 (0.94-3.14) であった。

いずれも有意ではないが、リスク上昇傾向を示す。SGA、切迫流産あるいは流産防止薬の投与、父の過去の喫煙を同一モデルに入れると、SGAのORは、5.13 (2.42-10.88)、切迫流産あるいは流産防止薬の投与は2.37 (1.00-5.64)、父の過去の喫煙は1.62 (0.83-3.14)であった。SGAと切迫流産あるいは流産防止薬の投与は有意にリスクを上昇させる。父に喫煙歴があることもリスクを上昇させる傾向にある。

2) 患児のCYP17遺伝子多型解析

CYP17の遺伝子型を症例38例、対照98例について、同定した。その分布を表3に示す。

A1/A2のA1/A1に対するORは0.62 (95%信頼区間0.27-1.43)、A2/A2のORは0.65

(0.23-1.82)であった。A1/A2+A2/A2、すなわちA2アレルを持つものの、A1/A1、すなわちA2アレルを持たないものに対するORは0.63 (0.29-1.35)、A2/A2、すなわちA1アレルを持たないものの、A1/A1+A1/A2、すなわちA1アレルを持つものに対するORは0.83 (0.32-2.14)であった。

3) 母親の異物代謝酵素の遺伝子多型解析

母親の特性については、母親の出産時年齢・教育歴・喫煙習慣に有意な差はなかった。出生時体重が症例群で有意に少なかった。症例群及び対照群の母親のCYP1A1、GSTT1、GSTM1遺伝子には、多型の頻度に有意な差、オッズ比の上昇は認められなかった。

3. 停留精巣の遺伝要因—異物代謝酵素の遺伝子多型

症例群及び対照群のCYP1A1、GSTT1、GSTM1遺伝子多型におけるどの遺伝子、多型の頻度にも有意な差、オッズ比の上昇は認められなかった。

4. 胎児の形態異常と超音波検査について

1988年3月から当科において妊婦検診を行った単胎症例のうち、妊娠17週から22週の時期に超音波スクリーニングを希望した妊婦186例、そのうち146例が分娩後当院小児科医により診察を受けており、これらの症例が対象となった。超音波スクリーニングで異常が推測された場合、必ず再度超音波検査を行い異常の有無を再確認することにした。超音波再検で異常を認めなかった場合は、超音波スクリーニング正常群に含めることにした。測定項目は、BPD (児頭大横径)、APTD (胎児腹部前後径)、TTD (胎児腹部横径)、HL (上腕骨長)、FL (大腿骨骨長)、羊水ポケット、後頭蓋窩、後頸部、側脳室atriumを計測した。また、胎児心および外性器を中心とした詳細な観察も同時に施行した。このスクリーニング検査には通常1人約30分を要した。

また、2001年と2002年に市中病院で胎児奇形を疑い当科に紹介となりそのまま当科での分娩したそれぞれ15、12症例の確定した異常内容を検討した。

5. 婦人科疾患 (良性卵巣腫瘍) 患者におけるダイオキシン類の汚染状況に関する検討

現在 (平成14年度末) までに21症例を測定しそのダイオキシン類濃度の平均値は24.92 (pgTEQ/gfat)であった。また、現段階で子宮内膜症患者とその他の良性卵巣腫瘍患者の間で、ダイオキシン類濃度に有意な差は認められなかった。

6. 不育症発症機構に関わる免疫学的異常の解明

1) 末梢血中NKT細胞比率には差異を認めなかったが、習慣流産女性では、CD4+IL-4+細胞やCD8+IL-4+細胞比率が正常女性に比較して有意に高値であった。また、習慣流産女性でCD4+IFN- γ +IL-4-/

CD4+IL-4+IFN- γ - (Th1/Th2) 細胞比率、CD8+IFN- γ +IL-4-/ CD8+IL-4+IFN- γ - (Tc1/Tc2) 細胞比率が有意に低値を示した。このことから、習慣流産女性では、非妊娠時に Th2/Tc2 リンパ球優位であることが初めて明らかとなった。

2) MIVIg 後には、有意に末梢血 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10 濃度は上昇し、Th1/Th2 細胞比率が低下することが判明した。

3) 採血 (妊娠 4-6 週) 後に染色体正常流産に至った群では、正常分娩群や染色体異常流産群に比較して、MIF 濃度が有意に低値であることが初めて明らかとなった。

4) 子宮における AIF-1mRNA 発現は estrus で最も発現が強く、その後減少し、着床期に発現が上昇した。正常妊娠の day 5 以降は AIF-1 発現が認められなかったが、poly (I:C) 負荷したマウス子宮では、AIF-1、TNF- α 、NOS2 発現が上昇した。

5) CBA/J x DBA/2 の系では PBS 投与で胎仔吸収率は 21% であり、poly (I:C) 投与によって、胎仔吸収率は 55% に上昇した。しかし、 γ グロブリン投与によって、胎仔吸収率は 8.5% にまで減少した。

7. 妊娠期における母体側の遺伝的感受性 - 不育症例の異物代謝酵素等の遺伝子多型

不育症例および対照となる健常女性の GSTM1、GSTT1、GSTP1、AhR、CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP17、IL1 β および IL6 遺伝子多型における遺伝子型の頻度を求めた。GSTM1 遺伝子欠損型の頻度は不育症例で高く、不育症のリスクを高めることが示唆された (オッズ比 2.2、95% 信頼区間 1.4-3.7)。今回新たに、不育症例では IL6 遺伝子のプロモーター領域の BsrBI 多型で少なくとも 1 本のアリルに変異型を持つ頻度が有意に低いこと (オッズ比 0.5、95% 信頼

区間 0.2-0.9)、CYP17 遺伝子のプロモーター領域の MspAI 多型で少なくとも 1 本のアリルに変異型 (A2) を持つ頻度が有意に高いこと (オッズ比 1.8、95% 信頼区間 1.1-3.2)、IL1 β 遺伝子のプロモーター領域の Aval 多型で少なくとも 1 本のアリルに変異型を持つ頻度が有意に低いこと (オッズ比 0.8、95% 信頼区間 0.3-1.0) から、これらの遺伝子多型と不育症との関連が示唆された。また、CYP1A2 遺伝子 DdeI 多型の変異型ホモ接合の頻度が不育症例で低かったが、統計学的にはボーダーラインであった (オッズ比 0.2、95% 信頼区間 0.0-1.0)。現在、質問紙調査により環境的要因との関連および遺伝子同士との関連を検討している。

8. cytochrome P450 など異物代謝酵素遺伝子の多形解析と毒性評価

1) 薬物代謝酵素の遺伝的多形解析方法の新規開発

P450 は CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2A6、CYP2C19、CYP2D6、その他の薬物代謝酵素や調節因子として、GSTM1、GSTP1、NAT2、AhR、PPAR の 11 遺伝子の 32 アレルをリストアップした。

変異場所の増幅に PCR を用いるため、現在、多数 primer を用いた PCR 法の条件設定を行っている。現在、CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2C19、GSTP1、NAT2、AhR、PPAR に関しては、primer の作成と、PCR・ハイブリ条件の設定が終了している。

2) フタル酸エステルが精巣に及ぼす影響
2-1) DBP による精巣毒性経路の同定

DBP 曝露によって、精巣では、ホスホリパーゼや G 蛋白、hormone receptors、VEGFR1 (vascular endothelial growth factor receptor 1) や TGF β (transforming growth factor beta) 受容体など growth factor 関連分子あるいは oncogene、proto-oncogene、tumor

suppressor、また、カリウムチャネルを始めとする ion channels など、約 110 遺伝子の発現レベルが上昇することが分かった。

DBP 投与によって、肝臓で発現が誘導されることが知られているシトクロム P450 分子種の一つ、CYP4A3、CYP4A8 など CYP4A サブファミリー mRNA は、精巣においても発現レベルが 3.0-3.6 倍に増加していた。COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor) と PPAR は相互的に転写活性化することが報告されているが、今回の結果でも、DBP 投与群では COUP-TFI の発現量が増加していることが明らかとなった。また、今回のマイクロアレイ解析から、DBP 曝露がホスホリパーゼ C isoform である δ 、 γ 、 β のいずれの発現レベルも上昇させることが明らかとなった。また DBP 投与によって、数種のカルシウム結合蛋白の発現量が増加しており、DBP がこの系の活性化に影響する可能性が示唆された。

一方、2BR16C 投与群では約 180 遺伝子の発現レベルが上昇した。DBP と 2BR16C 投与群の両群のラット精巣に発現する mRNA の発現頻度を比較すると、両群において発現量が増加する共通遺伝子は約 20 種であった。

2-2) DEHP が精巣テストステロン代謝に及ぼす影響

DEHP 曝露によって血中テストステロン濃度は減少した。そこで、精巣においてテストステロン生合成に関与する 17β HSD 活性に大きな変化は認められなかった。

テストステロン水酸化酵素である CYP3A 及び CYP2C11 はそれぞれ肝臓において 6β 位水酸化、 16α 位水酸化を行う。今回の結果から、テストステロンの精巣における主要な水酸化代謝物は、肝臓と同様に 6β 位水酸化体および 16α 位水酸化体であるこ

とが分かった。DEHP 投与によって、精巣の CYP3A2 および CYP2C11 は蛋白レベルで発現が上昇し、それに伴ってテストステロン水酸化活性も増加することが明らかとなった。また、CYP3A2 および CYP2C11 依存の活性であることが分かっているジアゼパム 3 位水酸化、N 脱メチル化活性は、それぞれ、CYP3A2、CYP2C11 蛋白発現レベル、および、テストステロン代謝活性レベルに一致していた。

5α 還元酵素はテストステロンをよりアンドロゲン受容体への結合性が強い DHT に変換する。DHT 感受性は精巣よりも前立腺で顕著とされている。また、肝臓においても 5α 還元酵素が発現することが報告されている。今回の結果から、精巣における 5α 還元酵素活性は、DEHP 曝露によって上昇することが明らかとなった。しかし、肝臓における 5α 還元酵素活性は DEHP によって変動を受けなかった。

CYP19 (アロマターゼ) は P450 分子種のひとつで、アンドロゲンをエストロゲンに変換する。CYP19 ノックアウトマウスは性行動に不可欠であり、また、精巣のエストロゲンは精子形成・維持に重要であることが最近の研究で報告されている。今回の結果では、DEHP 曝露は精巣の CYP19 mRNA 発現レベルを減少させることが明らかとなった。

9. 内分泌かく乱化学物質のヒト曝露評価 —新規高感度分析手法の構築—

1) LC/MS 法による分析条件の検討

環境省等における化学物質の環境汚染実態調査において、様々な残留状況を GC/MS 法を用いて測定・把握してきている。GC/MS 法は、多種類の化学物質を同時に高感度の測定ができ、微量の化学物質分析に優れている。しかしながら、GC/MS 法は難揮発性

物質、熱不安定物質等の分析は困難とされ、誘導体化などの煩雑な操作が必要とされてきた。内分泌かく乱化学物質の代表されるフェノール性化学物質やイソフラボン類などもその代表的なものである。そこで、本研究では、そのように GC/MS 法では困難とされる化学物質を LC/MS 法により、迅速・簡便な測定を試みることにした。本年度は、方法論の構築を検討するため、基礎的なデータ取得に着手した。

LC/MS 法における問題点として、各種インターフェイスにおけるイオン化が達成できなければ測定が不可能ということにある。また、内標準法における補正を実施するため、ターゲット化合物の内標準物質の有無について、表 1 にまとめた。いずれもエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) において、イオン化が可能であった。つまり、LC の分離条件が達成できれば、測定できることが伺える。

また、本研究での化学物質暴露モニタリングに関しては、代謝を考慮しながら分析を実施する。具体的には、BPA, NP, OP では、グルクロン酸抱合体の存在を考慮する。また、可塑剤であるフタル酸エステル類のいずれもモノ体みのモニタリングを実施することとする。

少量の生体試料を対象とした場合、オンラインで直接前処理を実施し、ダイレクトに測定できることが望まれる。そこで、本研究において、カラムスイッチング-LC/MS 法を応用することとした。具体的な概略図を図 1 に示す。その一例として、ヒト血液試料 (10 μ l) を用いて DEHP 及び MEHP の分析を試みた。その際のクロマトグラムを図 2 に示す。また、ヒト尿中の NP 及び OP の分析にも応用し、良好な結果を得ることができた。本方法を用いて、難揮発性の内分泌かく乱化学物質の一斉分析を実施する。

2) GC/MS 法による分析条件の検討

GC/MS 法は、従来から環境汚染物質のモニタリング評価に応用され、様々な報告がされている。分離能が高いため、一斉分析が容易であり、高感度検出も可能である。その一方で、環境試料のような多量得られる場合には、固相抽出法や液-液抽出法を利用して、濃縮後分析を行えるが、少量の生体試料では、本操作が困難であり、効率の良い抽出・濃縮法が望まれる。本研究では、液-液分配の理論を応用した Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) 法を利用して、簡単な操作で、高感度、広範囲の化合物を分析することを目指し、基礎的検討を実施した。

具体的な操作過程としては、生体試料溶液 (希釈もしくは直接) 中に Twister を入れ、一定時間攪拌した後、TDS 加熱脱着システム/GC/MSD システムで分析を行う。TDS システムは、バルブレス構造、不活性、高脱着流量 (>50 ml/min 以上) といった特徴をもった加熱脱着装置である。この TDS システムと Twister の特長を活用することによって、特異的な高感度測定を行うことができる。Gerstel 社製 Twister は、100% ポリジメチルシロキサン (PDMS) をコーティングさせた攪拌子 (1.5 cm) である。磁石をガラスでコーティングし、さらにこの表面を不活性化処理した後、厚さ 500 μ m、体積にして約 24 μ l の 100% PDMS をコーティングしてある。これは、SPME での液相量、0.5 μ l と比べると、約 50 倍に相当する。

実試料の測定として、ヒト血液中の NP 及び OP の添加回収実験を実施した。その結果を表 2 に示す。いずれも良好な結果を得ることができた。また、本方法を利用して、採血用具【ベノジェクト II 採血針 S (21G)、ベノジェクト II ホルダー S、ベノジェクト II 真空採血管 (VP-P100)】について、血液検体

保存を行い、汚染状況の確認を実施した。その結果、BHTの汚染が確認された。

D. 考察

今後のコホート研究の展開

現在まで、11病院の協力を得て、妊娠12週での初期採血検体回収が始まっている。15年度末までは、少なくとも50病院以上の協力を得る予定で、北海道全体で大学病院など大病院のみならず偏りのない5,000人~20,000人の妊婦の参加が得られるよう努力している。

20,000人の妊婦が同意し、参加したと仮定して、停留精巣は140人(日本のデータがないので韓国の発生率0.7%で計算)、尿道下裂は7人(日本の尿道下裂発生率3.5人/1万人出生で計算・日本産婦人科医会より)、の発生が予想される。そこで、停留精巣・尿道下裂児と、先天異常を持たない児を、1:2でマッチさせたコホート内症例対照研究を行う。対象児の母親の妊娠初期の血液を用いて、ビスフェノールA・ニルフェノール・DEHP・植物性エストロゲン(ゲニステイン・ダイゼインなど)、およびその代謝物を測定し、また分娩時の血液・臍帯血については、比較的が半減期の長いダイオキシン類を測定することにより、先天異常と器官形成期における内分泌攪乱物質の直接的な曝露評価が可能となり、日本の妊婦の曝露レベルで尿道下裂や停留精巣などの先天異常を起こしうるのか、否か、さらに、それらが個人の感受性素因とどのように関連しているかが、初めて疫学的に解明できる。

なお様々な疫学研究により、女性の妊娠前・妊娠初期の葉酸摂取により神経管欠損症(neural tube defects NTD)に対する予防効果が報告されている。また、最近、Czeizel(1996)らは、NTDのみならず、口蓋

裂・尿道下裂・停留精巣といった疾患においても、葉酸摂取によるオッズ比の低下を報告している。元来、日本では、欧米と比較してNTDの発生率は低く、比較的緑黄色野菜を多く摂取する日本人の食習慣では、葉酸は十分摂取されているとされてきた。しかし、日本と同様に、NTDの発生率が低い中国での介入研究によっても、葉酸摂取による予防効果が報告され、葉酸摂取と先天異常と、何らかの関連があることが予想される。近年、日本産婦人科医会により、日本での二分脊椎の増加傾向が報告されている。このような最近の動向を踏まえて、本研究では、種々の内分泌攪乱物質に加えて、母の血中の葉酸レベルなど先天異常を引き起こす要因を同時に評価し、予防対策に結びつけるようデザインされた研究となる。

葉酸摂取等の環境的要因とともに遺伝素因も先天異常発症に関与すると考えられている。特に、神経管欠損、口蓋裂、口唇裂などの先天異常に関して、葉酸やビタミン摂取と葉酸、メチオニン、ホモシステインの代謝酵素の遺伝子多型との関連が数多く報告されている。Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)には遺伝子多型(677C/T)があり、TアレルはMTHFRの稼働効率が悪いために、ホモシステインの血中濃度が高くなる。とくに葉酸の濃度が低いとさらにこの傾向が強くなり、先天異常の原因になると考えられている。尿道下裂、停留精巣に関しては、ステロイド代謝酵素、受容体など、口蓋裂、口唇裂に関しては、母親の喫煙と関連して異物(薬物)代謝酵素の遺伝子多型も検討されている。本研究では、このような代謝酵素の遺伝子多型等の遺伝的感受性と先天異常との関連を検討し、個体差をも念頭に置き、きめ細かな予防対策を立てることを目指している。

E. 結論

本研究は、妊婦を対象にした前向きコホート研究を行い、妊娠中の妊婦への内分泌攪乱物質が、胎児へどのような影響を及ぼすかを解明し、予防に役立てることを目的としている。本研究を進めるのに際し、

1. マーカー奇形の選定と手引き書・新生児個票の作成
2. 妊婦への説明・同意書、医療機関に対する趣意書の作成
3. 調査票の作成
4. 採血スピッツの選定と汚染状況の確認
5. 妊婦からの採血・調査票回収
6. 化学物質の新規高感度分析法の構築の検討
7. 遺伝的感受性解析用 DNA マイクロアレイの開発等
8. を準備し、来年度末までは、北海道全体で 5,000 人～20,000 人の妊婦の参加が得られるよう目指している。

F. 健康危険情報

DBP の精巣における毒性発現には、PPAR α と同時にその代謝物が異なるパスウェイで影響を及ぼす可能性が考えられた。DEHP 曝露は、肝臓および精巣において、ステロイド代謝酵素に及ぼす影響が異なることが分かった。

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Yamada H, Furuta I, Kato EH, Kataoka S, Usuki Y, Kobashi G, Sata F, Kishi R, and Fujimoto S: Maternal serum and amniotic fluid Bisphenol A concentrations in the early second trimester, *Reprod Toxicol* 16: 735-739, 2002
2. Sata F, Yamada H, Kondo T, Gong Y,

Tozaki S, Kobashi G, Kato EH, Fujimoto S, Kishi R: Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms and the risk of recurrent pregnancy loss. *Mol Hum Reprod*, 9: 165-169, 2003

3. Saijo Y, Sata F, Yamada H, Kondo T, Kato EH, Kataoka S, Furuta I, Minakami H, Kishi R: Single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the interleukin-6 gene and the risk of recurrent pregnancy loss, submitted.
4. Sata F, Yamada H, Yamada A, Kato EH, Kataoka S, Saijo Y, Kondo T, Tamaki J, Minakami H, Kishi R. A polymorphism in the CYP17 gene relates to the risk of recurrent pregnancy loss, submitted.
5. Yamada H, Kato EH, Morikawa M, Shimada S, Saito H, Watari M, Minakami H, Nishihira J: Decreased serum levels of macrophage migration inhibitory factor in spontaneous abortions with normal chromosome karyotype. *Hum Reprod* 18: 616-20, 2003
6. Morikawa M, Yamada H, Okuyama K, Kato EH, Watari M, Kataoka S, Cho K, Minakami H. Prenatal diagnosis and fetal therapy of congenital cystic adenomatoid malformation of the lung: a report of five cases. *Congenital Anomalies*, in press
7. Yamada H, Morikawa M, Furuta I, Kato EH, Shimada S, Iwabuchi K, Minakami H. Intravenous immunoglobulin treatment in women with recurrent abortions: Increased cytokine levels and reduced Th1/Th2 lymphocyte ratio in peripheral blood. *Am J Reprod Immunol*, in press
8. Morikawa M, Yamada H, Kato EH, Shimada S, Sakuragi N, Fujimoto S, Minakami H. Live birth rate varies with

- gestational history and etiology in women experiencing recurrent spontaneous abortion. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, in press
9. Shimada S, Iwabuchi K, Kato EH, Morikawa M, Sakuragi N, Onoe K, Minakami H, Yamada H. No difference in natural-killer-T cell population, but Th2/Tc2 predominance in peripheral blood of recurrent aborters. *Am J Reprod Immunol*, in press
 10. Shimada S, Iwabuchi K, Watano K, Shimizu H, Yamada H, Minakami H, Onoe K. Expression of allograft inflammatory factor-1 in mouse uterus and poly (I:C)-induced fetal resorption. *Am J Reprod Immunol*, in press
 11. Kim HS, Saito K, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Short Period Exposure of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate Regulates Testosterone Metabolism in Testis of Prepubertal Rats. *Arch Toxicol*, in press
 12. Sakamoto QK, Naki K, Aoto T, Yokoyama A., Ushikoshi R, Hirose H, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Cytochrome P450 induction and gonadal status alteration in common carp (*Cyprinus carpio*) associated with the discharge of dioxin contaminated effluent to the Hikiji River, Kanagawa Prefecture, Japan. *Chemosphere*, in press
 13. Sakamoto KQ, Kunisue T, Watanabe M, Masuda Y, Iwata H, Tanabe S, Akahori F, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Accumulation patterns of polychlorinated biphenyl congeners and organochlorine pesticides in Steller's sea eagles and white-tailed sea eagles, threatened species, in Hokkaido, Japan. *Environ Toxicol Chem* 21:842-7, 2002.
 14. Chiba I, Sakakibara A, Iwata TH, Ishizuka M, Tanabe S, Akahori F, Kazusaka A, Fujita S. Hepatic microsomal cytochrome p450s and chlorinated hydrocarbons in largha and ribbon seals from Hokkaido, Japan: differential response of seal species to Ah receptor agonist exposure. *Environ Toxicol Chem* 21:794-806, 2002.
 15. Tilley RE, Kemp GD, Teramitsu I, Hall AJ. Isolation of two cytochrome P450 cDNAs, CYP1A1 and CYP1A2, from harp seal (*Phoca groenlandica*) and grey seal (*Halichoerus grypus*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 132:181-91, 2002
 16. 岸玲子、佐田文宏：内分泌かく乱物質による先天異常と不妊・不育症に関する疫学的研究. *食品衛生研究* 62:44-54, 2002
 17. 森川 守, 山田秀人, 平山恵美, 小林範子, 渡利道子, 片岡宙門, 長 和俊, 奥山和彦, 水上尚典, 藤本征一郎：胎児消化管閉塞 29 例の臨床的特徴. *周産期医学* 32: 825-830, 2002
 18. 山田秀人, 藤本征一郎：性分化異常総論 A. 早期診断と取り扱い, 121 頁-130 頁 (武谷雄二ら編：新女性医学大系 第17巻 性の分化とその異常, 中山書店, 東京) 2002
- 2) 学会発表
1. Sata F, Kondo T, Gong YY, Saijo Y, Sasaki S, Yamagishi H, Tsuge M, Nagase S, Kato EH, Mikuni M, Yamada H, Fujimoto S, Kishi R: Genetic Polymorphisms and human female reproductive toxicity, 14th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, Sapporo, Japan

- (2002.7.22-26)
2. Sata F, Yamada H, Kondo T, Gong YY, Kobashi G, KatoEH, Fujimoto S, Kishi R: Polymorphisms in xenobiotic-metabolizing enzymes and risk of recurrent spontaneous abortion, XVI IEA World Congress of Epidemiology, Montreal, Canada (2002.8.18-22)
 3. 笠井世津子、倉橋典絵、佐田文宏、岸玲子、村雲雅志、柿崎英宏、野々村克也、小柳知彦：「尿道下裂の症例対照研究」、第 11 回日本臨床環境医学会、札幌(2002.7)
 4. 笠井世津子、倉橋典絵、佐田文宏、岸玲子、村雲雅志、柿崎秀宏、野々村克也、小柳知彦：「尿道下裂のリスク要因に関する症例対象研究」、第 13 回日本疫学会、福岡、(2003.1.24-25)
 5. 西條泰明、佐田文宏、山田秀人、近藤朋子、平山恵美、古田伊都子、片岡宙門、水上尚典、岸玲子：「インターロイキン α 6 遺伝子多型と不育症」、第 13 回日本疫学会、福岡、(2003.1.24-25)
 6. 佐田文宏、山田秀人、山田彩子、平山恵美、片岡宙門、西條泰明、近藤朋子、玉置淳子、水上尚典、岸玲子：「CYP17 遺伝子多型と不育症リスク」、第 73 回日本衛生学会、大分 (2003.3.26-29)
 7. 笠井世津子、倉橋典絵、佐田文宏、岸玲子、山田絢子、村雲雅志、柿崎秀宏、野々村克也、小柳知彦：「尿道下裂患者の CYP17 遺伝子多型」、第 73 回日本衛生学会、大分 (2003.3.26-29)
 8. 山田秀人：「クリニカル Update—不育症をどう扱う—：ガンマグロブリン大量療法と NK 細胞」、第 54 回日本産科婦人科学会、生涯研修プログラム (東京、4 月 6-9 日) 2002 年
 9. 山田秀人：不育症—その病態解明と治療へのアプローチ—、第 50 回北日本連合地方部会、特別講演 (富山、9 月 20-21 日) 2002 年
 10. 第 133 回日本獣医学会 (平成 14 年春) ① 妊馬ホルモン・Equilenin による異物代謝酵素の誘導、② マウス海馬におけるビスフェノール A 投与の影響
 11. 北海道薬物作用談話会 雌性ホルモンが Ah レセプター介在性・非介在性 CYP1A サブファミリー発現機構に及ぼす影響
 12. 環境ホルモン学会 第 5 回研究発表会 Short Period Exposure of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate Regulates Testosterone Metabolism in Testis of Prepubertal Rats
 13. 野生動物と交通 ウグイを用いた小樽、石狩、美国港周辺の環境汚染の評価
 14. 14th International symposium on microsomes and drug oxidations, Di-(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP) Regulates levels of P450 and their metabolic activities in rat testis microsomes
 15. 第 135 回日本獣医学会 ①マウス肝における CYP1A2 誘導に伴うウロポルフィリン生成の制御機構—鉄による効果—、②ウグイを用いた小樽、石狩、美国港周辺の環境汚染の評価、③Down-regulations of expressions of PPAR-alpha and AhR target genes by AhR and PPAR-alpha ligands, respectively
- H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし