

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

ダイオキシンなど環境化学物質による次世代影響  
—特に増加する小児疾患発症メカニズムの解明とリスク評価

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生殖・発達医学講座周産期医学分野	水上 尚典
北海道大学大学院医学研究科生殖・発達医学講座小児発達医学分野	田島 敏広
北海道大学遺伝子病制御研究所	西村 孝司
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
札幌医科大学保健医療学部作業療法学科	仙石 泰仁

平成15(2003)年3月

## 目 次

I. はじめに	1
II. 総括研究報告書	2
ダイオキシンなど環境化学物質による次世代影響—特に増加する 小児疾患発症メカニズムの解明とリスク評価 (岸 玲子ほか)	
III. 分担研究報告書	18
1. 内分泌分泌攪乱化学物質の次世代影響に関する前向きコホート研究	18
1) 全体の概要と進捗状況 (岸 玲子ほか)	18
2) 妊婦および新生児甲状腺機能 (岸 玲子ほか)	26
3) 内分泌攪乱物質の次世代への影響 ～小児の神経発達指標について～ (岸 玲子ほか)	30
4) 喫煙曝露と小児発達 (岸 玲子ほか)	36
5) 水銀曝露と小児発達 (岸 玲子ほか)	39
2. ADHD を含む発達障害児の児及び母親の甲状腺マスキングによる 甲状腺機能—後ろ向き研究 (岸 玲子ほか)	41
3. 注意欠陥障害多動症(attention-deficit hyperactivity disorder, ADHD) における甲状腺機能の検討 (田島 敏広)	47
4. ADHD を含む軽度発達障害児の幼児期から学童期の発達 —後ろ向き研究 (仙石 泰仁ほか)	50
5. Th1/Th2 バランスを客観的に評価する方法の確立 (西村 孝司)	55
6. 胎便中ダイオキシン類測定による胎内曝露評価および 新生児異常との関連解析 (水上 尚典ほか)	58
7. P450 をバイオマーカーとした曝露影響評価 (藤田 正一ほか)	62
8. 高分子樹脂由来環境化学物質の微量分析法の構築 —ヒト生体試料採取器具からの汚染実態— (中澤 裕之ほか)	72

## I はじめに

平成13年度に開始した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「ダイオキシンなど環境化学物質による次世代影響－特に増加する小児疾患発症メカニズムの解明とリスク評価」の第2年度の報告書を取りまとめました。

本研究は、「一般人が曝露される程度の低濃度の汚染で、最も鋭敏な次世代の影響を視野にいった」、我が国で初めての疫学研究として実施しております。研究は、長期にわたる前方視的研究であり、妊婦コホートを設定し、胎児期の環境化学物質の曝露評価を行い、特に近年増加が指摘されている小児疾患の発症機序の解明と予防対策の樹立を図ることを目指しております。

環境化学物質による総合的な次世代影響に関する疫学研究で、妊娠中の妊婦に同意をえて、母と児を対象に、前向きコホートの形で、以下にあげる研究内容に関して実施しております。予防医学的な健康障害のリスク評価の対象としては、1)乳幼児の神経発達、2)注意欠陥・多動性障害(ADHD)など小児の神経発達障害／行動異常、3)甲状腺機能低下など内分泌代謝疾患、4)アトピー・喘息などのアレルギー・免疫系の健康影響を設定し、これらが、ダイオキシンや水銀、喫煙など身の周りの曝露とどう関連しているのか？ それらが個人の薬物代謝酵素などの感受性素因によって影響の大きさが違うのではないか？ これらの領域における機能異常、疾患発生に関して環境要因と遺伝要因をも含めた総合的なリスク評価と予防研究を、実施しております。環境化学物質の曝露評価指標測定系の検討や、免疫系の新しい指標の開拓も行いました。

最後に、本研究が、札幌東豊病院の関係各位と参加された多くの妊婦さんのご協力により、ここにまとめることができましたことを記して、皆様に衷心より御礼申し上げます。

主任研究者 岸 玲子

平成15年3月末日

ダイオキシンなど環境化学物質による次世代影響  
—特に増加する小児疾患発症メカニズムの解明とリスク評価

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

地域ベースで妊婦と生まれた児に対し長期の前向きコホートを設定し、ダイオキシン類などの化学物質による次世代影響、特に、小児の神経発達、内分泌代謝疾患関連、およびアレルギー・免疫系の総合的なリスク評価を行うことを目的に、本研究を実施している。札幌市で最も分娩数の多い一般病院の協力を得て、対象を妊娠 23-32 週の妊婦とし前向きコホートの設定し、15 年 2 月末現在 160 名の妊婦の研究協力が得られ、妊婦 94 名、新生児 68 名で、甲状腺機能マスキニング結果の閲覧が可能であった。このうち妊婦 1 名が甲状腺機能障害で加療中であり、抗甲状腺抗体陽性妊婦が 7 名いた。

PCB やダイオキシンなど環境化学物質の一般人の background レベルの汚染による次世代の精神神経発達や行動・認知機能への影響として、まず 6 ヶ月での児の神経発達への影響を検討する。諸外国の先行研究で主に使用されている乳幼児期の発達指標である Bayley Scales of Infant Development (ベイリー乳幼児発達検査) を平成 15 年 3 月より実施している。

質問紙調査から、妊婦 115 名中妊娠判明時に喫煙していた者は 44 名 (38.3%) であり、うち 23 名 (20.0%) は妊娠初期で喫煙を止めたが、残り 21 名 (18.3%) は妊娠後期にも喫煙を継続しており非喫煙群に比べて新生児平均体重が低くなる傾向がみられた。本研究対象者の妊娠判明時の喫煙率から北海道の喫煙率は依然高率であり、さらに、妊娠が判明しても喫煙を止める者は約半数に留まっていることがわかった。また、分娩後採取による母親の毛髪水銀濃度測定および質問票を用いた魚介類摂取状況把握から妊娠中の水銀曝露評価を行っている。

甲状腺機能と注意欠陥・多動 (ADHD) 及び学習障害 (LD) など神経発達障害の関連の関係を明らかにする目的で、注意欠陥・多動 (ADHD) 及び学習障害 (LD) の患者の母の妊婦、及び児の新生児甲状腺マスキニング結果を過去にさかのぼって、35 名の児と 7 名の母親で調査した。このうち新生児甲状腺機能異常を示し、再検対象となった児および甲状腺抗体陽性および甲状腺機能異常のある母親はいなかった。また、46 名の ADHD 患者について同意を得たのち甲状腺機能検査をおこなった。このうち 3 名に TSH の軽度上昇を認め、第 2 次スクリーニング、TRH テストでは正常であった。よって ADHD の症例中の甲状腺機能低下症、GRTH はまれと思われた。

軽度発達障害、特に学習障害 (LD) および注意欠陥多動性障害 (ADHD) をもつ保護者へのアンケート調査から、幼児期に、ADHD 群は触覚機能、排泄や睡眠に関連する問題、LD 群は視覚機能、前庭機能に関連する問題が顕在化してくる傾向が伺われた。

コホート内症例対照研究の形で、アトピー、喘息および化学物質過敏症の患者と対照に関する Th1/Th2 バランスの評価を行い、各種環境因子との関連を検討することを目的とし

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

て、DNA アレイを用いた血液中の T 細胞における Th1/Th2 バランスを客観的に評価する方法の確立した。

新生児 6 人の胎便中の PCDDs+PCDFs, co-PCBs および総ダイオキシン類濃度は、それぞれ 1.4-9.1 (3.7), 0.7-5.7 (3.0), 2.1-14.8 (6.8)pg-TEQ/g-fat であった。また、胎便中総ダイオキシン類濃度と新生児 FT4 値との間に相関を認めた ( $p < 0.05$ )。

胎盤、母体血中の異物代謝酵素 P450 をバイオマーカーとして環境汚染のヒトへの影響、調節因子の遺伝多形と P450 発現レベルとの関係、P450 遺伝多形と活性の関係、これら調節因子や P450 の遺伝多形が生体に及ぼす影響、などについて明らかにするため、今年度は、多形解析の為に新規にマイクロアレイを用いた方法の開発を試みた。

環境化学物質の暴露評価を詳細に検討するため、高分子由来化学物質を対象とした微量分析法の構築を目指し、ビスフェノール A、ノニルフェノール、オクチルフェノール、ペンタクロロフェノールの LC-MS による分析法を確立し、器具類の汚染の有無を調べた。

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

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

田島 敏広

北海道大学医学部附属病院小児科 助手  
西村 孝司

北海道大学遺伝子病制御研究所 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

仙石 泰仁

札幌医科大学保健医療学部  
作業療法学科 講師

研究協力者

玉置 淳子、加藤 静恵、西條 泰明

佐々木成子、鶴野安希子、中島そのみ

近藤 朋子、丸岡 里香、今崎 裕子

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

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

数坂 昭夫、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

吉村 吉博、井之上浩一、川口 研  
星薬科大学薬品分析化学

藤田 晃三、水島 好清、本間かおり  
札幌市立衛生研究所

氏家 武

北海道こども心療内科氏家医院  
長沼睦雄

北海道立札幌肢体不自由児療育センター  
小児神経科

山本 哲三、金上 宣夫、南 邦弘

秋原 実、野村 靖宏、幡 洋

若松 章夫、前田 信彦、黒木 勝円

蛭名 紀子、坂本 壘、土川 陽子

佐々木葉子、武田 邦枝、高橋 倫子

南原由香里、木村 優子

札幌東豊病院

蜂谷 紀之、安武 章

環境省国立水俣病総合研究センター

## A. 研究目的

ダイオキシンやPCB等の生体内での蓄積性は高いことが知られているのに、我が国では、「一般人が曝露される低濃度の汚染で、最も鋭敏な次世代の影響を視野にいれた疫学研究」が大きく立ち遅れている。母乳との関連はこれまでも調べられているが、臍帯血や胎盤などを用いた胎児期の曝露影響評価は行われていない。最も感受性が高い胎内曝露による次世代影響のリスク評価と近年増加が懸念されている小児疾患の発症機序の解明が緊急の重要課題である。

本研究は化学物質による胎児曝露も視野に入れた次世代影響の総合的なリスク評価で、特に、近年、増加が指摘されている小児疾患の発症機序の解明に基づいた予防医学的な健康障害のリスク評価を行う。研究対象は、①注意欠陥・多動性障害(ADHD)など小児の神経発達障害/行動異常、②甲状腺機能低下症など内分泌代謝疾患、③アトピー、喘息などのアレルギー・免疫系の異常とする。

特に環境化学物質の毒性や代謝に関連のある遺伝子の多型を解析し、異物・ステロイド代謝酵素やAhレセプターなどの、個体の感受性を念頭において、環境因子の寄与を明らかにし、予防対策を樹立する。

期待される成果としては、(1) PCB やダイオキシンなど環境化学物質の一般人の低濃度(background)レベルの汚染による次世代の精神神経発達や行動・認知機能への影響、内分泌・免疫学的影響を研究するので、環境化学物質によるもつとも sensitive で重要なエンドポイント、「次世代影響」をリスク評価できる。(2) これまで(有病率の増加が指摘されながら)疫学研究が極めて不十分で発症機序が解明されていない、①「ADHD や学習障害など小児行動障害」、

②「アトピー・喘息や化学物質過敏症など小児アレルギー疾患」の環境ならびに遺伝素因の役割が解明できる。(3) バイオマーカーとして臍帯血と胎盤を用い、広範なP450分子種の mRNA 発現量、蛋白量、酵素活性を測定することにより、PCB、DDT などよく知られている物質以外の「未知の化学物質のヒトへの影響」も総合的に研究できる。(4) 妊婦や児のホルモン微量測定は、「化学物質曝露影響のバイオマーカー」としての有効性が証明されれば、現時点では、札幌、神奈川県でのみ行われているフリーの(サイロキシン) T3, T4 の測定を全国的にも発展活用できることである。

## B. 研究方法

### 1. 1) 内分泌かく乱物質の次世代への影響に関する前向きコホート研究

札幌市において妊婦と小児を対象に長期的な前向きコホート研究を実施する。対象は妊娠 23~32 週の妊婦に調査への参加を呼びかけ、同意をえられた者とし、妊娠 7-16 週で行われた妊婦甲状腺機能検査結果を閲覧する。児の神経行動発達、内分泌機能、およびアレルギー・免疫に関し、出生時、生後 6~7ヶ月、その後、各年毎に追跡する。ベースライン調査として、母の食習慣・喫煙・飲酒・居住環境等を調べる。児の神経発達に関しては、国際的に標準化された認知感覚系の行動テストを用い、神経機能の発達を検討する。妊婦マスキニングではフリーT4、TSH、抗甲状腺マイクロソーム抗体(AMC)、抗甲状腺サイログロブリン抗体(ATG)、新生児甲状腺マスキニングとしては、フリーT4、TSH を検査する。アレルギー・免疫機能への影響を調べるために、母体血、臍帯血のIgEを測定する。また、6ヶ月1歳時に質問紙により食物アレルギーについて検

討する。また、妊娠初期の母の血液、および分娩時に臍帯血と胎盤および母乳を採取保存し、ダイオキシン、PCB など内分泌かく乱物質および鉛など神経発達に関連がある鉛など重金属の測定を行う。母の毛髪を採取し、水銀を測定する。

喫煙に関しては質問紙から喫煙状況を把握し、生下時体重や頭囲など胎児発育や神経発達との関連について、さらに異物代謝酵素などをマイクロアレイ法を用いる遺伝子検査を実施し、個体の感受性素因を検討する。

妊娠中期、産後 1 ヶ月時、6 ヶ月に、妊婦のストレスや鬱スケールに関する質問紙調査を行い、産じゅく鬱と妊婦甲状腺機能との関連について検討する。

神経発達の評価方法に関しては、対面方式により検査を行う直接的な評価と、発達調査票を親に記入してもらう間接的な評価を実施する。

〔直接的評価〕胎児モニタリングによる胎児仮死の有無・アプガールスコアによる新生児仮死、黄疸などの周産期状況および出生直後の身体、神経学的徴候は産婦人科医、助産師、小児科医の記載したカルテを閲覧する。運動・認知・言語発達指標として Bayley scale of Infant Development (BSID)、中枢神経系の成熟に関する問題を抽出する目的で筋緊張、眼球運動、原始反射の統合状態、協調運動、姿勢反射などの評価を含む soft neurological sign test、更に感覚刺激に対する反応性から覚醒状態や注意機能の状況を把握ための sensory test を 6 ヶ月、12 ヶ月、18 ヶ月時に実施する予定である。また、7 ヶ月時には Fagan Test of Infant Intelligence (FTII) を実施し視覚的探索機能から見た知能水準を把握する。また、12 ヶ月以降には学習障害や注意欠陥・多動

性障害に共通した主要な症状である「注意機能」に焦点を当て、社会性の基盤として推定されている共同注意機能を測定するための joint attention test と、注意配分や選択的注意の指標として reaction time および inspection time を測定する予定であり、現在測定機器の開発を行っている。18 ヶ月以降の検査等については確定していないが、24 ヶ月、36 ヶ月時にも一般的な発達指標の通過状況と神経学的徴候を把握するために、継続的に実施している Bayley scale of Infant Development (BSID)、soft neurological sign test、sensory test を実施すると共に、知能レベルの把握をするために田中ビネー知能検査、認知処理機能の測定として日本版ミラー幼児発達スクリーニング検査 (JMAP)、K-ABC 心理・教育アセスメントテストバッテリー (K-ABC)、WPPSI 知能検査のいずれかを実施する予定である。

〔間接的評価〕家庭内での日常的なこどもの状態像を把握する目的と直接的な評価の妥当性を検討するために、1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、12 ヶ月、18 ヶ月に運動・感覚面の発達状況に関してのアンケート調査と、一般的な発達指標を評価する日本版デンバー式発達プレスクリーニング用質問紙 (JPDQ) (1 ヶ月は未実施) を実施する。また、これについても 24 ヶ月、36 ヶ月時にも実施したいと考えている。

これらの検査を縦断的に実施することにより、子どもの運動、感覚、認知面等の発達指標の獲得状況を把握することが可能となる。また本研究では、直接的・間接的と 2 種類の調査方法を実施することにより、直接的な評価では詳細な発達状況を、また間接的な評価では直接的な評価から次の直接的な評価までの間の児の発達状況を把握

する事も可能となる。

内分泌機能に関しては、妊娠初期（8～16 週、平均 10.9 週）に施行した、妊婦甲状腺検査を閲覧する。札幌市では、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、遊離チロキシン (FT4)、抗チログロブリン抗体 (ATG)、マイクロソーム抗体の 4 項目を濾紙法により測定されている。生後 4～7 日目に新生児甲状腺機能マスキングにより、TSH, FT4 を札幌市衛生研究所の協力を得て検討する。

アレルギー・免疫に関する内分泌かく乱物質の暴露評価については、母に対し妊婦時期からの質問票でアレルギー疾患の既往など交絡因子を調査し、児については質問票でアレルギー性疾患の発症を評価する。コホート全体で母乳栄養と人工栄養のアレルギー性疾患発症に差があるか検討する。また、症例対照研究の形で、内分泌かく乱物質の暴露の影響を検討する。

### 1.2) 妊婦および新生児甲状腺機能

札幌市衛生研究所で施行された妊婦及ぶ新生児甲状腺マスキング結果を閲覧に同意の得られ、1 月末までに衛生研究所からの回答が得られた妊婦 96 名について FreeT4、TSH、抗マイクロソーム抗体、抗チログロブリン抗体を新生児名 68 名で FreeT4、TSH 値を調べた。

### 1.3) 内分泌攪乱物質の次世代への影響～小児の神経発達指標について～

本邦で使用されている発達指標に関しては、1983 年から 2002 年までの医学中央雑誌において、乳幼児の発達研究を調べ、おもに使用されている発達検査について調べ、その検査マニュアルや発達検査に関する書籍から内容まとめた。BSID の内容についても、検査マニュアル、発達検査に関する書籍から内容をまとめた。また、BSID を使用

した研究に関しては、MEDLINE を使用し、本邦における報告、内分泌攪乱物質と発達に関連する報告を調べた。さらに、本邦における報告が少ないため、その引用文献から本邦で BSID を用いた研究をしている著者を調べ、更に医学中央雑誌よりその著者名で検索を行い、本邦での報告を調べた。

### 1.4) 喫煙曝露と小児発達

母親の妊娠中の喫煙曝露評価には質問票を用い、分娩時の妊娠週数・所見、および新生児の出生時体重・身長・胸囲・頭囲などの体格や Apgar スコアなど出生時所見については病院記録から情報を得た。さらに、母親の喫煙に関する遺伝子解析のために同意取得時に母親から採血を行なった。妊娠週数と新生児所見を評価項目として喫煙に関する遺伝子多型および質問票から分類した母親の喫煙曝露との関連を検討し、さらに生後 6 ヶ月を初回とする児の神経発達検査を実施していく。

### 1.5) 水銀曝露と小児発達

母親の妊娠中の水銀曝露評価のために分娩後 5 日以内に母親の後頭部毛根から約 20 - 50mg の毛髪を採取して水銀濃度を測定する。さらに、質問票を用いて妊娠中の魚介類摂取状況を把握する。

## 2. ADHD を含む発達障害児及び母親の甲状腺マスキングによる甲状腺機能—後ろ向き研究

[対象] 2002 年 3 月から 10 月に札幌市内の小児精神科 2 箇所及び ADHD、LD 親の会を通じて発達障害児の保護者に対して、妊婦又は新生児甲状腺機能検査を受けた母親と限定して調査研究への参加者を募った。札幌市内の 3 ヶ所の小児神経科に通院また



は通院歴があり、カルテの閲覧が可能で「注意欠陥・多動」を呈する発達障害児で、DMS-IV 又は ICD10 により診断されているものを解析対象とした。

〔方法〕 児のマススクリーニング TSH, free T4 測定値を児 31 名(男 29 名、女 2 名)で、妊婦マススクリーニングの TSH, FT4, 抗マイクロソーム抗体(AMC), 抗サイログロブリン抗体(ATG)測定値は妊婦 8 名で札幌市衛生研究所のデータを閲覧可能だった。

ADHD 症例群(31 例)と、分娩年月日、性、分娩週数(±1 週)をマッチさせた 200 名を対照群として甲状腺マススクリーニング結果の FT4、TSH 値を解析した。

### 3. 注意欠陥障害多動症(attention-deficit hyperactivity disorder, ADHD)における甲状腺機能の検討

ADHD と診断された症例において甲状腺ホルモン(T4, T3, free T4, free T3)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)を測定し、甲状腺機能との関連について検討した。T4, T3 は RIA 法(ガンマコート Total T4, T3, シェーリング社製)、free T4, free T3 も同じく RIA 法(アマレックス free T4, T3 測定キット、TFB 社製)を用いて測定した。また TSH はスパック TSH キット(TFB 社製)を用いて RIA 法で測定した。これらのなかで、甲状腺ホルモンの低値または TSH の軽度上昇が認められ、潜在的な甲状腺機能低下が疑われる症例については Thyrotropin-releasing hormone (TRH) 試験を行い、TSH を測定した。

### 4. ADHD を含む軽度発達障害児の乳幼児期から学齢期の発達—後ろ向き研究—

LD および ADHD の親の会 3 団体の会員、5 医療施設で診療を受けている LD お

よび ADHD 児の両親に調査協力を依頼し、同意を得られた者を調査対象としアンケート調査を行った。

アンケート調査は一般情報として記入者、家族構成、こどもの性別・年齢・通学先の 5 項目、現在像として診断名、各種検査結果、言葉の理解力に関する 6 項目、話し言葉に関する 8 項目、文字に関する 11 項目、計算に関する 11 項目、生活に関する 4 項目、運動に関する 7 項目、行動に関する 11 項目、社会性に関する 8 項目、更に服薬状況の 69 項目を設定した。こどもの発育状況に関しては周産期の状況、出生後 1 年間の健康状態および神経学的徴候、運動発達に関する 36 項目の質問項目を設けた。また、1 歳から 6 歳までの発達状況を運動発達に関して 12 項目、前庭感覚系に関連した発達 11 項目、触覚に関する 15 項目、視覚系に関する 8 項目、聴覚・言語に関する 7 項目、嗅覚、味覚、排泄、睡眠に関する 7 項目、その他 3 項目の 63 項目を設定した。以上の調査から、① ADHD あるいは LD と診断を受けている児の周産期リスクおよび発達状況の違いについては、定頸、一人歩き、2 語文などを含む 1 歳までの発達状況 7 項目 ② 運動発達(12 項目)、前庭機能(11 項目)、触覚機能(15 項目)、視覚機能(8 項目)、聴覚・言語機能(7 項目)、嗅覚・味覚・排泄・睡眠(7 項目)、その他(3 項目)の 6 カテゴリ計 63 項目からなる 1~6 歳までの発達状況について比較した。1 才から 6 才までの発達状況に関してはフィッシャーの直接確率計算を用いて統計処理を行った。また、② ADHD あるいは LD と診断を受けている児の現在の生活・学習上の問題、合併疾患についても分析を行った。

## 5. Th1/Th2 バランスを客観的に評価する 方法の確立

まず Th1、Th2 細胞に特異的な遺伝子の発現を DNA アレイを用いて網羅的に解析することにより、生体内の Th1/Th2 バランスを判定することが可能かどうかを確認するために、マウスの系を用いて Th1/Th2 バランス判定用の DNA アレイフィルターの開発を試みた。

Th1、Th2 細胞に特異的な遺伝子の cDNA 断片をクローン化し、PCR で遺伝子断片を増幅してナイロンメンブラン上にスポットすることにより、Th1 あるいは Th2 細胞に特異的な遺伝子を載せた DNA アレイを製作した。

## 6. 胎便中ダイオキシン類測定による胎内 曝露評価および新生児異常との関連解析

母親から文書で同意を取得し、分娩時臍帯血（n=4）および哺乳前の新生児期胎便（n=6）を採取保存した。ガスクロマトグラフィー法により検体中の PCDDs + PCDFs, co-PCBs の濃度測定を実施した。測定結果を脂肪重量換算し、WHO-TEF（1998）による毒性等量（pg-TEQ/g-fat）として表した。妊娠初期母体血と新生児血液の TSH, FT4 は濾紙血を用いて測定した。

## 7. P450 をバイオマーカーとした曝露影響 評価

1) P450 をバイオマーカーとした曝露影響評価

ヒト血液及び胎盤、臍帯血を採集し、P450 について mRNA 発現量を測定する。特に、ダイオキシン類などの蓄積残留濃度と P450 発現レベルとの関係について明らかにする。

2) 環境汚染物質複数下での P450 発現へ

の影響

PPAR  $\alpha$  リガンドとしてクロフィブレート、AhR リガンドとして SudanIII を用いた。雄性 Wistar ラット 9 週齢を、クロフィブレート（300mg/kg/day）単独投与群、SudanIII（80mg/kg/day）単独投与群、クロフィブレート+SudanIII 同時投与群、に分け、4 日間経口投与した。対象群として、コーンオイルを経口投与した。

5 日目に肝臓を採取し、ミクロソーム画分を調整した。得られた肝ミクロソームについて、CYP1A1、CYP1A2、CYP4A、CYP2B のアポ蛋白発現変動をウェスタンブロッティングによって調べた。また、蛍光光度計を用いて、CYP1A1、CYP1A2 依存の代謝活性について明らかにした。また、肝臓より RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて、各受容体リガンド同時投与が受容体発現や標的遺伝子 mRNA の発現にどのような影響を与えるのかについて調べた。

3) 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異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。

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、日本人に多い多型の変異アレルを選定した。

## 8. 高分子樹脂由来環境化学物質の微量分 析法の構築—ヒト生体試料採取器具からの 汚染実態—

採血セット：テルモ翼状針（SV-22CLK C  
タイプ 22G）、ベノジェクト II ルアーアダプ

タ S, ニプロネオチューブ(HE-1000)におけるビスフェノール A, ノニルフェノール, オクチルフェノール, ペンタクロロフェノールを、液体クロマトグラフ/質量分析計装置(LC/MS)を用いて測定した。

### 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。親の了解を得てから小児の詳細な問診と理学所見の検討を行う。神経発達・免疫学的ならびに内分泌学的検査に関しては、すべて事前にインフォームドコンセントを得て行う。すべての実験・研究は、北海道大学医学研究科及び北海道大学大学院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

### 1.1) 内分泌かく乱物質の次世代への影響に関する前向きコホート研究（進捗状況）

札幌市内で最も分娩数が多い一般病院の協力を得て、妊娠週数 23-32 週の妊婦を対象に前向きコホート研究を開始し、妊婦コホート集団の設定を行い、平成 15 年 2 月末現在 524 名の妊婦に参加を呼びかけ、163 名の同意者を得て(参加同意率 31%)妊婦の採血を施行した。このうち 4 名が途中脱落

となっている。

調査協力病院の分娩数に対する研究協力産婦の割合は 14 年 9 月の 8%から 15 年 2 月末では 23%と漸次増加し、15 年 2 月末までの分娩者は 111 名である。

妊婦甲状腺マスキング結果は 15 年 2 月末現在妊婦 160 名について閲覧を依頼し、1 月中旬にまでに 94 名、新生児 68 名につき結果の回答が得られた。甲状腺自己抗体が陽性で甲状腺機能が正常な潜在性自己免疫性甲状腺症候群の妊婦は 8.3%みられ、Haddow らの報告 8.7%と同程度であった。

14 年 12 月末までに出生した新生児甲状腺マスキングの精密検査対象者は 1 名、再検予定者が 1 名いた。

母体血、および臍帯血 IgE は今後逐次測定し、調査票での、両親のアレルギー疾患歴との関連について検討を加える。今後 6 カ月、1 歳時の食物アレルギーなどについての質問紙への回答を依頼する。

15 年 3 月から 6 ヶ月児を対象に発達検査を開始した。

妊婦の産後 1 ヶ月時の鬱スケールは質問紙を郵送し、回収し検討を加えている。

### 1.2) 妊婦および新生児甲状腺機能

#### 1) 妊婦甲状腺マスキング結果

調査に協力同意が得られて、妊婦マスキング結果の閲覧可能であった妊婦は 96 名で、1 名が甲状腺疾患治療中で、マスキングの対象外となっていた。TSH は 0.5~4.4  $\mu\text{g/ml}$  (平均値 1.43)、FT4 値は 0.69~2.05  $\text{ng/dl}$  (平均値 1.1)であった。96 名中、抗甲状腺抗体陽性者が 8 名 (8.3%)、抗マイクロソーム抗体単独陽性 4 名、抗サイログロブリン抗体単独陽性 1 名、両抗体とも陽性者 3 名がいた。

#### 2) 新生児甲状腺マスキング結果

12 月末までに出生した 68 名の児の TSH は 0.5 以下～18.0  $\mu$ U/ml (平均値 3.7) FT4 1.37～3.03ng/dl (平均値 2.11) であった。

### 1.3) 内分泌攪乱物質の次世代への影響～ 小児の神経発達指標について～

本研究で使用するベイリースケール乳幼児発達検査 (BSID) は乳幼児を対象とする直接的検査の一つで 1969 年に Bayley, N. によって開発された。1993 年に、対象年齢の拡大、検査項目及び項目数、実施方法等の検討がなされ BSID-II として改訂版が発表された。BSID-II は、1 ヶ月～42 ヶ月児を対象とし、①心理尺度 (Mental Scale、以下 Mental とする)、②運動尺度 (Motor Scale、以下 Motor とする)、③乳幼児行動記録 (Behavior Rating Scale、以下 BRS とする) の 3 つのスケールで構成されている。諸外国では BSID を用いた研究報告が数多くなされている。その内容は主に、低出生体重児の発達特性、化学物質暴露の児への影響について、様々な疾患を持つ児の発達特性、母子関係と発達との関連等についてである。本邦においては、加藤らによる「新生児期から 9 歳までの健常児の発達縦断研究」において、6 ヶ月、12 ヶ月、24 ヶ月時に BSID を実施している。大城らは「低出生体重児に対する発達状況調査および早期介入の発達効果」について報告している。以上のように本邦では BSID を用いている研究は数少ない。これは、本邦では翻訳されて販売されおらず、標準化もなされていないためと思われる。

### 1.4) 喫煙曝露と小児発達

妊婦 115 名中 (平均年齢 29.8 歳, SD 4.7) 妊娠判明時に喫煙していた者は 44 名 (38.3%) であり、うち 23 名 (20.0%) は妊

娠初期 (15 週まで) で喫煙を止めたが、残り 21 名 (18.3%) は妊娠後期 (28 週以降) にも喫煙を継続していた。そこで、妊娠判明時に喫煙していなかった者を「非喫煙群 (71 名)」、妊娠後期においても喫煙を継続していた者を「喫煙群 (21 名)」と分類した。非喫煙群の妊娠平均週数は 39.0 週 (SD 1.3)、新生児平均体重は 3062g (SD 375)、新生児平均頭囲は 33.2cm (SD 1.4) であった。一方、喫煙群の妊娠平均週数は 39.3 週 (SD 1.1)、新生児平均体重は 2930g (SD 269)、新生児平均頭囲は 33.0cm (SD 1.2) であった。

### 1.5) 水銀曝露と小児発達

平成 15 年 2 月末までに 62 名の妊婦から分娩後数日以内に毛髪を採取し、毛髪中の水銀濃度の測定を環境省国立水俣病総合研究センター国際・総合研究部に委託した。同時に、質問票による妊娠中の魚介類摂取状況調査を行なった。今後さらにサンプル数を増やすとともに毛髪中の水銀濃度測定を行ない、妊娠中の水銀曝露と小児発達との関連性を検討する。

## 2. ADHD を含む発達障害児及び母親の甲状腺マスキングによる甲状腺機能—後ろ向き研究

### 1) 新生児甲状腺マスキング結果

16 名が中枢神経刺激薬 (リタリンなど) の投薬を受けていた。ADHD の診断のほかに精神遅滞 MR (15 名)、自閉症 Autism (8 名)、高機能自閉症 (2 名)、広汎性発達障害 PDD (6 名)、てんかん (1 名)、学習障害 LD (7 名) のアールトキリ奇形 (1 名) の副診断名がある。知能検査は WISC-R (2 名)、WISC-III (26 名) または田中ビネー式 (9 名) が施行された。IQ85 以下の児は 19 名で、IQ70 以下は 10 名

であった。ADHD を呈する発達障害例ではマスキングの TSH, FT4 等の結果から、新生児期甲状腺機能異常を呈する症例はなかった。

スクリーニング時の出生年月日、性、在胎週数をマッチさせた対照例と比較すると ADHD を呈する発達障害児で TSH が低値の傾向があった。

#### 2) 妊婦甲状腺マスキング結果

検索しえた症例は 8 名と少ないが、母親の妊娠初期の甲状腺機能は正常であり、抗甲状腺抗体陽性者はいなかった。

児の出産後数年を経て、母親が甲状腺機能低下になった例が 1 例、父親がバセドウ病など甲状腺疾患の既往がある症例が 3 例あった。

### 3. 注意欠陥障害多動症 (attention-deficit hyperactivity disorder, ADHD) における甲状腺機能の検討

46 名の ADHD 患者について同意を得たのうち甲状腺機能検査をおこなった。このうち 3 名に TSH の軽度上昇を認めた。他の 43 名の甲状腺機能は正常であった。この 3 名の甲状腺機能は第 2 次スクリーニング、TRH テストでは正常であった。

### 4. ADHD を含む軽度発達障害児の乳幼児期から学齢期の発達—後ろ向き研究—

調査票の回答者数は 112 名、うち、診断ありの者は 98 名（男：74 名、女：14 名）、平均年齢 11.3 歳であった。診断名は診断の時期によって変化している者もあり、現在が一番近い時期に診断された診断名を基準に分析すると、ADHD：27 名、LD：24 名、LD+ADHD：10 名、自閉症：9 名、以下アスペルガー症候群、広汎性発達障害等、そしてそれらが重複して診断されていた。乳児期の発達状況に大きな違いは見ら

れないが、幼児期に、ADHD 群は触覚機能、排泄や睡眠に関連する問題、LD 群は視覚機能、前庭機能に関連する問題が顕在化してくる傾向が伺われた。

### 5. Th1/Th2 バランスを客観的に評価する方法の確立

GEM マイクロアレイにより、81 個の遺伝子が Th1 に特異的、52 個が Th2 特異的と判定された。特異性の明らかなその他の遺伝子を加えて検討を重ね、最終的に Th1 に特異的な 40 個の遺伝子と Th2 に特異的な 32 個の遺伝子を載せた DNA アレイを作製した。

Th1 優位の急性 GVHD モデルマウスの脾細胞についてこのアレイを用いて解析した結果、このマウスの Th1/Th2 バランスが Th1 に傾いていることを DNA アレイを用いて判定することができた。

さらに、個々の遺伝子の発現量から Th1 あるいは Th2 への偏向を数値化する方法を開発し、Th1/Th2 バランスの判定を客観的に行う方法を開発した。

### 6. 胎便中ダイオキシン類測定による胎内曝露評価および新生児異常との関連解析

現在までに新生児 6 人から 5.7-15.6（中央値 10.3）g の胎便が採取可能であった。これら胎便の脂肪濃度は 15.3-39.9（30.1）mg/g であった。胎便中の PCDDs+PCDFs, co-PCBs および総ダイオキシン類濃度は、それぞれ 1.4-9.1（3.7）、0.7-5.7（3.0）、2.1-14.8（6.8）pg-TEQ/g-fat であった。このうち 4 人の臍帯血中 PCDDs+PCDFs, co-PCBs および総ダイオキシン類濃度は、0.8-11（3.0）、5-13（4.5）、2.6-24（7.3）pg-TEQ/g-fat であった。胎便の総ダイオキシン類濃度は、臍帯血濃度の 61.7-80.8%を

示した。4 組の臍帯血と胎便中総ダイオキシン類濃度の比較でも、胎便中濃度は臍帯血中に比較して低値を示した ( $p=0.068$ )。胎便中総ダイオキシン類濃度と新生児 FT4 値との間に Spearman 順位相関で有意差 ( $p<0.05$ ) が認められ、正の相関が認められた。しかし、母体血 FT4, TSH, 新生児 TSH 値との間に関連を認めなかった。

## 7. P450 をバイオマーカーとした曝露影響評価

### 1) P450 をバイオマーカーとした曝露影響評価

現在、ヒト血液、胎盤、臍帯血について、採集を行っている。

### 2) 環境汚染物質複数下での P450 発現への影響

#### 2-1) PPAR リガンド存在下における AhR 標的遺伝子発現への影響

##### ①CYP1A1 発現への影響

CYP1A1 依存である EROD 活性は、SudanIII 投与によって上昇したが、クロフィブレードの同時投与でその活性上昇は約 60%まで抑制された。AhR の標的遺伝子である CYP1A1 の蛋白発現は SudanIII 投与によって誘導されたが、クロフィブレードの同時投与によって発現誘導は抑制された。しかし、SudanIII によって増加した CYP1A1mRNA 発現は、クロフィブレードの同時投与によって、さらに増強されることが分かった。

##### ②CYP1A2 発現への影響

AhR によって発現調節を受ける CYP1A2 依存 EROD 活性は、EROD 同様、SudanIII 投与で増加したが、クロフィブレードの同時投与によって、SudanIII 誘導時の 80%に減少した。また、AhR の標的遺伝子である CYP1A2 の蛋白発現は SudanIII

投与によって誘導されたが、クロフィブレードの同時投与によって発現誘導は抑制された。CYP1A2 は肝臓では constitutive に発現する CYP 分子種である。クロフィブレード単独投与によって、CYP1A2 アポ蛋白は対象群の約 14%まで発現が減少することが分かった。CYP1A2mRNA は蛋白発現量と同様に、クロフィブレード単独投与によって、その発現量は減少することが明らかとなった。

##### ③調節因子発現への影響

CYP1A1 および CYP1A2 の上流域に存在する XRE (xenobiotic response element) に結合する AhR および ARNT の mRNA 発現レベルを調べた。AhR リガンド SudanIII 投与によって、AhRmRNA 発現量は減少したが、クロフィブレード同時投与による顕著な影響は見られなかった。また、ARNT 発現量に対しては、SudanIII、クロフィブレードのいずれの投与も影響を及ぼさなかった。

#### 2-2) AhR リガンド存在下における PPAR $\alpha$ 標的遺伝子発現への影響

##### ①CYP4A 発現への影響

PPAR  $\alpha$  の標的遺伝子である CYP4A のアポ蛋白発現はクロフィブレード投与で増加したが、同様に SudanIII 共存によってその誘導は抑制された。また、コントロール群に比べて、SudanIII 単独投与群では、CYP4A アポ蛋白発現量が抑制されることが分かった。

CYP4A1、CYP4A2 の mRNA 発現レベルを測定した。CYP4A1 はクロフィブレード投与によって mRNA 発現量が顕著に増加したが、CYP4A2 ではコントロール群に比べて明らかな増加は見られなかった。また、CYP4A2 ではクロフィブレードと SudanIII 同時投与によって、mRNA 発現

量が減少することが明らかとなった。

### 3) 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。

## 8. 高分子樹脂由来環境化学物質の微量分析法の構築—ヒト生体試料採取器具からの汚染実態—

各化合物の検出において、最も汎用的なエレクトロスプレーイオン化法を採用し、各種安定同位体の内標準物質を用いた内標準法による定量を試みた。その結果、0.5～500 ng/ml の範囲で、いずれも相関係数 0.999 以上となった。

上記の条件に従い、採血器具からの微量汚染を検討した。それぞれ異なる採取器具（ロットは同一）を用いて、n=3 で実施した。また、検出限界（n. d.）を 0.2 ng/ml としたところ、測定物質が検出された。ガラスのスピッツ管に保存した空試験では、いずれも検出限界以下であったため、採取器具からの汚染と考えられる。また、各化合物において、S. D. のばらつきが少ないため（<0.1）、操作過程おいての誤差は殆どないと思われる。

## D. 考察

地域ベースで妊婦を対象として前向きコホートを設定し、胎児期からの環境化学物質による暴露の総合的なリスク評価を行うのは本研究が我が国で初となるものである。

本研究により、以下のことを明らかにし得ると考えている。PCB やダイオキシンなど環境化学物質の一般人における低濃度レベルの汚染による次世代の精神神経発達や行動・認知機能への影響、内分泌・免疫学的影響を評価し、環境化学物質によるもっとも鋭敏で重要なエンドポイント、「次世代影響」のリスク評価を明らかにする。また、これまで疫学研究が極めて不十分で発症機序が解明されていない「ADHD や学習障害など小児行動障害」、「アトピー・喘息や化学物質過敏症など小児アレルギー疾患」の環境ならびに遺伝素因の役割を解明する。さらに、バイオマーカーとして臍帯血と胎盤を用い、広範な P450 分子種の mRNA 発現量、蛋白量、酵素活性を測定することにより、PCB、DDT などよく知られている環境化学物質以外のヒトへの影響を総合的に評価し得ると考えられる。

本研究での甲状腺抗体陽性例の出現頻度は Haddow らが報告している 8.7%と同程度であった。甲状腺抗体陽性例と陰性例での内分泌攪乱物質暴露評価や周産期の合併症相違の有無や小児の神経発達を検討することにより、PCB やダイオキシンの Ah 受容体を介した甲状腺へ影響を及ぼす機序および、小児神経発達障害への関与を含めて今後、解明したいと考えている。

神経発達については 6 ヶ月時に BSID-II を実施するとともに、児の発達に影響する養育環境についても質問紙調査票（育児環境調査）にて実施しているが、先にも述べたように、BSID-II は本邦にて日本語訳されおらず、標準化も行われていないため、日本語訳については札幌医大の分担研究者ら 3 名で日本語訳を行い内容について検討を行った。また、初版 BSID を使用し縦断研究を行った加藤らの協力を得て、我々の訳

したマニュアルと加藤らの使用した初版 BSID のマニュアルの内容検討を行った。また、本研究は 1 歳 6 ヶ月でも実施する予定であり、マニュアルの日本語訳を継続して行っている。今年 3 月より検査が開始され、現在数名の検査が終了した段階である。

北海道の喫煙率は男性 57.0%（全国平均 52.8%）、女性 16.3%（全国平均 13.4%）であり、男女とも全国平均を上回っており、特に 20-40 歳代では喫煙率が男性 72.2%、女性 27.3%となっている。さらに札幌市における妊娠中の母親の喫煙率は 18.7%にも上っており、能動喫煙、受動喫煙ともに喫煙曝露が小児発達へ及ぼすリスクが高い地域といえる。本研究対象者の妊娠判明時の喫煙率は 38.3%であり、喫煙率は依然高率であることがわかった。さらに、妊娠が判明しても喫煙を止める者は約半数に留まっており、妊娠中の母親に対するさらなる禁煙教育が必要であると考えられる。妊娠後期まで喫煙を継続した喫煙群では非喫煙群に比べて新生児平均体重が低くなる傾向がみられたが現時点ではサンプル数が少ないため、今後さらにサンプル数を増やして検討する必要がある。また、母親の遺伝子解析および神経発達検査についても実施していく予定である。また、メチル水銀の神経毒性は他の化学物質との相互作用によって強まることも示唆されており、ダイオキシン、PCB など内分泌かく乱化学物質曝露評価においても水銀濃度の検討は必要と考えられる。

ADHD は基本的には知能が正常であるため周産期の要因との関連は乏しく、仮に脳障害が発生したとしても部分的障害にとどまると考えられている。今後、症例数を増やし、知能が正常範囲の症例と境界症例、精神遅滞症例に分けて層別に解析していく必

要がある。後ろ向きコホートでは、暴露評価が十分でなく、今後前向きコホート研究において、妊婦および新生児を対象に内分泌攪乱物質の胎児期暴露評価と甲状腺機能および神経発達の評価が必要である。妊婦での前向き研究で妊婦及び児の甲状腺機能および神経発達、認知機能について検討し、甲状腺抗体陽性例と陰性例での内分泌攪乱物質曝露状況や周産期の合併症についての違いがあるかの検討することにより、PCB やダイオキシンの Ah 受容体を介した甲状腺へ影響を及ぼす機序や、小児神経発達障害への関与を含めて解明していく必要がある。また ADHD と診断された患者でもその原因が多様と思われ、今後の課題であろう。

来年度には、Th1/Th2 バランスを客観的に評価する方法や内分泌攪乱物質の代謝に関連する異物代謝酵素、受容体の遺伝子多型を判定できる DNA マイクロアレイを用い、免疫学的な評価、遺伝的感受性の評価とともに、年々測定技術の進歩のみられるダイオキシン、PCB などの内分泌攪乱物質の精密な測定を行い、内分泌攪乱物質曝露による次世代影響、特に、増加する神経発達やアレルギー・免疫系の小児疾患のリスク評価を総合的に行う予定である。

## E. 結論

妊婦を対象として前向きコホート研究を設定し、環境化学物質による次世代影響の総合的評価研究の第一歩を開始することができた。本研究の継続は、近年増加する小児疾患の発症機序の解明、ひいては予防対策の樹立に寄与すると考えられる。

## F. 健康危険情報

本研究において、外来化学物質の複合曝露では単独曝露とは明らかに異なる生体影



響が引き起こされることがわかった。無数の環境汚染物質の複合汚染による影響のリスク評価は困難である。しかし、本研究からも、今後、実験動物や培養細胞の単独曝露だけではなく、同時曝露によるスクリーニングを行う必要があることが明らかとなった。

#### 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, Fujimoto S: Bisphenol A concentrations at early second trimester in maternal serum and amniotic fluid. *Reprod Toxicol* 2002; 16: 735-9.
- 2) Sata F, Yamada H, Kondo T, Yingyan G, 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* 2003; 9: 165-9.
- 3) Yamamoto K, Kitamura T, Togashi Y, Koda T, Nishimura T. An efficient methods to prepare T cell receptor gene-transduced cytotoxic T lymphocytes Type 1 applicable to tumor gene cell-therapy. *Cancer Science* 94 (2003) in press.
- 4) 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* 2003; 18: 616-20.
- 5) Morikawa M, Yamada H, Okuyama K, Kato EH, Watari M, Kataoka S, Cho K, Minakami H (2003): Prenatal diagnosis and fetal therapy of congenital cystic adenomatoid malformation of the lung: a report of five cases. *Congenital Anomalies* (in press)
- 6) Yamada H, Morikawa M, Furuta I, Kato EH, Shimada S, Iwabuchi K, Minakami H (2003): 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)
- 7) Morikawa M, Yamada H, Kato EH, Shimada S, Sakuragi N, Fujimoto S, Minakami H (2003): Live birth rate varies with gestational history and etiology in women experiencing recurrent spontaneous abortion. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* (in press)
- 8) Shimada S, Iwabuchi K, Kato EH, Morikawa M, Sakuragi N, Onoe K, Minakami H, Yamada H (2003a): No difference in natural-killer-T cell population, but Th2/Tc2 predominance in peripheral blood of recurrent aborters. *Am J Reprod Immunol* (in press)
- 9) Shimada S, Iwabuchi K, Watano K, Shimizu H, Yamada H, Minakami H, Onoe K (2003b): Expression of allograft inflammatory factor-1 in mouse uterus and poly (I:C)-induced fetal resorption. *Am J Reprod Immunol* (in press)
- 10) Chamoto K, Nishimura T. The critical role of DC for NKT cell response to  $\alpha$ -GalCer. *Clin Immunol* 37, 1-9 (2002)
- 11) Nishimura T. Tumor-vaccine cell therapy combined with DC1 and Th1 cells. *Clin Immunol* 38, 363-369 (2002)

- 12) Tsuji T, Chamoto K, Funamoto H, Kosaka A, Matsuzaki J, Abe H, Fujio K, 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)
- 13) 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)
- 14) 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. 2002 Apr;21(4):842-7.
- 15) 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. 2002 Apr;21(4):794-806.
- 16) 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. 2002 Jun;132(2):181-91.
- 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(6), 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) 加藤静恵、倉橋典絵、西條泰明、佐々木成子、鶴野安希子、中島そのみ、近藤朋子、玉置淳子、佐田文宏、岸玲子、田島敏弘、水嶋好清、本間かおり、藤田晃三、氏家武、長沼睦雄: 「注意欠陥多動 (ADHD) を示す軽度発達障害児の現在および新生児マススクリーニング時の甲状腺機能—マススクリーニングデータとの比較」、第 13 回日本疫学会、福岡、(2003. 1. 24-25)
- 2) 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
- 3) 片岡宙門, 山田秀人, 平山恵美, 長 和俊, 古田伊都子, 水上尚典: 新生児胎便中のダイオキシン類濃度測定の試み, 第 80 回北海道産科婦人科学会, (札幌, 10 月 2 日) 2002 年
- 4) 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

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

- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 14<sup>th</sup> International symposium on microsomes and drug oxidations  
Di-(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP) Regulates levels of P450 and their metabolic activities in rat testis microsomes
- 10) 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、③ Down-regulations of expressions of PPAR-alpha and AhR target genes by AhR and PPAR-alpha ligands, respectively
2. 実用新案登録  
該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

免疫調節作用関連の新規遺伝子及び Th1 ヘルパーT細胞と Th2 ヘルパーT細胞のバランスを調べる検査方法、特願 2002-314957 (2002)

内分泌分泌攪乱化学物質の次世代影響に関する前向きコホート研究

1) 全体の概要と進捗状況

主任研究者	岸 玲子	北海道大学大学院医学研究科社会医学専攻公衆衛生学分野教授
分担研究者	佐田 文宏	北海道大学大学院医学研究科社会医学専攻公衆衛生学分野講師
研究協力者	玉置 淳子	北海道大学大学院医学研究科社会医学専攻公衆衛生学分野助手
	加藤 静恵	北海道大学大学院医学研究科社会医学専攻公衆衛生学分野
	西條 泰明	北海道大学大学院医学研究科社会医学専攻公衆衛生学分野
	佐々木成子	北海道大学大学院医学研究科社会医学専攻公衆衛生学分野
	鶴野安希子	北海道大学大学院医学研究科社会医学専攻公衆衛生学分野
	中島そのみ	北海道大学大学院医学研究科社会医学専攻公衆衛生学分野

研究要旨

地域ベースで妊婦と生まれた児に対し長期の前向きコホートを設定し、ダイオキシン類などの化学物質による次世代影響の総合的なリスク評価を行うことを目的とする。主な研究対象領域として小児の神経発達、内分泌代謝疾患関連、およびアレルギー・免疫系を設定している。これらの各領域における詳細な評価方法を策定した。札幌市で最も分娩数の多い一般病院の協力を得て、対象を妊娠 23-35 週の妊婦とし前向きコホートの設定し、15 年 2 月末現在 160 名の妊婦の研究協力が得られた。

A. 研究目的

我が国では環境化学物質による胎児期からの曝露に焦点をあてた疫学研究、特に系統的な研究デザインに基づいた前向き研究は現在まで行われていない。最も感受性の高い胎内曝露による次世代影響のリスク評価が特に、近年増加している小児疾患の発症機序の解明が求められている。本研究は、環境化学物質による胎児期からの曝露に焦点をあて、地域ベースで妊婦を対象に前向きコホートを設定し、ダイオキシン類などの化学物質による次世代影響の総合的なリスク評価を行う。主な研究目的として小児の神経発達、内分泌、およびアレルギー・免疫系の影響について環境化学物質の曝露

との関係を研究する。

環境化学物質と小児の神経発達に関する疫学研究として 1980 年代からアメリカ合衆国、オランダ、ドイツなど先進工業国での比較的低濃度の環境化学物質の曝露を受けている母親から生まれた小児を対象とするコホート研究が行われてきた。Jacobson らは胎児期曝露と乳児の視覚認知記憶、幼児の言語記憶能力の低下、学童期の知能の低下などとの関連を示唆する報告している。わが国においては高濃度汚染事例カネミ油症での筋緊張、知的発達、知能障害についての報告はある。しかし、小児の神経発達に関する低濃度バックグラウンドレベルでの母体の内分泌攪乱物質曝露濃度の評価、および胎児期曝露影響のリスクを評価する研