

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

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15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・発達医学講座産科・生殖医学分野

水上 尚典

札幌医科大学産婦人科学講座

正藤 隆一

旭川医科大学産婦人科学講座

石川 睦男

北海道大学大学院医学研究科生殖・発達医学講座婦人科学分野

櫻木 範明

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

野々村 克也

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

福岡県保健環境研究所

飯田 隆雄

平成16 (2004) 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～進捗状況と対象妊婦の属性について （岸 玲子、水上尚典、櫻木範明、工藤隆一、石川睦男、佐田文宏ほか）	21
2. 喫煙が血清葉酸値に及ぼす影響～北海道の妊婦を対象とした調査より （岸 玲子、水上尚典、櫻木範明、工藤隆一、石川睦男、佐田文宏ほか）	28
3. 尿道下裂・停留精巣の遺伝要因－異物代謝酵素の遺伝子多型 （岸 玲子、野々村克也、佐田文宏ほか）	32
4. ステロイド代謝酵素遺伝子多型と尿道下裂リスク （佐田文宏、野々村克也、岸 玲子ほか）	38
5. 尿道下裂術後長期例における精巣容積に関する研究（野々村克也ほか）	42
6. カフェイン摂取、異物代謝酵素遺伝子多型と不育症リスク （佐田文宏、水上尚典、岸 玲子ほか）	45
7. 不育症に関わる免疫学的異常と子宮内胎児発育遅延に関わる遺伝学的因子の解明 （水上尚典ほか）	49
8. 妊娠中毒症の病態解析に関する研究（工藤隆一ほか）	54
9. 新たなヒト無精子症の原因遺伝子であるヒト SYCP3 遺伝子同定に関する研究 （石川睦男ほか）	57
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)	59
11. オンライン前処理 液体クロマトグラフ質量分析計を利用した ヒト血液中有機フッ素系化合物の分析法開発（中澤裕之ほか）	77
12. ダイオキシン類測定法に関する検討（飯田隆雄ほか）	87

I. はじめに

平成14年度より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「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」も2年目を終了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、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、妊娠初期に説明と同意を得た妊婦さんから採血し、葉酸と予備的にダイオキシン類および有機フッ素系化合物の測定を行いました。今後もビスフェノール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かく乱物質を分析測定し、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、アレルギー等への影響を調べていく予定です。

これまで内分泌かく乱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。加えて異物(薬物)代謝酵素の関与が考えられるダイオキシンや喫煙などと、本年度開始した遺伝的な多型との関連もさらに詳細に調べていく予定です。このような研究は、将来は、同じ曝露濃度でもハイリスク感受性者には、より予防的な対応を進めるという意味で重要になってきます。

本研究は広範囲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新生児人口がカバーされれば、そ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、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を続けることができましたならば、将来は、生まれてくる児の早期医療など、QOLを一層高める方向でも種々の発展が可能になることでしょう。

最後に、本年度报告書が、多くの皆様の御協力により実施され、このようにまとめることができたことに対して、衷心より御礼申し上げます。

平成16年3月

主任研究者 岸 玲子

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、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かく乱物質等の曝露が、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。前向き研究の形で、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かく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、内分泌かく乱物質と尿道下裂・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た。平成15年2月から平成16年1月までの、参加妊婦人数は、2245人である。平成15年11月までに回収済みの妊婦1262人の調査票を対象として、北海道における妊婦の属性について集計した。栄養補助剤（サプリメント）を服用している妊婦の割合は、19.9%であった。また、服用開始時期は、葉酸、鉄剤については、妊娠がわかってから服用した割合が高かった。妊娠前の妊婦の喫煙率は、38.5%であり、妊娠初期も喫煙している割合は12.5%と高率であった。夫の喫煙習慣については、妻の妊娠中も喫煙している割合が66.3%であった。妊娠初期に何らかの職業性化学物質曝露を受けている妊婦は15.0%、夫は29.8%であった。723人の妊娠13週未満の血清を、CLIA法を用いて葉酸の測定を行ったところ、全妊婦の平均血清葉酸値は、7.5ng/mlであり、非喫煙群と比較して、喫煙群の血清葉酸値は有意に低かった。

遺伝的な感受性素因について調べ、尿道下裂・停留精巣患児およびその母の薬物・ステロイド代謝酵素の遺伝子多型を疾病の発生との関連で明らかにするために、尿道下裂患児64人、停留精巣患児27人を症例群、尿道下裂・停留精巣を持たない健康男性96人を対照群とし、尿道下裂患児の母31人、停留精巣患児の母9人を症例群、奇形を持たない男児を出産した経産婦61人を対照群としCYP1A1、GSTM1、GSTT1の遺伝子多型を解析した。尿道下裂患児の母親のCYP1A1遺伝子の3'下流側のMspI多型のヘテロ型で、尿道下裂のオッズ比が有意に低下した。また、有意ではないが、停留精巣の母親のCYP1A1ヘテロ型でもオッズ比の低下傾向が見られた。同様に、尿道下裂症例39人、泌尿器科疾患歴のない健常男子99人を対象に、ステロイド5 α -レダクターゼ2型遺伝子（SRD5A2）の一塩基多型（L89V）およびTA繰返し多型および17 β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素3型遺伝子（HSD17B3）の一塩基多型（G289S）を解析した。SRD5A2遺伝子のL89V多型は有意ではないがVアリルを多く持つ程、低下傾向が認められた。一方、HSD17B3遺伝子のG289S多型では、Sアリルを多く持つ程、増加傾向を示し、S/S型では有意のリスク上昇（オッズ比3.91、95%信頼区間1.16-13.2）が認められた。軽症型尿道下裂症例では、さらにこの関連が強まった。さらに、尿道下裂術後長期経過例の精巣容積について検討し、

本邦における精巣容積曲線と比較した。1983年以後の20年間に北大附属病院泌尿器科で尿道形成術を施行した447例中、術後7～17年経過した14例（術後平均11.8年）において精巣容積を計測した。精巣容積評価時の年齢は11～22歳で、精巣容積は9～20 mlであった。本邦における精巣容積曲線の-2SD以下の萎縮精巣が14例中1例、28精巣中2精巣（7.1%）で認められた。

不育症（習慣流産）と食事・生活習慣および異物代謝酵素遺伝子多型との関連を明らかにするため、北大附属病院産科を受診した不育症患者81人、健常経産婦226人に、生活習慣、食事、職業、居住環境などに関する質問紙調査票を郵送し、各々53人（回答率65.4%）、144人（回答率63.7%）から回答を得た。不育症例では、対照に比べカフェインを多く摂取する傾向がみられた。CYP1A2遺伝子のCYP1A2遺伝子のCYP1A2*1F(C731A)多型のAA型（活性上昇型）において、カフェイン摂取量が多くなるにつれて、不育症のリスクの上昇がみられ、1日当たりの平均カフェイン摂取量が300mg以上で、オッズ比5.22（95%信頼区間1.02-26.2）の有意のリスクの上昇がみられた。また、正常の生殖機構および免疫学的生殖不全、特に習慣流産における、NK細胞、NKT細胞、Th1/Th2サイトカインバランスの役割、子宮内胎児発育遅延の遺伝学的因子の解明を目的に解析を行ったところ、習慣流産女性（n=20）では、コントロール（n=17）に比較して子宮内膜中CD3+細胞、CD4+IFN- γ +細胞、CD4+TNF- α +細胞比率が有意に低値であった。染色体正常流産ないし化学妊娠に至った17人の非妊娠時NK細胞活性/細胞比率は、生産に至った59人に比較し有意に高く、染色体異常流産に至った9人と同レベルであった。非妊娠時の高NK細胞活性（>46%）/高細胞比率（>16.4%）は、その後の妊娠における染色体正常流産ないし化学妊娠の予知因子（相対危険率3.6/4.9）であることを明らかにした。習慣流産患者のNK細胞におけるCD158a発現は、コントロールに比較して有意に低値を示した。NK細胞で抑制型レセプターであるKIR2DL1（CD158a）の発現低下が認められ、習慣流産の病因に関連していると考えられる。CYP17 A1 alleleホモ型（n=44）のIUGR頻度は、A2 allele キャリア（n=90）の頻度に比較して有意に高かった（OR =3.41）。また、GSTM1 null型（n=67）の分娩週数は、GSTM1 presence（n=67）に比較して有意に早かった。Cytochrome P450c17 α enzymeをコードするCYP17遺伝子多型がIUGRの病因に関連することを解明した。

妊娠中毒症の病態を研究するにあたり、胎盤の詳細な検討、胎盤絨毛細胞培養および絨毛細胞モデルを用いて、低酸素条件下においての変化が予想される老化抑制遺伝子klothoと、aromatases P450（CYP19）の発現様式について検討した。

ヒト無精子症の原因として以前より、Y染色体上の部分的欠失ことにAZF（azoospermia factor）領域の欠失が報告されているが、今日までこのAZF領域においてヒト無精子症の原因遺伝子として明らかとされたのは、わずか3つにすぎない。今回我々はヒト12番染色体上に新たな無精子症原因遺伝子SYCP3の同定に成功した。

多くのCYP分子種は、ステロイドホルモンやエイコサノイド、サイトカインなどによる発現制御を受けている。従って、これらの生理活性物質が大きく変動する妊娠期や性成熟は、CYP活性を左右する大きな要因となっている。そこで、CYPなどの薬物代謝酵素を中心に、母体、胎盤、胎児の薬物代謝の差に関する最近の知見について文献調査を行った。母親および胎児・新生児の外来異物の代謝能に関し、胎児・新生児肝臓および胎盤におけるCYPや、抱合酵素などのPhaseII酵素の発現は、一部のステロイドホルモン代謝酵素を除くと成人に比べて低い為、母体肝臓における代謝能が薬物・環境汚染物質のクリアランスを決定していることが示唆される。妊娠期には、一部CYP2DなどのP450分子種に関して、母体肝臓で活性が上昇している可能性も報告されている。しかし、多くの環境化学物質の代謝に関与す

るCYP、抱合酵素の発現、誘導は妊娠時の母体肝臓では抑制されることが分かった。さらに、得られた知見を元に、実際に妊娠ラットを用いて母体肝臓における各CYP分子種の発現レベルや、aniline、propranolol、ethanolなど薬物あるいは外来異物の代謝活性について測定した。CYP2Dサブファミリーに関しては妊娠期に活性が増加するが、その他のCYP分子種、CYP2B、CYP2E、CYP2C、CYP1A2に関しては、蛋白発現量あるいは薬物代謝活性が、妊娠期に顕著に減少することが明らかとなった。また、一方で、CYP遺伝多型による代謝能の違いは薬物や環境化学物質の薬効・毒性を決定する重要なファクターとなっている。P450には様々な分子種が存在するが、CYPの遺伝多形によって、薬物を中心とした外来異物のクリアランス、毒性発現が異なることが報告されている。また、そこで、P450及びその制御機構に存在する遺伝多形について、新規SNPs解析方法の開発を試みた。本研究では、異物代謝酵素群及びその調節因子の遺伝的多形を一度に解析するために、新規マイクロアレイを作成した。

繊維類の撥水剤、テフロン加工製品等に汎用されている有機フッ素系化学物質は身の回りでの使用頻度も高く、ヒトへの暴露も懸念されている。しかし、これらフッ素系化合物は、食品用容器材料（紙皿、ポップコーン用袋等）、調理用具、半導体コーティングや飛行機の油圧オイルまで様々な製品に使用されており、使用実態は明らかとされていない。この一連の有機フッ素系化合物は、残留性有害化学物質（POPs）として、法的に指定されていないが、その性質（難分解性や生体残留性等）もPCBやDDTなどと類似している。これら有機フッ素系化合物の甲状腺ホルモンのかく乱、神経系への影響、妊娠動物に対する催奇形性が報告され始めたが、毒性評価や生体影響は不明の点も多い。内分泌かく乱化学物質（ED）のヒト暴露モニタリング手法の基礎的検討を基盤として、EDと疑われている有機フッ素系化合物の暴露汚染源の解明を目的とした新たな分析法の構築を目指した。既報の環境汚染報告内容を踏まえ、有機フッ素系化合物の中でもPFOS、PFOA、及びPFOSAを対象物質とする。LC/MS法を基本として有機フッ素系化合物へ応用することとする。その結果、PFOS（0.5～200ppb）、PFOA（0.5～200ppb）及びPFOSA（1.0～200ppb）において、相関係数0.999と良好な直線性を得た。また、回収率も80%以上と迅速・高感度な分析手法が構築できた。本法を応用して、健常人21名を対象に分析した結果、すべての検体からPFOSが10ppb前後検出された。ヒト生体試料の高精度かつ高感度な分析手法の構築が達成でき、大規模スクリーニングに伴う疫学的解析評価を行うことが可能と思われる。

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分野助教授

水上 尚典

北海道大学大学院医学研究科生殖・発達

医学講座産科・生殖医学分野教授

工藤 隆一

札幌医科大学産婦人科学講座教授

石川 睦男

旭川医科大学産婦人科学講座教授

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分野教授

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分野教授

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分野教授

中澤 裕之

星薬科大学薬品分析化学講座教授

飯田 隆雄

福岡県保健環境研究所部長

研究協力者

西條 泰明、貢 英彦、笠井世津子、

倉橋 典絵、森岡 三果、鈴木 佳奈、

小池 晶、川口 真未

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

山田 秀人

北海道大学大学院医学研究科生殖・発達
医学講座産科・生殖医学分野

柿崎 秀宏、古野 剛史

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

柴田 隆

北海道大学附属病院泌尿器科

長 和俊、平山 恵美

北海道大学附属病院周産母子センター

林 卓宏、遠藤 俊明、北島 義盛、

林 巧

札幌医科大学産婦人科学講座

宮本 敏伸、山下 剛

旭川医科大学産婦人科学講座

田熊 直之

旭川医科大学附属病院

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分野

吉村 吉博、井之上浩一、伊藤 里恵、

岡田 文雄

星薬科大学薬品分析化学講座

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

平川 博仙、戸高 尊、堀 就英、

芦塚 由紀、中川 礼子、松枝 隆彦、

飛石 和大

福岡県保健環境研究所

研究協力機関

青葉産婦人科病院、秋山記念病院、岩見沢こども・産婦人科クリニック、旭川医科大学附属病院、旭川赤十字病院、遠軽厚生病院、えんどう桔梗マタニティクリニック、王子総合病院、帯広協会病院、帯広厚生病院、北見赤十字病院、北見レディースクリニック、勤医協札幌病院、釧路赤十字病院、釧路労災病院、慶愛病院、幌南病院、公立芽室病院、五輪橋産科婦人科小児科病院、札幌医科大学附属病院、札幌厚生病院、札幌社会保険総合病院、札幌徳州会病院、市立札幌病院、市立土別総合病院、市立函館病院、白石産科婦人科病院、新日鐵室蘭総合病院、手稲溪仁会病院、天使病院、道立紋別総合病院、中標津町立病院、中村病院、名寄市立総合病院、日鋼記念病院、函館五稜郭病院、函館中央病院、はしもとクリニック、美幌国保病院、朋佑会札幌産婦人科病院、北海道大学医学部附属病院、稚内市立病院

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。

葉酸は、ホモシステインをメチオニンに転換す

る課程に不可欠であり、葉酸が欠乏すると、ホモシステインが高値となる。高ホモシステイン血症は、流産や胎児発育遅延、二分脊椎などの神経管欠損などの胎児奇形の発生と関連しているとの報告があり、周産期疾患の予防の観点からも、葉酸は重要な栄養素であると考えられる。国際先天異常監視機構 (International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring :ICBDMS)、及び、日本産婦人科医会によると、我が国の二分脊椎の発症率が増加傾向にあることが報告されたこと、今後、我が国の食生活の多様化により、食物摂取の個人格差が大きくなり、葉酸摂取が不十分なものが増加することも懸念されることから、妊娠可能な女性の葉酸について、検討すべき課題であると考えられる。

尿道の形成、陰囊の下降は、テストステロンが関与することから、尿道下裂・停留精巣発症の一因として、内分泌かく乱物質との関連が疑われているが、いまだ成因は明らかではない。妊娠中の器官形成期に化学物質曝露を受けて、尿道下裂や停留精巣を発生させる可能性は、①妊娠中の母親が化学物質に曝露されることによる経胎盤性による曝露 ②妊娠中の母親が化学物質に曝露されることにより、妊婦のホルモン濃度が変化することによるエストロゲン曝露 ③妊娠中の母親の代謝酵素遺伝子多型の変異により酵素活性の変化の有無による影響 ④児の代謝酵素遺伝子多型の変異により酵素活性の変化の有無による影響、が考えられる。そこで、本研究では、尿道下裂・停留精巣と異物・ステロイド代謝酵素遺伝子多型および精巣の発育の指標である精巣容積との関連を検討した。

生殖医学領域において、遺伝的要因と環境要因が複合して発症するいわゆる生活習慣病型の疾病が存在する。特に不育症（習慣流産）は、その発症機構に遺伝的因子、環境因子が関与し、さらに何らかの免疫学的異常が強く関与することが強く示唆されている。前者の例としては、カフェインの摂取と不育症発症との有意な関連が示唆されている。また近年、各種サイトカインやTh1/Th2細胞、NK・NKT細胞などの異常が習慣流産など免疫学的生殖不全に関与することが明らかになりつつある。これらの免疫学的異常を惹起する環境因子として、内分泌かく乱物質が注目されている。また、子宮内胎児発育遅延では、その成因に遺伝学的因子および内分泌かく乱物質を含めた生活環境因子が関与するものと考えられている。本研究の目的は、正常の生殖機構および免疫学的生殖不全、特に習慣流産における、食事・生活習慣と異物代謝酵素遺伝子多型の関連、NK細胞、NKT細胞、Th1/Th2サイトカインバランスの役割を解明することを目的とした。また、子宮内胎児発育遅延の遺伝学的因子の解明を目的に各種遺伝子多型を解析した。

妊娠中毒症を理解するためのひとつの手法として、胎盤あるいは絨毛細胞を用いた基礎的研究が非常に重要であると考えられる。胎盤を構成している細胞のうち、特にcytotrophoblast(CT)から分化したsyncytiotrophoblast(ST)は直接母体血と接することより、母体とのガス交換や物質交換にとって非常に重要であり、このことは血管内皮細胞と同様の役割を果たしていると考えられる。また、ST細胞は、胎児の成長に必要なホルモン産生や妊娠維持のために重要な物質の産生を行っている。妊娠中毒症胎盤では胎盤に還流する母体血流の低下により低酸素もしくはhypoxia-reoxygenationがもたらされることから、これら胎盤絨毛細胞の分化異常それに伴うステロイドホルモンや種々の遺伝子発現変化が報告されている。今回我々は、ST細胞から分泌される内皮細胞保護作用を有する老化抑制遺伝子klothoと、C19ステロイドをエストロゲンに変換するaromatases P450(CYP19)の発現様式を中心に検討する。

男性不妊症、特に成熟精子を全く有していない、いわゆる無精子症は現在でも不妊治療の大きな壁となっている。Sycp3遺伝子のノックアウトマウスは発達上正常である。しかしながら、精子形成過程における減数分裂異常により、無精子症を示すとの報告をもとに、ヒトSYCP3遺伝子の同定及

男性不妊症、特に成熟精子を全く有していない、いわゆる無精子症は現在でも不妊治療の大きな壁となっている。Sycp3遺伝子のノックアウトマウスは発達上正常である。しかしながら、精子形成過程における減数分裂異常により、無精子症を示すとの報告をもとに、ヒトSYCP3遺伝子の同定及

びヒト無精子症での解析を行う。

Cytochrome P450(P450, CYP)は細菌、植物から哺乳類まで多くの生物種に存在し、ステロイドホルモンやビタミン、エイコサノイドなどの生理活性物質の生合成・代謝を行うと同時に、医薬品や環境汚染物質など、多くの外来異物代謝も担っている一酸素添加酵素である。妊娠期の環境化学物質や薬物への曝露は、胎児に不可逆的な影響を与える可能性も考えられる。そこで、特にCYPを中心に、母体、胎盤、胎児の薬物代謝の差に関する最近の知見について文献調査を行った。また、得られた知見を元に、母体肝臓におけるCYP発現量や、薬物代謝活性の変動について、妊娠ラットをモデルとして研究を行った。一方で、CYP遺伝子多型による代謝能の違いは薬物や環境化学物質の薬効・毒性を決定する重要なファクターとなっている。また、450は薬物だけではなく、喫煙物質や食物由来の外来異物も代謝するため、CYP1A1遺伝多形と肺癌、CYP1B1遺伝多形と大腸癌発生率との関係も報告されている。そこで、P450及びその制御機構に存在する遺伝子多型について、新規SNPs解析方法の開発を試みた。

繊維類の撥水剤、テフロン加工製品等に汎用されている有機フッ素系化学物質は身の回りでの使用頻度も高く、ヒトへの曝露も懸念されている。しかし、これらフッ素系化合物は、食品用容器材料（紙皿、ポップコーン用袋等）、調理用具、半導体コーティングや飛行機の油圧オイルまで様々な製品に使用されており、使用実態は明らかとされていない。この一連の有機フッ素系化合物は、残留性有害化学物質(POPs)として、法的に指定されていないが、その性質（難分解性や生体残留性等）もPCBやDDTなどと類似している。これら有機フッ素系化合物の甲状腺ホルモンのかく乱、神経系への影響、妊娠動物に対する催奇形性が報告され始めたが、毒性評価や生体影響は不明の点も多い。また、国内では、環境モニタリングが僅かに実施しているが、ヒトでの汚染状況や生体影響を検討している研究は皆無である。また、動物実験を用いた研究では、胎児期にPFOSを曝露した場合、

産まれた仔に奇形や甲状腺異常等が観察された報告もある。そこで、前向きコホート研究による先天性異常と有機フッ素系化合物などの環境汚染物質との関わりについては、多くの関心が寄せられている。そこで、本研究では、上記の目標を達成するため、多検体処理能を有するオンライン前処理/液体クロマトグラフ質量分析法(LC/MS)を開発することとした。

B. 研究方法

1. 進捗状況と対象妊婦の属性について

北海道産婦人科医会、北海道産科婦人科学会、北海道大学産科・生殖医学分野、北海道大学婦人科学分野、札幌医科大学産婦人科学講座、旭川医科大学産婦人科学講座、北海道大学公衆衛生学分野が協力し、平成16年1月まで、北海道の43病院の協力を得て、調査を行っている。参加病院を受診する全妊婦を対象とした前向きコホートを設定し、同意を得、調査票への記入とともに、器官形成期である妊娠初期をはじめとして、妊娠後期・出産時の母体血、臍帯血を採取、凍結保存し、内分泌かく乱物質（PCB・ダイオキシン・フタル酸エステル・ビスフェノールAなど）の、直接的な曝露量の測定を行い、疾患との直接的な関連を検討する。また、日本人が豊富に摂取する大豆などに含有し、エストロゲン活性を有する植物エストロゲンの濃度、また、妊娠前からの十分量の摂取により多くの奇形のリスクを低減させると報告のある葉酸の測定も行う。さらに、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（CYP1A1, GSTT1, GSTM1 など）について検討する。

調査票の内容は、妊婦の基本的属性、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追求するため、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、などを調査項目としている。

2. 喫煙が血清葉酸値に及ぼす影響

北海道の38産科施設に通院中で、本調査に同意を得た全妊婦を対象とした。平成15年10月までに採血と環境に関する調査票の協力が得られた787人の妊婦のうち、除外基準として、内分泌障害、凝固障害、葉酸サプリメントの服用者、てんかん、乾癬の既往を持つ人、腎不全患者である妊婦64人をのぞき、723人の妊娠13週未満の血清を、CLIA法を用いて、葉酸の測定を行った。喫煙に関して、非喫煙群（一度も喫煙をしたことのない人）、禁煙群（妊娠初期にやめた）、喫煙群（妊娠中も喫煙をしている人）に分けて、解析を行った。解析は、SPSS ver.11.0 を用い、Kruskal-Wallis 検定を行った。

3. 尿道下裂・停留精巣の遺伝要因－異物代謝酵素の遺伝子多型

①尿道下裂・停留精巣患児

北海道大学医学部附属病院泌尿器科・埼玉県立小児医療センター泌尿器科、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、尿道下裂の手術を受けた男児64人と、停留精巣の手術を受けた男児27人を症例群とし、尿道下裂・停留精巣などの泌尿生殖器系先天異常をもたないボランティア健康常男性96人を対照群とした。

②尿道下裂・停留精巣児を出産した母親

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で尿道下裂の手術を受けた男児の母親31人、停留精巣の手術を受けた9人を症例群とし、北海道大学産婦人科で、奇形を持たない男児を出産した経産婦61人を対照群とした。

③妊娠中の母親の喫煙と遺伝子多型との関連

②の対象者のうち、妊娠中の生活習慣に関する調査票に回答した尿道下裂・停留精巣児の母親29人（有効回答率72.5%）、奇形を持たない男児を出産した経産婦48人（有効回答率78.7%）を対象として、喫煙の有無と遺伝子多型との関連を調べた。

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3'側のMsp I 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。

統計解析方法は、ロジスティック回帰分析を用い、野生型homozygoteおよび野生型homozygote + 非喫煙群をreferenceとして、オッズ比を求めた。喫煙との関連については、児出生時の世帯収入と、母親の学歴を調整因子とした。

4. ステロイド代謝酵素遺伝子多型と尿道下裂リスク

北海道大学医学部附属病院泌尿器科で経過観察中の尿道下裂症例39人、泌尿器科疾患歴のない健康常男子ボランティア99人を対象とした。インフォームドコンセントを経て、採血を行い、白血球からDNAを抽出し、SRD5A2（L89V、TA繰返し）多型とHSD17B3（G289S）多型を各々制限酵素RsaIによるPCR-RFLP法、PCR法、TaqMan法により判定し、尿道下裂との関連をロジスティック回帰分析により検討した。

5. 尿道下裂術後長期例における精巣容積に関する研究

1983年以降北大附属病院泌尿器科で尿道形成術を施行された447名の患者のリストを作成した。患者カルテの調査とともに、術後長期での観察を呼び掛ける手紙を郵送し、外来受診を促した。精巣容積の測定は、オルキオメーターを用いて行った。本邦における精巣容積曲線[1]を用いて、-2SD以下を萎縮精巣と判定した。

6. カフェイン摂取、異物代謝酵素遺伝子多型と不育症リスク

北大附属病院産科を受診した不育症患者81人、健康経産婦226人に、生活習慣、食事、職業、居住環境などに関する質問紙調査票を郵送し、各々53人（回答率65.4%）、144人（回答率63.7%）か

ら回答を得た。また、受診時に、採血を行い、白血球よりDNAを抽出し、PCR-RFLP法により、CYP1A2遺伝子型を判定した。ロジスティック回帰分析により、オッズ比と95%信頼区間を求めた。統計解析にはSPSSウィンドウズ版を用いた。

7. 不育症に関わる免疫学的異常と子宮内胎児発育遅延に関わる遺伝学的因子の解明

- 1) 習慣流産20人と正常女性17人における黄体期中期の子宮内膜中CD56+NK細胞数、CD3+CD4-CD8-TCRV α 24+V β 11+NKT細胞数、CD4+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) 習慣流産患者113人における非妊娠時末梢血中のNK細胞活性(Cr遊離法)、細胞比率(FCM)とその後の妊娠の帰結との関連を前方視的に検討した。
- 3) 習慣流産20人と正常女性15人における末梢血CD3-CD56+NK細胞マーカー、perforin、CD94、CD161、CD158a、CD158b、CD244を解析(FCM)した。
- 4) コホート研究として、北大で24週をこえて出産した134女性から末梢血DNAを採取し、PCR/PCR-RFLP法による各種遺伝子多型：CYP1A1 (MspI)、CYP17 (MspAI)、GSTP1 (BsmAI)、GSTM1 (presence/null)、GSTT1 (presence/null)と出生体重、分娩週数、子宮内胎児発育遅延(IUGR)頻度、早産頻度、妊娠中毒症頻度との関係を調べた。

8. 妊娠中毒症の病態解析に関する研究

B-1) 妊娠中毒症および正常胎盤の採取

全例、帝王切開による分娩時に、無菌的に胎盤を採取し、採取より15分以内に液体窒素下に凍結・保存もしくは直ちに絨毛細胞培養のためKlimanらの方法に準じた処理を行う。一部は組織学的検討のため、凍結およびパラフィン包埋に供する。

B-2) 細胞培養法

培養実験として、上記絨毛細胞のほかに絨毛モデルとして絨毛癌細胞株(BeWo)を用いる。培養条件は低酸素培養(酸素濃度5%以下)下での培養とair condition下での培養を比較検討する。また、hypoxic-reoxygenation条件での培養も行う。

B-3) 遺伝子解析

摘出物および培養細胞のCYP19およびklotho mRNA発現をNorthern blot、in situ hybridizationおよびreal time RT-PCR法を用いて定量・局在に関し検索する。

B-4) 関連蛋白解析

CYP19発現を抑制するhuman Mash-2 (mammalian achaete/scute homologue 2)と2種類のKlotho蛋白発現・局在につき、Western blotおよび免疫組織染色を施行する。

B-5) 機能評価実験

それぞれの遺伝子につきアンチセンス実験や他の抑制遺伝子発現により、細胞の生存率や分化状況・ホルモン産生能の変化を解析する。また、これとは反対に、過剰発現させた場合の機能変化についても検討する。

9. 新たなヒト無精子症の原因遺伝子であるヒトSYCP3遺伝子同定に関する研究

マウスSycp3 cDNAをもとに、ヒト精巣cDNAライブラリーをスクリーニングし、ヒトSYCP3 cDNAを単離し、その後減数分裂異常により、無精子症を呈している不妊症患者19名から文章による同意のもとに遺伝子異常の検索を行った。

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

1) 母と子の薬物代謝の差

ヒトにおける母と子の薬物代謝、特に、母体肝臓、胎児肝臓、胎盤に発現するCYPを中心に、その発現レベルやパターンの違いについて文献を調べた。

2) 妊娠ラットの母体肝臓における薬物代謝能の変動

妊娠ラットをモデルとして、妊娠期にCYP各分子種の発現や薬物代謝活性がどのように変動するのかを調べた。妊娠0日目、10日目、11日目、15日目、18日目、20日目のWistarラットについて、肝臓を採取し、ミクロソームにおけるCYP発現や薬物代謝活性を測定した。妊娠時のラット肝臓に発現するCYP各分子種発現量の変動はCYP2B1、CYP2B2、CYP2E1、CYP2C12に特異的な各抗体（ウサギ血清）を用い、Western blottingによって解析した。

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子多型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。P450などの薬物代謝酵素から、実際にfunctionにつながる変異であること、日本人に多型が多い変異であること、を考慮してアレルを選定し、マイクロアレイの作成を行った。

11. オンライン前処理 液体クロマトグラフ質量分析計を利用したヒト血液中有機フッ素系化合物の分析法開発

1) オンライン前処理-LC/MS法の測定概要

血液試料（血清・血漿）は内標準物質を添加したアセトニトリルで除タンパクし、遠心分離した上清をフィルターを通し測定用試料とする。抽出精製・濃縮は、オンライン前処理固相カラムを用いて行い、カラムスイッチングにより、分析対象物質を分離部及び検出部（LC/MS）に導入する。検出には、ESI-MSによるSIM/ネガティブモードで測定を実施する。

2) 測定試料の調製法

-80℃で凍結保存してある血液試料を常温で解凍し、転倒混和を行った後、ピペッターで正確に300 μl を量り取りアシストチューブ（2 ml）に移す。同様に内標準物質（Perfluorodecanoic acid：PFDA）を添加したアセトニトリル溶液を300 μl 量り取りゆっくりと添加する。溶液を

よく混ぜタンパク質を十分変性させた後、遠心分離（3000 rpm、10分）で除タンパクを行う。遠心後の上清をパスツールピペットで取り、45 μmのフィルターを通したものを測定試料とする。

3) 標準試料の調製法

各標準品をメタノールに溶解させ、1.0 mg/mlの溶液を調製し、0.1~400 μg/mlの範囲で標準溶液を水で適宜希釈して測定用試料を調製した。

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。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. 進捗状況と対象妊婦の属性について

平成15年2月から平成16年1月までの、参加妊婦人数は、2245人である。そのうち、平成16年1月までに、150人が出生している。うち、何らかの奇形をもつ児は8人であり、その奇形の内訳は、尿道下裂、停留精巣、異形成腎、心奇形、水頭症、二分脊椎、口唇口蓋裂、多指症、多趾症、尿管間遺残症、横隔膜ヘルニアである。その他、子宮内発育遅延5例、羊水過少1例であった。

平成15年11月までに回収済みの妊婦1262人の調査票を対象として、北海道における妊婦の属性について集計した。（回収率36.2%）妊婦の平均年齢は29.3±4.5才で、初産と経産の割合は、それぞれ、48.2%、51.8%であった。妊婦のBody Mass

Index (BMI) は、 21.0 ± 3.2 であった。

妊婦の既往歴として、多かった疾患順に、アレルギー疾患22.6%（鼻炎、アトピー性皮膚炎など）、習慣性流産1.5%、糖尿病1.1%、先天性心疾患1.0%、高血圧0.6%であった。

栄養補助剤（サプリメント）を服用している妊婦の割合は、19.9%であった。服用しているサプリメントの内訳は、葉酸23.2%、鉄剤15.7%、総合ビタミン剤14.6%、各種ビタミン剤19.7%であった。また、服用開始時期は、葉酸、鉄剤については、妊娠がわかってから服用した割合が高く、総合ビタミン剤、各種ビタミン剤については、妊娠前から服用している割合が高かった。

妊婦の飲酒習慣については、毎日飲酒している割合は1.3%、週に数回の飲酒は5.7%、月に数回の飲酒は6.8%であり、妊娠がわかってからやめた割合は49.3%であった。妊婦の喫煙習慣については、妊娠前の喫煙率は、38.5%であり、妊娠初期も喫煙している割合は12.5%、妊娠がわかってやめた割合は、35.5%であった。また、妊婦の職場における受動喫煙状況については、妊娠前には、いつも吸った割合が36.5%であったのに対し、妊娠がわかってからは18.8%と減っていた。また、夫の喫煙習慣については、妻の妊娠中も喫煙している割合が66.3%と高く、妊娠がわかってからやめた割合は、12.1%であった。

妊婦の妊娠初期の職業性化学物質曝露については、多い順に、有機溶剤（エタノール、トルエン、キシレンなど）5.7%、医薬品（麻酔薬、抗がん剤など）4.2%、石油製品（石油、ディーゼル燃料、ガソリンなど）0.5%、除草剤・殺虫剤噴霧0.5%、放射線曝露3.3%、ゴミ焼却炉0.5%であった。パートナーの妊婦妊娠初期の職業性化学物質曝露については、多い順に、石油製品10.5%、有機溶剤8.1%、除草剤・殺虫剤噴霧3.5%、放射線曝露2.2%、医薬品の取り扱い2.1%、ゴミ焼却炉1.5%であった。

2. 喫煙が血清葉酸値に及ぼす影響

対象の内訳は、非喫煙群58.1%、禁煙群30.7%、喫煙群11.2%であった。全妊婦の平均血清葉酸値

は、7.5ng/mlであった。全妊婦の分布状況は、基準値である3.6~12.9ng/mlの中に、ほとんどの妊婦が分布していた。また、非喫煙群7.8ng/mlと比較して、喫煙群は6.8ng/mlであり、有意に低かった。非喫煙群、禁煙群、喫煙群の順に、血清葉酸値が低下していた。

3. 尿道下裂・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児のCYP1A1、GSTT1、GSTM1遺伝子多型における遺伝子の頻度を表1に示した。CYP1A1の変異型Homozygote、Heterozygoteをもつ停留精巣児で、オッズ比の低下傾向が見られたが、有意ではなかった。尿道下裂の母親では、CYP1A1のHeterozygoteで有意なオッズ比の低下が見られた。また、停留精巣の母親では、CYP1A1の変異型Homozygote、Heterozygoteでオッズ比の低下傾向が見られたが、有意ではなかった。CYP1A1野生型で喫煙群、GSTT1欠損型で喫煙群でオッズ比の上昇が見られたが、有意ではなかった。

4. ステロイド代謝酵素遺伝子多型と尿道下裂リスク

SRD5A2遺伝子のL89V多型、TA繰返し多型およびHSD17B3遺伝子のG289S多型における各遺伝子型のオッズ比と95%信頼区間を表1に示した。SRD5A2遺伝子のL89V多型のL/L型に対するL/V型、V/V型のオッズ比（95%信頼区間）は、各々0.85（0.31-2.33）、0.65（0.18-2.33）であり、有意ではないがVアリルを多く持つ程、低下傾向が認められた。一方、HSD17B3遺伝子のG289S多型のG/G型に対するG/S型、S/S型のオッズ比（95%信頼区間）は、各々1.87（0.86-4.09）、3.91（1.16-13.2）であり、Sアリルを多く持つ程、増加傾向を示し、S/S型では有意のリスク上昇が認められた。

尿道下裂の症例をpenile type以下の軽症型で、停留精巣や他の奇形を合併しない症例（15例）とpenoscrotal type以上の重症型あるいは、停留精巣や他の奇形を合併する症例（22例）に分けた場

合、軽症型では、SRD5A2遺伝子のL89V多型のL/L型に対するL/V型、V/V型のオッズ比（95%信頼区間）は、各々0.36（0.10-1.29）、0.46（0.10-2.20）となり、全症例の場合よりもリスクの低下傾向が強まった。一方、HSD17B3遺伝子のG289S多型のG/G型に対するG/S型、S/S型のオッズ比（95%信頼区間）は、各々3.77（1.08-13.2）、9.50（1.88-48.0）であり、全症例の場合よりもリスクの上昇の程度が強まり、G/S型、S/S型ともに有意のリスク上昇が認められた。重症および合併型尿道下裂症例では、いずれの遺伝子多型においても、有意な関連はみられなかった。

5. 尿道下裂術後長期経過例における精巣容積に関する研究

術後7～17年経過した14例（術後平均11.8年、中央値11年）において精巣容積を計測した。この14例における尿道下裂の程度は、近位型7例、遠位型7例であった。14例中2例において合併する停留精巣に対し、精巣固定術が施行されていた（両側1例、片側1例）。精巣容積評価時の年齢は11～22歳（平均15.3歳、中央値14歳）で、精巣容積は9～20 mlであった。本邦における精巣容積曲線の-2SD以下の萎縮精巣が14例中1例、28精巣中2精巣（7.1%）で認められた。萎縮精巣を認めた1例は近位型尿道下裂例で、片側停留精巣に対し精巣固定術の既往があり、22歳時で患側精巣は10 ml、対側精巣は9 mlであった。

6. カフェイン摂取、異物代謝酵素遺伝子多型と不妊症リスク

不妊症例では、対照に比べ、カフェインを多く摂取する傾向がみられ、1日当たりカフェインを300mg以上摂取する場合、不妊症に対するオッズ比は2.61と上昇するが、有意ではなかった。CYP1A2遺伝子のCYP1A2*1F多型のAA型（活性上昇型）において、カフェイン摂取量が多くなるにつれて、不妊症のリスクの上昇がみられ、1日当たりの平均カフェイン摂取量が300mg以上で、オッズ比5.22（95%信頼区間1.02-26.2）の有意のリスクの上昇がみられた。

7. 不妊症に関わる免疫学的異常と子宮内胎児発育遅延に関わる遺伝学的因子の解明

1) 子宮内膜中NK細胞数、NKT細胞比率には差異を認めなかった。習慣流産女性では、コントロールに比較してCD3+細胞（平均40.3 vs. 56.5%）、CD4+IFN- γ +細胞（28.4 vs. 39.5%）、およびCD4+TNF- α +細胞（32.9 vs. 45.8%）比率が有意に低値であった。Th1/Th2バランスは両群間で差異を認めなかった。習慣流産患者の子宮内膜では、Th1優位、NK細胞、NKT細胞異常などは認められず、これは従来の仮説と異なり、Th細胞の減少、つまりimmunodystrophismが病因に関連していることが初めて示された。

2) 習慣流産患者85人がその後妊娠した。染色体正常流産ないし化学妊娠に至った17人の非妊娠時NK細胞活性/細胞比率（平均47%/17.1%）は、生産に至った59人の33%/13.1%に比較し有意に高く、染色体異常流産に至った9人の27%/15.7%は生産群と同レベルであった。ROC解析からカットオフ値をそれぞれ設定した。非妊娠時の高NK細胞活性（>46%）/高細胞比率（>16.4%）は、その後の妊娠における染色体正常流産ないし化学妊娠の予知因子（相対危険率3.6、95%CI 1.6-8.0/4.9、1.7-13.8）であることが初めて明らかとなった。

3) 習慣流産患者のNK細胞におけるCD158a発現は、コントロールに比較して有意に低値（平均22.9% vs. 33.6%）を示した。perforin、CD94、CD161、CD158b、CD244発現は両群間で差異はなかった。NK細胞で抑制型レセプターであるKIR2DL1（CD158a）の発現低下が認められ、習慣流産の病因に関連していることが初めて示唆された。

4) CYP17 A1 alleleホモ型（A1A1）（n=44）のIUGR頻度（<10th percentile/< -1.5 SD; 22.7%/11.4%）は、A2 alleleキャリア（A1A2/A2A2）（n=90）の頻度（7.8%/2.2%）に比較して有意に高かった（OR=3.41、95%CI=1.18-9.84）。また、GSTM1 null型（n=67）の

分娩週数（Mean±SD、37.5±3.1週）は、GSTM1 presence（n=67）の週数（38.5±2.4週）に比較して有意に早かった。Cytochrome P450c17α enzymeをコードするCYP17遺伝子多型がIUGRの病因に関連していることが初めて明らかとなった。

8. 妊娠中毒症の病態解析に関する研究

現在までの予備実験で、2種類のklotho遺伝子（membrane-bound formとsecreted form）発現において、どちらのタイプにおいても正常胎盤と妊娠中毒症胎盤との間にm-RNAレベルでの差はなく、どちらもsecreted formが有意に発現していることが判明した。Klotho蛋白もこれらm-RNAがコードする2種類membrane formとsecreted formの存在が確認されており、これらはさらに2種類のdomein(hKL1とhKL2)により構成されている。membrane formはhKL1とhKL2両者により、またsecreted formはhKL1のみで構成されており、膜と結合しているdomeinはhKL2である。予備実験ではhKL2が妊娠中毒症胎盤で有意に発現しており、一方でhKL1の発現は正常・妊娠中毒症胎盤においても認められなかった。免疫組織学的検討ではhKL2が妊娠中毒症胎盤syncytiotrophoblastに強い染色を認めた。

9. 新たなヒト無精子症の原因遺伝子であるヒトSYCP3遺伝子同定に関する研究

ヒトSYCP3遺伝子は減数分裂異常により無精子症を呈している不妊症患者19名中2名の患者に1塩基のみの欠失を認め、これが蛋白レベルでの機能異常を呈していることを明らかにした。

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

1) 母と子の薬物代謝の差

(1) ヒトCYPファミリー

CYPは巨大なスーパーファミリーを形成しており、アミノ酸の相同性によって、分子種名が決められている。40%以上相同性を持つものをファミリー、55%以上相同性を持つものをさらにサブ

ファミリーとしている。CYPの中でも、CYP1、CYP2、CYP3、CYP4ファミリーは生理活性物質以外にも、様々な外来異物の代謝に関与することが知られており、ダイオキシン類や多環芳香族、PCB、農薬などを代謝する。外来異物代謝CYP分子種の調節因子として、AhR (aryl hydrocarbon receptor) やPXR (pregnane X receptor; NR1I2)、CAR (constitutive androstane receptor; NR1I3)、PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) が知られているが、これらの受容体群は、ダイオキシン類やPCB、フタル酸エステルなどのリガンド受容体にもなっている。多くの環境汚染物質はこれら受容体群を活性化し、CYP各分子種の発現量に影響を与える。最近では、CYP2C9がPXRで転写制御されていることも報告された。また、外来異物だけではなく、ステロイドホルモンであるprogesteroneやandrogensがCARを抑制し、また反対にestrogensはCARを活性化することが明らかとなった。

(2) 成人肝臓、胎盤、胎児肝臓に発現するCYP

これまでの報告で、ヒト肝臓および胎盤のCYP分子種の発現パターンは異なることがわかっている。最近、Nishimuraらによって、ヒト成人肝臓、胎児肝臓、胎盤に発現する30種のCYP分子種（CYP1A1、1A2、1B1、2A6、2A7、2B6、2C8、2C9、2C18、2C19、2D6、2E1、2J2、3A4、3A5、3A7、4A11、4F2、4F3、5A1、7B1、8A1、8B1、17、26A1、27、27B1、39A1、46、51）の発現パターンが報告された。成人ヒト肝臓では、CYP2A6やCYP2E1mRNAの発現量が多い。一方、胎児では、CYP2E1のほか、CYP4A11、CYP3A7、CYP8B1やCYP51の発現が比較的多い。

(3) 妊娠期における母体肝臓の薬物代謝酵素

これまでの知見から、妊娠時の外来異物のクリアランスに寄与するのは、主に母体肝臓であることが示唆された。しかし、妊娠時には、母体肝臓におけるCYP分子種は通常の成人のCYP発現とは異なるパターンを示すことも報告されている。CYP1ファミリーの一つCYP1B1はextra hepatic

なCYP分子種で、通常、肝臓よりも血液中の発現量のほうが20%程度多い。女性の血液中でのCYP1B1発現量は男性に比べて有意に高いことも報告されているが、妊娠期間に血液中のCYP1B1mRNA発現量は変動しないことが報告されている。

CYPによる代謝の後、多くの薬物はphase II酵素による抱合を受け、水溶性を増して排泄されやすくなる。しかし、妊娠中に曝露され、生体に取り込まれた環境化学物質は、通常とは異なる速度で代謝・排泄過程を経ることが考えられる。グルクロン酸抱合酵素分子種のひとつで、bisphenol Aやnonylphenol、DESなどのxenoestrogenの代謝に関わるUGT2B1の活性は、妊娠期には非妊娠児期の10-20%減少することがラットを用いた実験から報告された。UGT2B以外にも、妊娠期には、UGT1ファミリーの代謝活性も減少することが報告されている。

4-hydroxy-2(E)-nonenal (4HNE)は、リノール酸やアラキドン酸などの ω 6系高度不飽和脂肪酸が酸化ストレスをうけることでnon-enzymaticに生成されるアルデヒドであり、activeで毒性が強い。4HNEはphase IIのグルタチオン抱合酵素のひとつGSTA4-4によって抱合を受け、解毒されることが報告されている。従って、抱合酵素GSTは妊娠期における生体の抗酸化機構に重要な因子のひとつである。実際、MnSOD (manganese superoxide dismutase)の多型とともに、GST M1が欠損する遺伝多型null type では、子宮においてoxidative stressの指標となる8-OHdGの生成量が多いことが報告されている。

妊娠期中において、多くのCYP分子種やUGT分子種の発現レベルが減少し、それらの酵素群の誘導能の低下することから、この時期の環境化学物質や薬物への曝露は、薬剤クリアランスの変化から、体外への排泄が遅れ、胎児に不可逆的な影響を与える可能性も考えられる。

2) 妊娠ラットの母体肝臓における薬物代謝能の変動

妊娠期におけるラットの母体肝臓のCYP発現量は非妊娠期に比べて有意に減少した（対照群の約70%）。しかし、CYP、特にCYP1ファミリーに電子伝達を行うcytochrome b5の発現量に変化は見られなかった。propranolol R体について、妊娠前期（妊娠15日齢まで）に、5位水酸化活性の上昇と、N脱イソプロピル化活性の減少が認められた。CYP2C12、CYP2B1、CYP2B2、CYP2E1に特異的な各抗体を用いて行ったWestern blottingの結果から、いずれの分子種も妊娠期では非妊娠期に比べて蛋白発現量が減少することが分かった。

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、multiplex PCRによる条件設定を行ったところ、GST nullやCYP2D6 deletionに関しては遺伝多型の検出が困難だった為、これらのアレルを除いた遺伝子についてwild、変異アレルのDNAを合成してスライドガラスにスポットニングし、マイクロアレイを作成した。PrimerはPCR産物が数100bp以内になるように設計し、multiplex PCRを3回に分けて行った。得られたPCR産物は、混合してスライドガラス上のオリゴDNAにハイブリダイズし、ペルオキシダーゼによって発色させ、アレルの判定を行った。

11. オンライン前処理 液体クロマトグラフ質量分析計を利用したヒト血液中有機フッ素系化合物の分析法開発

1) オンライン抽出-LC/MS法による分析条件の検討
SIMモニタリングイオンは、(m/z) : 499 (PFOS)、369 (PFOA)、498 (PFOSA)、469

(PFDA)とした。また、移動相の条件検討及びフラグメント電圧の条件検討を行い、最適分析条件を設定した。LC/MSの条件を上記のように設定した後、オンライン抽出法の検討を実施した。血漿試料に標準溶液を添加後、その回収率を求めた結果、80%以上（RSD<5.5%, n=6）と良好な結果を得た。

2) 健常人ボランティアの血液試料中の有機フッ素化合物の分析

ボランティア（合計21名、男：11名、女：10名、年齢：21～56歳）であり、職業暴露などない健常人とした。採血日は、平成15年6月末の同日に設定し、昼食前の空腹時（12時）とした。採取保存は、汚染などのない器具・保存容器（確認済）を使用することとし、採取後、直ちに血漿分離を行い、 -80°C で保存した。

本検体を用いて、有機フッ素系化合物を測定した結果を図6に示す。PFOSの検出濃度は、10.4～31.9 ng/ml（検出率100%）、PFOAは検出限界以下（0.5 ng/ml）～4.1 ng/ml（検出率71.4%）であった。また、PFOSAはすべての検体において不検出（1.0 ng/ml以下）であった。

3) LC/MS/MS法による分析条件の検討

従来、PFOS等の分析手法は、LC/タンデムMS法が利用されており、特に生体試料を分析する際に汎用されている。今後の生体試料の分析への応用も考慮し、LC/MS/MS法の検討を実施した。PFOS (m/z 499 \rightarrow 80, 99, 130)、PFOA (m/z 369 \rightarrow 119, 169, 219) 及びPFOSA (m/z 498 \rightarrow 78) が観察された。

D. 考 察

平成16年1月までに、北海道の産科病院の42病院の協力が得られ、参加妊婦人数は、2245人である。来年度末までに10,000人の妊婦が同意し、参加したと仮定して、停留精巣は70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3.5人（日本の尿道下裂発生率3.5人/1万人出生で計算・日本産婦人科医学会より）、の発生が予想

される。

近年、各国の疫学調査において、葉酸の服用により、二分脊椎を始め、様々な奇形のリスクを低減させることが報告されている。日本でも、厚生労働省が、妊娠可能な女性における葉酸の十分量の摂取を勧めており、また、栄養補助剤（サプリメント）が、コンビニエンスストアで販売されるなどの入手のしやすさが最近の特徴である。本研究では栄養補助剤を服用している妊婦が2割を占めた。葉酸については、妊娠がわかってからの服用者が多いことから、厚生労働省が推奨する、葉酸摂取の時期は妊娠前1か月から妊娠3か月であることが、未だ、周知されていない可能性がうかがわれた。

妊婦の喫煙習慣に関して、本調査では、妊娠初期も喫煙している割合は12.5%、妊娠がわかってやめた割合は、35.5%であった。Iokaらの大阪の妊婦を対象とした調査では、妊娠中に喫煙率が20.3%から3.4%に減少し、斉藤の東京の妊婦を対象とした調査では、13.9%から4.4%に減少したとの報告がある。また、田村の弘前大学医学部附属病院の妊婦を対象とした調査では、喫煙率は3.1%であった。北海道の女性の喫煙率は全国で一番高いことが報告されており、27.5%である。Ohmiらの北海道4地域（別海、中標津、標津、羅臼）の妊婦を対象に行った調査では、妊娠初期の20代妊婦の喫煙率は50.1%、30代妊婦34.7%と高率であったが、本調査でも高いことが示された。

妻の妊娠中の夫の喫煙状況については、あまり報告がないが、斉藤の調査では、妊娠前の夫の喫煙率55.2%、妊娠中53.4%であり、喫煙率は、1.8%しか低下しなかった。本調査では、妻の妊娠中も喫煙している割合が66.3%と高く、妊娠がわかってからやめた割合は、12.1%であり、夫の喫煙率は高かった。

本調査において、妊婦の血清葉酸値のほとんどが基準内にはいていた。また、喫煙群で、血清葉酸値の低下がみられた。この結果は、Werschらの報告と矛盾することなく、人種差はなく、喫煙者の血清葉酸値は低下することが示唆された。

また、葉酸値を低下させる因子として、葉酸を代謝する酵素である Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) が関与している。MTHFR 遺伝子の 677 番目の cytosine が thymine に点変異している 677TT は、還元酵素活性が低下しており、正常酵素活性のある野生型 677CC や、ヘテロ型 677CT と比較して、高ホモシステイン血症になるリスクを持つといわれている。McDonaldらは、喫煙している妊婦の葉酸値は、非喫煙者よりも低く、さらに、変異型ホモ 677TT をもつ妊婦でより低かったことを報告し、遺伝子と環境の相互作用があることを指摘している。

欧米と比較して神経管欠損の発症率が低い本邦では、今まで葉酸は十分に摂取されていたと考えられていたためか、妊婦はもとより、成人女性を対象とした血清葉酸値についての分析報告は少ない。近藤らが、愛知県の妊婦 222 人を対象とした血漿葉酸値を測定したが、平均値は 8.1 ng/ml であり、大きな差はみられなかった。一方、アメリカの 1988-1994 年の妊婦の葉酸値は、4.8 ng/ml で、今回の本調査より低値であったが、1992 年に U.S. Public Health Service (PHS) により、妊娠可能な女性（年齢 15～44 才）は、葉酸を 1 日 400 μ g とるようにと推奨し、1998 年には、Food and Drug Administration (FDA) がシリアルに葉酸を強化するように命じた。その結果、1999-2000 年の血清葉酸値は、13.0 ng/ml にまで上昇し、本調査より高く、二分脊椎の発生率は 1980 年代より減少している（ただし、南米では増加傾向）。葉酸強化を勧告しているアメリカよりも葉酸値が低いという今回の結果は、妊娠可能な女性への葉酸摂取の重要性をより強く呼びかける必要がある、ということを示唆しているのかもしれない。

E. 結 論

北海道の産科施設に通院する妊婦を対象に調査を行い、北海道における妊婦の属性について集計した。栄養補助剤（サプリメント）を服用している妊婦の割合は 2 割であった。妊娠前の妊婦の喫煙率は、38.5% であり、妊娠初期も喫煙している

割合は 12.5% と高率であった。夫の喫煙習慣については、妻の妊娠中も喫煙している割合が 66.3% であった。妊娠初期に何らかの職業性化学物質曝露をうけている妊婦は 15.0%、夫は 29.8% であった。

全妊婦の平均血清葉酸値は、7.5 ng/ml であり、非喫煙群と比較して、喫煙群の血清葉酸値は有意に低かった。今回対象とした妊婦から出生した児の転帰については、追跡中である。今後、血清葉酸値・喫煙・その他の環境要因・遺伝子多型による感受性素因と、児への影響（奇形、子宮内発育遅延、出生時体重、在胎週数など）を評価する予定である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. 岸 玲子 「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」を開始して 北産婦医会報 2003;112: 76-78
2. Kurahashi N, Murakumo M, Kakizaki H, Nonomura K, Koyanagi T, Kasai S, Sata F, Kishi R. The estimated prevalence of hypospadias in Hokkaido, Japan, J Epidemiol, in press
3. 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. Mol Hum Reprod 9(11):725-728, 2003.
4. Yamada H, Sata F, Kato EH, Saijo Y, Kataoka S, Morikawa M, Shimada S, Yamada T, Kishi R, Minakami H. A polymorphism in the CYP17 gene and

- intrauterine fetal growth restriction. *Mol Hum Reprod* 10(1):49-53, 2004.
5. Saijo Y, Sata F, Yamada H, Kondo T, Kato EH, Kishi R. Single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the interleukin-6 gene and the risk of recurrent pregnancy loss in Japanese women. *Fertil Steril* 81(2):374-378, 2004.
 6. Saijo Y, Sata F, Yamada H, Kondo T, Kato EH, Kataoka S, Shimada S, Morikawa M, Minakami H, Kishi R. Interleukin-4 gene polymorphism is not involved in the risk of recurrent pregnancy loss, submitted.
 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* 2003; 49: 84-89.
 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* 2003; 109: 21-26.
 9. Yamada H, Kato EH, Morikawa M, Shimada S, Saito H, Watari M, Minakami H, Nishihira J: Decreased serum levels of macrophage migration inhibition factor in miscarriages with normal chromosome karyotype. *Hum Reprod* 2003; 18: 616-620.
 10. Ohta K, Kobashi G, Hata A, Yamada H, Minakami H, Fujimoto S, Kondo K, Tamashiro H: Association between a variant of the glutathion S-transferase P1 (GSTP1) gene and hypertension in pregnancy in Japanese: Interaction with parity, age and genetic factors. *Semin Thromb Hemost* 2003; 29: 653-660.
 11. 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* 2003; 50: 104-112.
 12. 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* 2003; 50: 334-339.
 13. 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* 2003; 43: 72-78.
 14. Yamada H, Atsumi T, Kato EH, Shimada S, Morikawa M, Minakami H: Prevalence of diverse anti-phospholipid antibodies in women with recurrent abortion. *Fertil Steril* 2003; 80: 1276-1278.
 15. Yamada H, Morikawa M, Kato EH, Shimada S, Kobashi G, Minakami H: Preconceptional natural-killer-cell activity and percentage as predictors of biochemical pregnancy and spontaneous abortion with normal chromosome karyotype. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50: 351-354.
 16. Yamada H, Sata F, Kato EH, Saijo Y, Kataoka S, Morikawa M, Shimada S, Yamada T, Kishi R, Minakami H: A polymorphism in the CYP17 gene and intrauterine fetal growth restriction. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 49-53.
 17. Yamada H, Kato EH, Morikawa M,

- Shimada S, Ebina Y, Sakuragi N, Suzuki S, Minakami H: Anti-cardiolipin s2-glycoprotein I antibody: Is a high titer related to pregnancy complication? *Semin Thromb Hemost* 2003; 29: 639-644.
18. Yamada H, Morikawa M, Furuta I, Kato EH, Shimada S, Sata F, Kishi R, Minakami H: Circulating cytokines during early pregnancy in women with recurrent spontaneous abortion. *Hokkaido Igaku Zasshi* 2004; 79
19. Yamada H, Shimada S, Kato EH, Morikawa M, Iwabuchi K, Kishi R, Onoe K, Minakami H: Decrease in a specific killer cell immunoglobulin-like receptor on peripheral natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortion of unexplained etiology. *Am J Reprod Immunol* (2004, in press)
20. Shimada S, Kato EH, Morikawa M, Iwabuchi K, Nishida R, Kishi R, Onoe K, Minakami H, Yamada H: No difference in natural-killer or natural-killer-T cell population, but aberrant T helper population in the endometrium of women with repeated miscarriage. *Hum Reprod* (2004, in press)
21. Kobashi G, Hata A, Ohta K, Yamada H, Kato EH, Minakami H, Fujimoto S, Kondo K: A1166C variant of angiotensin II type 1 receptor gene is associated with severe hypertension in pregnancy independently of T235 variant of angiotensinogen gene. *J Hum Genet* (2004, in press)
22. Kataoka S, Sawai H, Yamada H, Kanazawa N, Koyama K, Nishimura G, Morikawa M, Sakuragi N, Minakami H: Radiographic and genetic diagnosis of sporadic hypochondroplasia early in the neonatal period. *Prenatal Diag* (2004, in press)
23. Yamada H, Sata F, Saijo Y, Kishi R, Minakami H: Genetic factors of fetal growth restriction and miscarriage. *Semin Thromb Hemost* (2004, in press)
24. 山田秀人, 森川 守, 島田茂樹: 免疫グロブリン大量療法, 今日の生殖医療, 産婦人科治療, 増刊号88(3), 101-104, 2004
25. Miyamoto T, Hasuike S, Yogev L, Maduro MR, Ishikawa M, Westphal H, Lamb DJ. Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in SYCP3. *Lancet* 362: 1714-1719. 2003
26. Konomu Saito, Hyung-Sub Kim, Noriaki Sakai, Mayumi Ishizuka, Akio Kazusaka, Shoichi Fujita. Polymorphism in diazepam metabolism in Wistar rat (in press)
27. Kim HS, Saito K, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Short period exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate regulates testosterone metabolism in testis of prepubertal rats. *Arch Toxicol.* 2003 Aug;77(8):446-51.
28. Sakamoto KQ, Nakai 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.* 2003 May;51(6):491- 500.
29. Ishizuka M, Yonemoto J, Zaha H, Tohyama C, Sone H. Perinatal exposure to low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters sex-dependent expression of hepatic CYP2C11.J *Biochem Mol Toxicol.* 2003;17(5):278-85.
30. Hiroshi Hoshino, Shoichi Fujita, Yoko Goto, Takeomi Isono, Ishinazaka Tsuyoshi, Sakurai Yasunori. Organochlorine