

20031311

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

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・発達医学講座周産期医学分野

水上 尚典

北海道大学医学部附属病院小児科

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16 (2004) 年 3 月

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・化学物質リスク研究事業「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」の平成15年度研究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16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 23-35 週の妊婦とし前向きコホートの設定し、16 年 2 月末現在 340 名の妊婦の研究協力が得られ、妊婦 299 名、新生児 283 名で、甲状腺機能マスキング結果の閲覧が可能であった。このうち母体血のダイオキシン類濃度を測定した 100 組について、甲状腺機能との関連を検討した。1,2,3,7,8-PeCDD、1,2,3,7,8,9-HxCDD が新生児 FT4 と正の関連が認められ、2,2',3,4,4',5,5'-HpCB(#180)、Di-ortho PCB (#180、#170)、PCDFs-TEQ、Total dioxin-TEQ が新生児 TSH と負の相関を認めた。妊婦 TSH、FT4 値と母体血中のダイオキシン類濃度の関連はなかった。母体血中におけるダイオキシン濃度及び環境要因と生後 6 ヶ月での児の神経発達との関連を検討した。その結果、対象者 87 名において、環境要因等と 6 ヶ月での神経発達との関連では、検査実施時の児の年齢が MDI、PDI と負の相関、在胎週数が PDI と正の相関が見られた。また、母体血中ダイオキシン類濃度と 6 ヶ月での神経発達と有意な関連は見られなかった。しかし、更に対象数を増やすほか、継続した評価の必要性が示唆された。

妊婦の喫煙が胎児発育へ及ぼす影響について遺伝子多型を含めて検討した。妊婦 242 名中、妊娠判明時に喫煙していたものは 97 名（40.1%）であり、うち 55 名（22.7%）は妊娠初期で喫煙を止めたが、残り 42 名（17.4%）は妊娠後期にも喫煙を継続していた。妊娠判明時に喫煙していなかった者を「非喫煙群」、妊娠後期においても喫煙を継続していた者を「喫煙群」とすると、喫煙群では非喫煙群に比べて新生児平均体重では非喫煙群の $3082 \pm 391\text{g}$ に対して $2950 \pm 321\text{g}$ で 132g (SE, 66g) の減少、また、新生児平均身長では非喫煙群の $48.2 \pm 1.7\text{cm}$ に対して $47.6 \pm 1.6\text{cm}$ と 0.6cm (SE, 0.3cm) 減少がみられ有意な差があった ($p < 0.05$)。さらに、両群をシトクロム P450 (CYP) 1A1 遺伝子 *Msp I* 多型およびグルタチオン転移酵素 (GST) 遺伝子多型によって分類し検討すると、CYP1A1 遺伝子 *Msp I* 多型では新生児平均体重が野生型ホモ接合の $3140 \pm 342\text{g}$ に比べて喫煙群の変異型ヘテロ接合とホモ接合を併せた群では $2859 \pm 314\text{g}$ と 281g (SE, 109g) 少なくなり、有意な差がみられた ($p < 0.05$)。遺伝子型で分類すると新生児平均体重では喫煙習慣と遺伝子型による関連性が認められ、新生児の体重減少には母親の喫煙習慣と遺伝子型の相互作用が関与していることが示唆された。

Bayley Scales of Infant Development-II 「ベイリー乳幼児発達検査-第2版」(BSID-II)を翻訳し、6 ヶ月児に実施した。また、同時に本邦で標準化されている日本版デンバー式発達スクリーニング検査 (JDDST) の項目についても評価を行い、BSID-II との関連性を検討した。BSID-II の得点は、米国での標準値よりも MENTAL、MOTOR とともに平均点で 10point 低く、男児・女児共に MENTAL よ

りも MOTOR の得点が低かった。BRS（行動評価指標）で問題のある児は運動面の検査課題の遂行に影響を及ぼしている可能性が示唆された。また、BSID-II と JDDST との関連から、BSID-II の MOTOR では、発達の遅れを過剰に評価してしまう可能性が示唆された。

新生児マススクリーニングにて甲状腺機能低下症が疑われ、北大小児科を受診した、新生児 18 例を対象にした。全例血清総ヨード、3 例で尿中ヨードを測定し、新生児ヨード濃度と甲状腺機能低下症との関連について検討した。18 症例の生後 1 年での診断は、1 例が一過性高 TSH 血症、17 例は先天性甲状腺機能低下症であった。血清ヨード平均値は $11.4(3.4\sim 57)\mu\text{g/dl}$ であった。2 例で血清ヨードが高く（1 例は $57\mu\text{g/dl}$ 、1 例は $32\mu\text{g/dl}$ ）、ヨード過剰の関与が疑われた。妊娠中のヨード過剰摂取によると思われる新生児甲状腺機能低下症を同定した。2 例とも 1 才時点で甲状腺剤の投与が必要であった。

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をした。本年度は、ヒト Th1/Th2 バランス診断用 DNA アレイを作製して、迅速かつ客観的に免疫バランスを評価することを目的とした。

新生児 7 人から $5.7\sim 17.5$ （中央値 10.9 ）g の胎便が採取可能であった。これら胎便の脂肪濃度は $15.3\sim 39.9$ （ 30.4 ）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 $1.4\sim 9.8$ （ 3.8 ）、 $0.7\sim 6.2$ （ 3.7 ）、 $2.1\sim 16.0$ （ 7.5 ）pg-TEQ/g-fat であった。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を評価することを本研究の目的とした。今年度は採集したサンプルの中で、化学分析を行う母体血サンプルについて、CYP1 ファミリーの代謝活性の測定および mRNA 発現量の定量を行った。また、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、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完成した。

有機フッ素系化合物の次世代への影響が懸念される。その一方で、これら化合物のモニタリング評価を行う上で、分析手法の確立や精度評価を実施しなければならないそこで、本研究では、分析手法に対して、十分に検討した後、最もリスク評価が望まれる有機フッ素化合物のモニタリング評価を実施した。

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 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 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 助教授

研究協力者

西條 泰明、加藤 静恵、佐々木成子

鶴野安希子、中島そのみ、近藤 朋子

天野 史江、西脇 洋子、西山さやか

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・発達医学講座産科・生殖医学

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、伊藤 里恵、

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、

原田 敦子

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山児療育センター
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 勝門

蛭名 紀子、坂本 塁、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

斉藤 貢一

埼玉県衛生研究所

飯田 隆雄、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

中村 裕二、柳谷 聡子

札幌医科大学大学院保健医療学研究科
感覚統合障害学分野

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っとも 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23～35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、1歳6ヶ月時に質問紙により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について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、産じょ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するための sensory test を6ヶ月、18ヶ月時に実施す

る。また、1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ピネー知能検査、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6ヶ月、18ヶ月に運動・感覚面の発達状況に関するアンケート調査と、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) を実施する。また、これについても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)、遊離サイ

ロキシシン (FT4)、抗サイログロブリン抗体 (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、臍帯血の IgE 値への影響と、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曝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び新生児甲状腺マスキング結果を閲覧に同意の得られ、衛生研究所からの回答が得られた妊婦299名について FreeT4、TSH、抗マイクロソーム抗体、抗サイログロブリン抗体を新生児名283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～

① 「BSID-II を用いた小児神経発達評価の試み」

本調査チームが翻訳した BSID-II を用い、6~7ヶ月時に児に対し実施する (精神発達 (MENTAL)、運動発達 (MOTOR)、行動面 (BRS) の3つの尺度で構成)。また、BSID-II と同時に JDDST を実施する。

② 内分泌化学物質と生後6ヶ月における神経発達との関連について

分析対象者は、母体血中ダイオキシン類濃度と小児神経発達評価の終了した対象者のうち、①在胎週数が37週末満の者、②妊娠中の重度の病気を有する者や妊娠中毒症などの合併症が重症である者、③1分後の Apgar-score が7点未満の者、④児の先天異常や重度な病気を有する者、を対象から除外し、

単胎である者とした。

1.4) 妊婦の喫煙に関連する遺伝子多型と次世代影響

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格・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い、CYP1A1 遺伝子 Msp I 多型および GSTT1, GSTM1 遺伝子多型を PCR-RFLP 法により解析した。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た。

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. 先天性甲状腺機能低下症とヨード過剰の実態

生後10-14日までの新生児マススクリーニングにて甲状腺機能低下症が疑われ、当院小児科受診した、新生児18例を対象にした。全例血清総ヨード、可能であった3例で尿中ヨードを測定し、新生児ヨード濃度と甲状腺機能低下症との関連について検討した。

3. Th1/Th2 バランスを客観的に評価する方法の確立

健常人 CD4+CD62L+CD45RA+ナイーブ T 細胞を分取し、5g/ml 固相化抗 CD3 抗体(PharMingen) 処理し、さらに抗 CD28 抗体を加え Th1/Th2 それぞれに条件で誘導した。誘導した Th1 および Th2 細胞は細胞内染色を行い、それぞれについて細胞内分泌型の IL-4(PharMingen) と IFN- γ (PharMingen)産生を確認した。Th1 および Th2 細胞から、ISGEN を用いた AGPC 法により total

RNA を抽出して、Th1/Th2 特異的に発現している遺伝子をさらに選別・追加するために Human cDNA アレイフィルター (TOYOBO Immunology Array Filter) にて比較分析を行い、差があった遺伝子について RT-PCR 法を用いて再度確認した。ヒト Th1 および Th2 に対して、特異的に発現差があった遺伝子についてナイロン膜にスポットしフィルターを作成した。

4. 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=5) および哺乳前の新生児期胎便 (n=7) 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。

5. P450 をバイオマーカーとした曝露影響評価 1) 全血液画分における CYP1A 依存代謝活性

ダイオキシン類や多環芳香族などの環境化学物質の曝露によって CYP1 ファミリーの発現が上昇することが知られている。血液中の CYP1 ファミリーが環境化学物質への曝露の指標となる可能性が考えられる。CYP1A1 および CYP1B1 依存の代謝にはエトキシレゾルフィン O 脱エチル化 (EROD)、エトキシクマリン O 脱エチル化があげられる。EROD 活性は代謝物レゾルフィンの蛍光を検出することで測定することができる (励起 550nm、蛍光 590nm)。そこで、全血液画分における EROD 活性について測定した。最近、CYP1A1 および CYP1B1 の新規発光基質が報告された。Luciferin6'-chloroethylether は CYP1A1 および CYP1B1 によってルシフェリンに変換され、その代謝物ルシフェリンをルシフェラーゼで測定することで CYP1A1 および CYP1B1 依存の代謝活性を検出することができる。そこで、この基質についても全血液画分に

おける代謝活性について、測定した。

2) real time RT-PCR による血液 CYP1A1 発現測定

ABI7700 を用いて、SYBR Green による real-time RT-PCR を行い、CYP1A1 mRNA 発現量を測定した。母体血 25 サンプルから ISOGEN によって total RNA を抽出し、oligo dT プライマーを用いて RT 反応を行い cDNA を合成した。cDNA を鋳型として ABI7700 による real-time PCR を行った。

内在性コントロールとして GAPDH を用いた。

3) 薬物代謝酵素の遺伝的多型解析方法の新規開発

薬物代謝酵素に存在する遺伝的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。

6. 有機フッ素化合物（perfluorooctane sulfonate : PFOS) の分析

血液試料（血清）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に通し測定用試料とした。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）に導入した。検出には、ESI-MS による SIM ネガティブモードで測定を実施した。

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 consent 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 consent 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 23-35 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 16 年 2 月末現在 1193 名の妊婦に参加を呼びかけ、340 名の同意者を得て（参加同意率 28.4%）、これら妊婦から調査票の回収と採血を施行した。このうち 4 名が途中脱落となっている。1 名は切迫早産で入院後転院、他の 3 名はパートナーの同意が得られず脱落となった。また、16 年 2 月末までの分娩者は 302 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 299 名、新生児 288 名につき結果の回答が得られた。

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 18、36 カ月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

100 名の妊婦で PCB ダイオキシン類の測定を施行した。測定した PCB、ダイオキシン類濃度を指数変換した値と甲状腺機能、指数変換した妊婦、新生児 FT4、TSH 値とが両側 5%有意水準で有意な相関

を呈するものは1,2,3,7,8-PeCDD,1,2,3,7,8,9-HxCDDが新生児 FT4 と正の相関が認められ、2,2',3,4,4',5,5'-HpCB(#180)、Di-ortho PCB (#180, #170)、T PCDFs-I-TEQ、Total I-TEQが新生児 TSH と負の相関を呈する。妊婦 TSH,FT4 値と母体血中のダイオキシン類濃度の相関はなかった。

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～

①「BSID-IIを用いた小児神経発達評価の試み」

対象数は124名、男57名、女67名であった。平均日齢は201.9日であった。全対象児群におけるMDIは平均91.0(SD 5.5)、PDIは平均86.7(SD10.5)で、PDIよりもMDIの方が高いが、両指標とも標準値(平均値100)よりも低い値となっていた。MDIとPDIとの関連では全対象児群($r=0.55$, $p<0.01$)、6ヶ月群($r=0.51$, $p<0.01$)、7ヶ月児($r=0.46$, $p<0.05$)において有意な相関が見られた。検査実施年齢とMDI、PDIのそれぞれの間における関連については、全対象児群のMDI($r=-0.2$, $p<0.05$)、PDI($r=-0.22$, $p<0.05$)で有意に負の相関が見られた。7ヶ月群ではPDI($r=0.45$, $p<0.05$)で有意に負の相関が見られた。BRS Total classificationとMENTAL及びMOTORのclassificationとの関連では、BRSのtotalが不適正または疑問と判定された9名全員、MOTORが軽度の遅れ以下であった。MDI及びPDIとBRS total及び各factorのpercentileとの関連について、ピアソンの積率相関係数の検定を行った。その結果、MDI、PDIとBRS totalおよび各factorにおいて、1%水準で有意な相関が見られた。JDDSTからみたBSID-II・MDIの妥当性は4分表での分析の結果、真陽性(JDDSTで“疑問”、BSID-IIで“遅れ”と判断された児)が0名(0%)であった。また、真陰性(JDDST、BSID-IIともに“正常”と判断された児)は83名(91.2%)であった。JDDSTからみたBSID-II・PDIの妥当性は4分表での分析の結果、真陽性(JDDSTで“疑問”、BSID-IIで“遅れ”と判断された児)が5名(100%)であった。また、真陰性(JDDST、BSID-

IIともに“正常”と判断された児)は61名(67.0%)であった。

②内分泌化学物質と生後6ヶ月における神経発達との関連について

分析対象者は87名であった。BSID-IIのMDIは平均91.0、PD)は平均88.2で、PDIの方が低い得点であった。

検査実施時の児の年齢とMDI、PDIとの間に5%水準で有意な負の相関が見られた。また、在胎週数とPDIとの間に、1%水準で有意な正の相関が見られた。

母体血中ダイオキシン類濃度はすべて自然対数に変換し、検査実施時の児の年齢と在胎週数の2因子で調整し、ダイオキシン類濃度とBSIDのMDI・PDIとの関連性を多変量解析により分析した。その結果、いずれの測定物質と6ヶ月での神経発達との間に有意な関連は見られなかった。しかし、MDIに比べPDIの方が標準化係数がマイナスで、濃度が増えるほどBSIDの得点が低くなるという傾向にあり、その中でもWHO-98の7つの測定項目のうちの6つでマイナスの係数となっていた。

1.4) 妊婦の喫煙に関連する遺伝子多型と次世代影響

妊婦242名中、妊娠判明時に喫煙していたものは97名(40.1%)であり、うち55名(22.7%)は妊娠初期で喫煙を止めたが、残り42名(17.4%)は妊娠後期にも喫煙を継続していた。妊娠判明時に喫煙していなかった者を「非喫煙群」、妊娠後期においても喫煙を継続していた者を「喫煙群」とすると、喫煙群では非喫煙群に比べて新生児平均体重では非喫煙群の $3082\pm 391\text{g}$ に対して $2950\pm 321\text{g}$ で 132g (SE, 66g)の減少、また、新生児平均身長では非喫煙群の $48.2\pm 1.7\text{cm}$ に対して $47.6\pm 1.6\text{cm}$ と 0.6cm (SE, 0.3cm)減少がみられ有意な差があった($p<0.05$)。両群をシトクロムP450(CYP)1A1遺伝子Msp I多型およびグルタチオン転移酵素(GST)遺伝子多型によって分類し検討すると、CYP1A1遺伝子Msp I多型では新生児平均体重が野生型ホモ接合の $3140\pm 342\text{g}$ に比べて喫煙群の変

異型ヘテロ接合とホモ接合を併せた群では 2859 ±314g と 281g (SE, 109g) 少なくなり、有意な差がみられた (p<0.05)。

1.5) 水銀曝露と小児発達

平成 16 年 2 月末までに 257 名の妊婦から分娩後 5 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. 先天性甲状腺機能低下症とヨード過剰の実態

18 症例の生後 1 年での診断は、1 例が一過性高 TSH 血症、17 例は先天性甲状腺機能低下症であった。血清ヨード平均値は 11.4(3.4~57) µg/dl であった。1 例で血清ヨードが高く(1 例は 57µg/dl)、ヨード過剰の関与が疑われた。児の血清ヨードが 57 µg/dl とかなり高値であった症例では 1 才時点での甲状腺剤の投与も 50 µg と少なくはなく、永続的投与が必要と思われた。妊娠中、母親は健康によいと思ひ、海藻類をほぼ毎日摂取していたことが判明した。もう 1 例は 32 µg/dl と約 2 倍上昇していた。1 才時点での甲状腺剤の投与量は 30 µg であり、治療を継続中である。尿中ヨードは測定しえた症例では 27~57 µg/dl であり、高値の症例はなかった。

3. Th1/Th2 バランスを客観的に評価する方法の

確立

マウスにおいて作成した cDNA アレイフィルターにて Th1/Th2 バランスの診断が可能である事が確認できたので、ヒトへ診断応用するためにヒト専用のフィルターを作成した。この時、市販の TOYOBO フィルター(Immunology)を用いて、Th1 及び Th2 特異的に発現している遺伝子をさらに選別し、RT-PCR によって確認した。その結果、Th1、Th2 合わせて 19 個の特異的に発現している遺伝子

を追加することができ、最終的に 76 の遺伝子を作成フィルターに追加することができた。次に、マウスと同様にヒト末梢血のナイーブ T 細胞より Th1 および Th2 細胞を誘導し、作成したフィルターを用いて解析したところ、これも Th1/Th2 特異的に発現している事をフィルターにて確認できた。以上より、ヒト Th1/Th2 バランス診断に応用可能なヒト DNA アレイが作製できた。

4. 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

新生児 7 人から 5.7-17.5 (中央値 10.9) 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 (30.4) 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 1.4-9.8 (3.8), 0.7-6.2 (3.7), 2.1-16.0 (7.5) pg-TEQ/g-fat であった。このうち新生児 5 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 (3.3), 1.5-13 (4.3), 2.6-24 (10.5) pg-TEQ/g-fat であった。胎便と臍帯血が採取された 5 組の比較において、胎便中の総ダイオキシン類濃度は、臍帯血中濃度の 61.7-145%を示した。Wilcoxon 符号付順位検定で有意な差は認められなかった。胎便中総ダイオキシン類濃度と新生児 FT4 値 (n=7) との間に Spearman 順位相関で有意差 (p=0.036) が認められ、回帰分析では正の相関 (p=0.96, r2=0.46) が観察された。しかし、母体 TSH, 母体 FT4, 新生児 TSH 濃度との関連は認められなかった。

5. P450 をバイオマーカーとした曝露影響評価

1) 全血液画分における CYP1A 依存代謝活性

反応時間 0 から 90 分間において、全血液を用いた反応系ではまったく EROD 活性を検出できなかった。

また、母体血における CYP1A1 および CYP1B1 の新たな発光基質である Luciferin6' chloroethylether 代謝活性は、反応時間を 0-90 分まで変えて測定したところ、反応 90 分においてわ

ずかな活性が検出された。しかし、母体血においては再構成系における CYP1A1、CYP1B1（0.5–1pmol）依存の代謝活性や、無処置ラット肝ミクロソームにおける活性の約 2 万–20 万分の 1 程度であった。また、約 20 の血液サンプルの中では、代謝活性が検出できないサンプルもあった。

2) real time RT-PCR による血液 CYP1A1 発現測定

今回 mRNA 量を定量したサンプルのうち、ダイオキシン類の分析を行ったものは 13 サンプルであった。TEQ 値と CYP1A1 発現量との間に顕著な相関は得られなかった ($R^2=0.0272$)。

3) 薬物代謝酵素の遺伝的多型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。

CYP1A1 2455A>G、CYP1B1 355G>355T、CYP1B1 432C>G について、今回のアレイで変異アレルを判定することができた。その他、CYP2C19 の 636 番目塩基 G>A と 681G>A、CYP1A2、NAT2、CYP2A6 の 1412T>C、GSTP の A>G などについて、スポットの染色も良く判定が容易であった。

6. 有機フッ素化合物（perfluorooctane sulfonate :PFOS)の分析—母体血及びさい帯血中 PFOS の関連性

15 名の妊婦における母体血とさい帯血との相関性を検討したところ、 $r^2=0.8759$ となった。

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。

ダイオキシン類濃度と甲状腺機能の検討では、胎生期のダイオキシン暴露が、児の甲状腺機能に抑制的に作用するのではないかと危惧されているが、今回の検討では逆の相関が見られた。今後、例数を重ねて検討する必要がある。

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。今回の調査における BSID-II の得点は、米国での標準値よりも MENTAL、MOTOR とともに平均点で 10point 低く、男児・女児共に MENTAL よりも MOTOR の得点が低かった。BRS（行動評価指標）で問題のある児は運動面の検査課題の遂行に影響を及ぼしている可能性が示唆された。また、BSID-II と JDDST との関連から、BSID-II の MOTOR では、発達の遅れを過剰に評価してしまう可能性が示唆された。

内分泌化学物質と生後 6 ヶ月における神経発達との関連について、今回の 87 名の結果から関連が見られたのは、児の検査時年齢と MDI、PDI との負の関連性と、在胎週数と PDI との関連のみであった。児の検査時年齢が高くなれば、MDI、PDI の得点が低くなることについては、対象に実施する BSID-II の項目及び採点基準が 6 ヶ月 15 日を境に変化する

ため、得点が低く採点されてしまったこと、また、6ヶ月15日以降の児がそれ以前の児に比べより低い得点を示した者が多かったと2つの理由が考えられるが8)、今後、縦断的な調査を行い検討していく必要がある。また、ダイオキシン類と6ヶ月時の神経発達の間には関連性は見られなかったが、更に対象数を増やし、多変量解析にて関連性を検討していく予定である。

遺伝子多型による喫煙曝露への感受性の違いが胎児生体に及ぼす影響について検証するため、妊婦の喫煙とCYP1A1遺伝子Msp I多型およびGSTT1、GSTM1遺伝子多型との関連性を検討した。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および身長が減少がみられ、さらに遺伝子型で分類するとCYP1A1遺伝子では新生児平均体重において喫煙習慣と遺伝子型による関連性が認められたことから、新生児の体重減少には母親の喫煙習慣と遺伝子型の相互作用が関与していることが示唆された。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。

妊娠中のヨード過剰摂取による影響も考えられる先天性甲状腺機能低下症を報告した。最近の報告では、多くの食品にヨードが含まれていることが報告されている。今後さらに母乳のヨードも測定し、ヨード過剰の実態を明らかにする必要がある。さらに、妊娠中の食品についての詳細な調査が必要となってくると考えられる。

マウスとヒトTh1, Th2特異的遺伝子の中には、発現パターンが全く逆のものが存在した。この事実は、マウス評価系のみを用いて環境化学物質のヒト免疫バランスに対する評価はできない可能性もあることを示唆している。

ダイオキシン・コプラナPCBが胎便中に検出されることが初めて明らかとなった。胎便の総ダイオキシン類濃度と臍帯血濃度との間に関連を認めなかった。また、測定準備にあたり、胎便から脂肪を抽出する効率が良くないことを経験した。例数が少な

いが、胎便中総ダイオキシン類濃度と新生児FT4値との間に正の相関が認められたことから、胎内ダイオキシン類曝露は、新生児甲状腺機能亢進と関連する可能性があると考えられる。

P450をバイオマーカーとした曝露影響評価では、CYP1ファミリーの血液サンプルについて、全血では活性の測定が難しかった。Real-time RT-PCRによる母体血CYP1A1 mRNA発現レベルの定量では、個体差が大きい上に、CYP1A1 mRNAの発現量は非常に低かった。今回のサンプルでは、ダイオキシン類とTEQ値との相関は得られなかったが、CYP1A1発現量に大きな個体差が見られることから、今後、サンプル数を増やして検討する必要がある。一方、ヒトCYPのSNPsなど遺伝多型解析において、multiplex PCR法を用いたマイクロアレイ解析法は、従来のPCR-RFLP法よりも簡便に多くの変異アレルの遺伝多形検出を行うことができる可能性がある。しかし、マイクロアレイ法による判定では、PCRの正確性やハイブリダイゼーション上の都合から、極端に大きなPCR産物(数10kbpなど)を用いた実験は難しい。特に、CYP2D6 deletion、GST nullなどのdeletionアレルは、数イントロン、エクソンにまたがる繰り返し配列が原因で起こっていると考えられる為、各アレルに特異的なPCR産物の作成が難しかった。しかし、今回の遺伝子リストに載せたその他の遺伝子に関しては容易にその変異を検出することができた。

有機フッ素系化合物の研究結果から、日本人の妊婦において、PFOSの汚染が確認された。その検出レベルは、米国と比較してやや低い傾向が見られた。それに加え、さい帯血では、母体血と比較して約0.3倍の濃度レベルであった。また、その決定係数は、 $r^2 = 0.8759$ と非常に高いが、胎盤による影響を受け、その多くはさい帯血を通して胎児に移行し難い可能性がある。しかし、動物実験の結果の胎児移行を反映するものとなった。

今後も、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、ダイオキシン、PCB、PFOSなどの内分泌攪乱物質の精密な測定を続け、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を行った。100例のPCB・ダイオキシン類の測定をおこなったが、十分な統計解析のためにはさらに例数を重ねることが必要であり、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

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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. *Fertil Steril*, 81(2): 374-378, 2004
- 2) 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
- 3) 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.

- 4) Yamamoto, S., Tsuji, T., Matsuzaki, J., Zhange, Y., Togashi, Y., Sakikawa, K., Sawada, K., Takeshima, T., Koike, T., Nishimura, T. Unexpected Role of TNF- α in Graft Versus Host Reaction (GVHR): Donor-Derived TNF- α Suppresses GVHR via Inhibition of IFN- γ dependent Donor Type 1 Immunity. *Int. Immunol.* 2004 In press.
- 5) Fujimura, T., Chamoto, K., Tsuji, T., Sato, T., Yokouchi, H., Aiba, S., Tagami, Y., Tanaka, JI, Imamura, M., Togashi, Y., Koda, T., Nishimura, T. Generation of Leukemia-Specific T-Helper Type 1 Cells Applicable To Human Leukemia Cell-Therapy. *Immunol. Letters*, 2004. in press.
- 6) Li, J., Koda, T., Yamaguchi, A., Yamamoto, S., Sato, T., Togashi, Y., Nishimura, T. Identification of Th1- and Th2-specific Genes by Microarray Analysis. *Biomedical Res.* 24(6):299-307, Dec., 2003.
- 7) Sato, T., Saito, R., Jinushi, T., Tsuji, T., Matsuzaki, J., Koda, T., Nishimura, S., Takeshima, H., Nishimura, T., IFN-gamma-induced SOCS-1 regulates STAT6-dependent eotaxin production triggered by IL-4 and TNF-alpha. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Feb 6; 314(2): 468-75.
- 8) Gyobu, H., Tsuji, T., Suzuki, Y., Ohkuri, T., Chamoto, K., Kuroki, M., Miyoshi, H., Kawarada, Y., Katoh, H., Takeshima, T., Nishimura, T., Generation and targeting of human tumor-specific Tc1 and Th1 cells transduced with a lentivirus containing a chimeric immunoglobulin T cell receptor. *Cancer Res.* 2003 Feb 15;64(2) :1490-1495, 2003.
- 9) Chamoto, K., Tsuji, T., Funamoto, H., Kosaka, A., Matsuzaki, J., Sato, T., Abe, H., Fujio, K.,

- Yamamoto, K., Kitamura, T., Takeshima, T., Togashi, Y., and Nishimura, T., Potentiation of Tumor Eradication by Adoptive Immunotherapy with T-cell Receptor Gene-Transduced T-Helper Type 1 Cells. *Cancer Res.* 2004 Jan 1; 64(1): 386-390.
- 10) Chamoto, K., Kosaka, A., Tsuji, T., Matsuzaki, J., Sato, T., Takeshima, T., Iwakabe, K., Togashi, Y., Koda, T. and Nishimura, T., Critical Role of Th1/Tc1 Circuit for the Generation of Tumor-specific CTL during Tumor Eradication in vivo by Th1-cell Therapy, *Cancer Science*, 94(10), 924-928, Oct. 2003.
- 11) Matsuzaki, J., Tsuji, T., Chamoto, K., Takeshima, T., Sando, F., Togashi, Y. and Nishimura, T., Successful elimination of memory-type CD8+ T cell subsets by the administration of anti-Gr-1 monoclonal antibody in vivo, *Cellular Immunol.*, 224(2) 98-105, 2003.
- 12) Sato, M., Chamoto, K., and Nishimura, T., A novel tumorigenic cell therapy using bone marrow-derived dendritic cell type 1 and antigen-specific T helper type 1 cells, *Int. Immunol.*, 15(7), 837-843, Jul. 2003.
- 13) Sasaki, K., Tsuji, T., Jinushi, T., Matsuzaki, J., Sato, T., Chamoto, K., Togashi, Y., Koda, T., and Nishimura, T., Differential regulation of VLA-2 expression on Th1 and Th2 cells: a novel marker for the classification of Th subsets. *Int Immunol.* 2003 Jun; 15(6): 701-10.
- 14) Tsuji, T., Chamoto, K., Funamoto, H., Kosaka, A., Matsuzaki, J., Abe, H., Fujio, K., Yamamoto, K., Kitamura, T., Togashi, Y., Koda, T. and Nishimura, T., An efficient methods to prepare T cell receptor genetransduced cytotoxic T lymphocytes type 1 applicable to tumor gene cell-therapy. *Cancer Science*, 94(4), 389-393, Apr. 30, 2003.
- 15) Sekimoto, M., Tsuji, T., Matsuzaki, J., Chamoto, K., Koda, T., Nemoto, K., Degawa, M., Nishimura, S. and Nishimura, T., Functional expression of TrkC gene encoding a high affinity receptor for NT-3 in antigen-specific T helper-type 2(Th2) cells. *Immunology letters*, 88, 221-226, 2003.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) 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.

- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) Yamada H, Kato EH, Morikawa M, Shimada S, Ebina Y, Sakuragi N, Suzuki S, Minakami H: Anti-cardiolipin β 2-glycoprotein I antibody: Is a high titer related to pregnancy complication? *Semin Thromb Hemost* 2003; 29: 639-644.
- 25) 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.
- 26) 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; 24: 45-49.
- 27) 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
- 28) Yamada H, Shimada S, Kato EH, Morikawa M, Iwabuchi K, Kishi R, Onoé 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)
- 29) Shimada S, Kato EH, Morikawa M, Iwabuchi K, Nishida R, Kishi R, Onoé 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)
- 30) 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)
- 31) Yamada H, Sata F, Saijo Y, Kishi R, Minakami H: Genetic factors of fetal growth restriction and miscarriage. *Semin Thromb Hemost* (2004, in press)
- 32) 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
- 33) Konomu Saito, Hyung-Sub Kim, Noriaki Sakai, Mayumi Ishizuka, Akio Kazusaka, Shoichi Fujita. Polymorphism in diazepam metabolism in Wistar rat (in press)
- 34) 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.

- 35) 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.
- 36) 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.
- 37) Hiroshi Hoshino, Shoichi Fujita, Yoko Goto, Takeomi Isono, Ishinazaka Tsuyoshi, Sakurai Yasunori. Organochlorine compound accumulation in Steller sea lion *Eumetopias jubatus* migrating along the coast of Hokkaido in northern Japan. *Jpn J Toxicol*. 2003;6(1):1-10
2. 学会発表
- 1) 近藤朋子、佐々木成子、加藤静恵、中島そのみ、鶴野安希子、西條泰明、佐田文宏、岸玲子：「妊婦の喫煙による胎児発育への影響と遺伝子多型の関連」、第74回日本衛生学会総会、東京（2004.3.24-27）
- 2) 加藤静恵、佐々木成子、中島そのみ、鶴野安希子、西條泰明、佐田文宏、金上宣夫、藤田晃三、飯田隆雄、岸玲子：「妊婦甲状腺機能の新生児への影響とダイオキシン類暴露との関連」、第74回日本衛生学会総会、東京（2004.3.24-27）
- 3) 西條泰明、加藤静恵、佐々木成子、中島そのみ、鶴野安希子、佐田文宏、岸玲子、金上宣夫、藤田晃三、飯田隆雄：「胎児期の化学物質暴露による次世代影響に関する前向きコホート研究—全体計画に関して」、第74回日本衛生学会総会、東京（2004.3.24-27）
- 4) 第38回日本作業療法学会（平成16年6月）
- ①ベイリー乳幼児発達検査2による6ヶ月児への発達調査—その1～精神発達、運動発達の結果について～
- ②ベイリー乳幼児発達検査2による6ヶ月児への発達調査—その2～行動面の評価について～
- ③ベイリー乳幼児発達検査2による6ヶ月児への発達調査—その3～デンバーから見た妥当性の検討～
- 5) 西村孝司：「癌のTh1細胞治療におけるDC/Th細胞相互作用の重要性」、第14回日本樹状細胞研究会・シンポジウム“樹状細胞を用いた細胞免疫療法のシンポ”、福岡市（西鉄グランドホテル）、2003年6月6日
- 6) 西村孝司：「Development of a novel tumor-cell therapy by adoptive transfer with Th1 cells」、第23回札幌がんセミナー国際シンポジウム、札幌市（ロイトン）、2003年7月31日
- 7) 西村孝司：「免疫バランス制御における樹状細胞サブセットの重要性」、日本臨床免疫学会、東京、2003年10月10日
- 8) 西村孝司：「The critical role of DC1/Th1 cell-cell interaction for the initiation of antitumor immunity in vivo（生体内抗腫瘍免疫誘導におけるDC1/Th1細胞相互作用の重要性）」、the 34th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund “TUMOUR VACCINE” (tentative), 11/11-13 (2003)
- 9) 西村孝司：「免疫バランスの制御と疾患」、第33回日本免疫学会総会・学術集会、2003年12月8-10日
- 10) Yamada H, Sata F, Kato EH, Saijo Y, Kataoka S, Morikawa M, Shimada S, Kishi R, Minakami H: A polymorphism in the CYP17 gene and fetal growth restriction. 6th World Congress of Perinatal Medicine, (September 13-16, Osaka) 2003

- 11) 山田秀人：自己免疫疾患合併妊娠の管理，北海道産婦人科医学会学術研修会，学術研修講演（札幌，6月14日）2003年
- 12) 山田秀人，佐田文宏，西條泰明，平山恵美，島田茂樹，森川 守，岸 玲子，水上尚典：習慣流産と遺伝子多型：GSTM1, CYP17, IL-6, 第18回日本生殖免疫学会，（山口，11月28-29日）2003年
- 13) 第135回日本獣医学会（平成15年春）
 - ① Nakano et al. 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 Saji et al. 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 Ibrahim et al. Down-regulations of expressions of PPAR-alpha and AhR target genes by AhR and PPAR-alpha ligands, respectively
- 14) 第30回 日本トキシコロジー学会
 - ① Nakano et al. 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 Sasaki et al. 抗菌剤フラゾリドンとその代謝物が肝薬物代謝酵素系に与える影響
- 15) 環境ホルモン学会 第6回研究発表会
 - ① Joji Tsunada, Mayumi Ishizuka, Akio Kazusaka and Shoichi Fujit. Transient neonatal exposure of brain to testosterone surge initiates amplification of testosterone production in astrocytes.
 - ② Naosuke Saji, Mayumi Ishizuka, Akio Kazusaka, Shoichi Fujita. Biomonitoring of the Harbor Seawater Environment in Hokkaido Coast with Induced Hepatic Cytochrome P450 of Minnow
- 16) Annual Meeting of Society of Environmental Toxicology and Chemistry in New Zealand
 - ① Hiroshi Hoshino, Shoichi Fujita, Yoko Goto, Takeomi Isono, Tsuyoshi Ishinazaka, Vladimir N. Burkanov, Yasuhiro Sakurai. Organochlorine pollutions in Steller SeaLions Eumetopias Jubatus living in the far eastern waters
- ② Hyung-Sub Kim, Mayumi Ishizuka, Akio Kazusaka, Shoichi Fujita. Short period exposure of di-(2-ethylhexyl) phthalate regulates testosterone and arachidonic acid metabolisms in testis of prepubertal rats
- 17) バイオアッセイ研究会・環境毒性学会
 - ① 佐治尚介，石塚真由美，数坂昭夫，藤田正一 ウグイを用いた小樽，石狩，美国港周辺の環境汚染の評価
 - ② 星野広志，藤田正一，後藤陽子，磯野岳臣，石名坂豪，Vladimir N. Burkanov, 桜井泰憲. Organochlorine pollutions in Steller SeaLions Eumetopias Jubatus living in the far eastern waters（極東海域に棲息するトドにおける有機塩素系化合物汚染）
 - ③ Hyung-Sub Kim, Mayumi Ishizuka, Akio Kazusaka, Shoichi Fujita. Short period exposure of di-(2-ethylhexyl) phthalate regulates testosterone and arachidonic acid metabolisms in testis of prepubertal rats
- 18) フォーラム 2003：衛生薬学・環境トキシコロジー（仙台：10月23, 24日）「カラムスイッチング-LC/MSを用いたヒト血液中有機フッ素系化合物の分析」岡田文雄，伊藤里恵，井之上浩一，吉村吉博，中澤裕之
- 19) 第6回環境ホルモン学会（仙台：2003年12月2, 3日）「有機フッ素系化合物のヒトへの暴露状況—オンライン前処理-LC/MS法を用いた血液試料の分析法開発」岡田文雄，伊藤里恵，井之上浩一，中澤裕之

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 前向きコホートの概要とPCB・ダイオキシン類の測定結果

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

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、PCB・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、16年2月末現在340名の妊婦の研究協力が得られた。そのなかで100名のPCB・ダイオキシン類濃度の測定を終了した。濃度の分布はほぼこれまでの一般人における報告とほぼ変わりなかった。また、27人の臍帯血IgEとの関連を検討し、全血液中33'44'-TCB(#77)にのみ有意の正の相関を認めたと、少数例のみの検討であり、今後例数を重ねて免疫機能への影響についても明らかにする予定である。

【研究協力者】

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、佐田 文宏、加藤 静恵、
佐々木成子、中島そのみ、鶴野安希子

福岡県保健環境研究所

飯田 隆雄、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

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暴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暴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暴露に焦点をあて、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暴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(1)。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究は行われていない。

1986年から97年の間に札幌市で甲状腺マスキングを受けた23,424名の妊婦のうち8.7%はATG,AMCのいずれかが陽性で甲状腺機能正常である潜在性自己免疫性甲状腺症候群である。

長山らは母乳中のダイオキシン(PCDD, PCDF, Co-PCB)の毒性指数(TEQ)上昇に伴い乳児(1歳時)36名で甲状腺ホルモン濃度(T3, T4)の低