

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16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

遠藤 俊明

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科学講座毒性学分野

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

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

平成17 (2005) 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. 妊婦の血清葉酸値が児の出生時体重に及ぼす影響について （岸 玲子、水上尚典、櫻木範明、遠藤俊明、石川睦男ほか）	16
2. 妊娠中の母親の喫煙が乳児の身体的成長に及ぼす影響に関する研究 （岸 玲子、水上尚典、櫻木範明、遠藤俊明、石川睦男ほか）	20
3. 停留精巣と環境化学物質曝露との関連についての症例対照研究 （岸 玲子、野々村克也ほか）	23
4. 尿道下裂リスクと母親のCYP1A1, GSTM1, GSTT1遺伝子多型との関連 （佐田文宏、野々村克也ほか）	28
5. 尿道下裂症例の長期予後に関する研究（野々村克也ほか）	32
6. 妊娠維持機構および免疫学的生殖不全病態の解明（水上尚典ほか）	37
7. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxinの絨毛細胞における 糖取り込みに関する研究（遠藤俊明ほか）	40
8. 精子形成に関与するヒト精巣特異的遺伝子の同定（石川睦男ほか）	45
9. 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）	47
10. オンライン固相抽出-液体クロマトグラフ/タンデム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一斉分析法の開発（中澤裕之ほか）	52
11. 妊婦（200人）の血中PCDDs、PCDFs、ノンオルソCo-PCBsおよび モノオルソCo-PCBs濃度（2003-2004年）（飯田隆雄ほか）	59

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 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」も3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）

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。そこで本研究では、北海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攪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。

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ライフスタイルと、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、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で進められていますが、今回の調査により多くの生児人口がカバーされれば、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れば、将来は、生まれてくる児の早期医療など、予防医学的アプローチとQOLを一層高める方向でも種々の発展が地域ベースで可能になることでしょう。

最後に、多くの皆様の御協力により研究実施され、本年度報告書を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17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ほとんど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、PCB・ダイオキシン類、有機フッ素系化合物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17年1月までの本研究への参加妊婦数は、累計6508人であった。このうち平成15年11月までに本調査に同意のうえ参加され、出産を終えた妊婦532人を対象として、妊娠13週未満の血清を用いて葉酸値の測定を行った。さらに葉酸代謝酵素であるMTHFRのC677T及びA1298C多型の遺伝子型を、リアルタイムPCR法で解析した。母親の出産時年齢、妊娠前BMI、教育歴、新生児性別、在胎週数、出産経歴、喫煙および遺伝子型で調整した場合、葉酸値が5.7ng/ml以下であると出生時体重との間に負の関連がみられた。またC677T及びA1298C多型のそれぞれの遺伝子型と出生時体重との有意な関連はみられなかった。葉酸値が低値になると、出生時体重に影響を及ぼす可能性があり、周産期における葉酸摂取の必要性が示唆された。また、母親の妊娠中の喫煙が母親の妊娠中の喫煙が児の出生時の身体的特徴（身長、体重、頭囲、胸囲）に及ぼす影響について調べたところ、非喫煙群の児と比べて、喫煙群の児は、身長、体重、頭囲、胸囲すべてにおいて、出産年齢、在胎週数、出産回数、児性別、母親BMI、母親学歴で調整してもなお、有意に小さかった。

前向きコホート研究と並行して、尿道下裂、停留精巣、不育症（習慣流産）、不妊症の症例対照研究も実施した。1990年以降に停留精巣の手術を受けた患児94名、停留精巣・尿道下裂をもたない病院対照男児116名を対象として、疾患リスクに影響を及ぼす要因を検討したところ、異常分娩（帝王切開・吸引分娩・鉗子分娩）（OR=2.2 95%CI:1.1-4.4）、妊娠初期・妊娠中の父の職業性ディーゼル暴露（各OR=1.9 95%CI:1.0-3.4, OR=1.9 95%CI:1.1-3.5）、妊娠初期・妊娠中の父の喫煙（OR=2.4 95%CI:1.1-5.6, OR=2.4 95%CI:1.0-5.6）でオッズ比の上昇がみられた。今回の調査からは、父親の喫煙などの化学物質との関連が示唆された。

CYP1A1 (MspI), GSTM1, GSTT1と尿道下裂との関連を調べるために、尿道下裂症例の母31例と対照の母64人で症例対照研究を行ったところ、CYP1A1変異型ヘテロ、変異型ヘテロ+ホモが、野生型と比較して有意なオッズ比の減少を示し（各 Adjusted OR=0.17, 95%CI=0.04-0.74, OR=0.28, 95%CI=0.08-0.97）、尿道下裂と母親のエストロゲン代謝との関連が示唆された。

1983年以降に6歳以下で初回手術を施行し現在18歳以上となった尿道下裂症例33人の性的長期予後

の検討を行なったところ、尿道下裂既往のない18歳以上の男性50例と比べて陰茎の状態についてはサイズに不満が強く、性機能については、射精機能や性交機能に関しての満足度は同程度で、性的活動性もほぼ同様であった。

マウスモデルおよびヒト材料を用いて、妊娠維持機構および免疫学的生殖不全、特に不育症（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、Mφの役割を検討したところ、新たな習慣流産の原因として、Th diminution (immunodystrophism) が存在すること、染色体正常の自然流産原因として、NK細胞抑制受容体低下が関与すること、免疫グロブリンは、Mφを介して流産抑止効果を発揮することを明らかにした。

妊娠絨毛細胞モデルとして絨毛癌株を用いてTCDD添加実験を行い、m-RNAおよび蛋白レベルでのglucose transport protein (GLUT)発現につき検討したところ、一時的ではあるがGLUT1 m-RNA発現は抑制された。このことから、環境ホルモンの胎盤に対する糖輸送能の微妙な変化は、正常な胎児発育に影響を及ぼす可能性が示唆された。

不妊症の男性側のリスク要因をあきらかにするために、精子形成に関与すると予想されるヒト精巣特異的遺伝子の同定を試みた。80個のマウスTISP遺伝子からヒトと相同性の高い28個のヒトTISP 遺伝子について解析を行った。3個のみ精巣優位に発現し、精巣特異的とされたTISP15, 43, 50の3個についてcDNAを解析し、TISP50についてはfull lengthを同定し、またアミノ酸レベルにおいてマウスとの相同性も83%と高かった。

Cytochrome P450(CYP)には様々な分子種が存在するが、様々なCYP分子種の遺伝子多型によって、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。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。本研究では、異物代謝酵素群及びその調節因子の遺伝子多型を一度に解析するために、新規マイクロアレイを作成し、血液あるいは毛髪ゲノムのサンプルを用いて解析を行った。さらに特異性を高めるために、on chipの塩基のextensionなど、今後新たな方法との組み合わせが必要であると考えられた。

有機フッ素系化合物は、生体内における蓄積性が高く、また内分泌かく乱化学物質(ED)として疑われているが、本年度は測定装置にLC/MS/MSを用い、迅速かつ高感度・高精度な有機フッ素系化合物の分析法の開発を行った。母体血207検体を分析した結果、PFOS及びPFOAがそれぞれ100%、88%と高い頻度で検出された。本法は、有機フッ素系化合物5種類を15分以内と短時間で分離・定量が可能となり、大規模スクリーニングを視野においた疫学的解析評価に展開できるものと期待される。

妊婦200人から母体血（末梢血）を採取し、200件の血液について、血中ダイオキシン類濃度（PCDDs7種、PCDFs10種、ノンオルソCo-PCB 4種及びモノオルソCo-PCBs8種、合計29種）を異性体別に測定した。異常値を示した1件を除いた初産婦96名及び経産婦103名の血中ダイオキシン類平均濃度は、それぞれ、20.21 pg-TEQ/g lipid及び17.52 pg-TEQ/g lipidであった。

【分担研究者】

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

遠藤 俊明

札幌医科大学産婦人科学講座助教授

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

環境獣医科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

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

【研究協力者】

西條 泰明、近藤 朋子、森 ゆうこ

倉橋 典絵、森岡 三果、鈴木 佳奈

小池 晶、田中 亜美、宮崎美代乃

山岡 ゆう

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、守屋 仁彦

北海道大学大学院医学研究科

外科治療学講座腎泌尿器外科学分野

斉藤 豪、林 卓宏

札幌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周産母子センター

宮本 敏伸、佐々木禎仁

旭川医科大学産婦人科学講座

石塚真由美

北海道大学大学院獣医学研究科

環境獣医科学講座毒性学分野

斉藤 貢一、井之上浩一、伊藤 里恵

岡田 文雄、仲田 尚生

星薬科大学薬品分析化学講座

中川 礼子、松枝 隆彦、平川 博

仙堀 就英、飛石 和大、芦塚 由紀

戸高 尊

福岡県保健環境研究所

【研究協力機関】

青葉産婦人科クリニック、秋山記念病院、旭川医科大学附属病院、旭川赤十字病院、岩見沢こども・産婦人科クリニック、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、市立稚内病院、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、朋佑会札幌産科婦人科、北海道大学附属病院

(平成17年3月現在)

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（PCB・ダイオキシン類、有機フッ素系化合物等）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。

葉酸は生体内ではDNA合成の際の補酵として重要であり、またアミノ酸であるホモシステインをメチオニンに転換する過程で重要である。葉酸が欠乏すると高ホモシステイン血症になり、高ホモシステイン血症は流産や胎児発育遅延、胎児奇形の発生との関連も報告されており、周産期疾患予防の観点からも、葉酸は重要であると考えられる。近年、欧米を中心とした疫学調査によって妊娠前から妊娠初期の葉酸の十分な摂取が神経管欠損症（NTD）やその他の先天異常（先天性心疾患）に対しての予防効果が報告されたことや、葉酸欠乏状態は早産や低出生体重になるリスクが上昇することが報告されている。また妊婦を対象とした調査によると喫煙によって葉酸値が低下することや葉酸代謝酵素であるMTHFRが変異形ホモ677TTをもつ妊婦では、葉酸値がより低くなることを報告している。一方、日本では欧米諸国と比較して二分脊椎の発症率が低いことなどの理由から、これまで関連する疫学調査は行われていなかったが、ICBDMS（国際先天異常監視機構）によると、わ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や、今後、わ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、葉酸摂取量が減少していく可能性があることから、日本においても妊娠可能な女性に対しての葉酸摂取は、検討すべき課題であると考えられる。そこで本研究では、妊娠初期の葉酸値、喫煙、その他の環境要因、遺伝子多型（MTHFR）の感受性素因と児への影響（出生時体重）の関連の検討を行った。

前向きコホート研究と並行して、尿道下裂、停留精巣、不育症（習慣流産）、不妊症に関する症例対照研究・実験研究を行い、疾患リスクに影響を及ぼす要因を検討し、併せて遺伝的感受性の評価法、有機フッ素系化合物、ダイオキシン類の高感度微量測定法の検討も行なった。

B. 研究方法

1. 妊婦の血清葉酸値が児の出生時体重に及ぼす影響

平成15年1月から11月までに北海道の33産科施設に通院中で、本調査に同意を得た妊婦605人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、腎不全患者および先天異常をもつ児を出産した母のいずれかに該当する73人を除いた、532人を解析対象とした。

妊婦の血清葉酸値の測定は、妊娠初期（13週未満）の血清800 μ lを用いてCLIA法で測定した。

自記式質問紙票を用いて、母親の属性（母親の出産時年齢、妊娠前身長、体重、教育歴、既往歴、妊娠初期の喫煙、葉酸サプリメントの摂取）を調べた。さらにまた児の属性については、出産後に医療機関で記載された新生児個票から新生児性別、在胎週数、出生時体重、奇形の有無の情報を得た。

出産後の母体血を採取し、DNA抽出を行い、MTHFR遺伝子のC677TとA1298Cの多型について、allelic discrimination assay で解析を行った。

統計解析は、SPSS ver.11.0を用い、出生時体重に関連する因子である、母親の出産時年齢、妊娠前BMI、出産経歴、新生児性別、在胎週数、喫煙、教育歴および妊婦の血清葉酸値（四分位）、C677TとA1298Cの遺伝子型で調整して重回帰分析を行った。

2. 妊娠中の母親の喫煙が乳児の身体的成長に及ぼす影響

平成16年8月までに調査協力が得られた妊婦613名のうち、除外基準として、双生児、先天異常のある児、調査票の記入が不完全な者、63名を除き、550名を対象とした。喫煙に関しては、非喫煙群（一度も喫煙をしたことがない人）、禁煙群（妊娠初期にやめた人）、喫煙群（妊娠中も喫煙をしていた人）に分けて解析を行った。

解析はSPSS ver.11.0を用いて一元配置分散分析を行い、その後多重比較をおこなった。

3. 停留精巣と環境化学物質曝露との関連についての症例対照研究

症例は、1990年以降、札幌市の泌尿器科3施設（大学病院：1、一般病院：2）で停留精巣の手術の既往のある児96名を対象とした（回収率71%）。病院対照として、札幌市の小児科4施設（大学病院：1、一般病院：4）入院および外来中の停留精巣・尿道下裂を持たない男児とその両親を対象とし、116名から回答を得た（回収率79%）。

質問紙調査法を用い、過去に手術を受けた男児については質問紙を患児の保護者宛に郵送した。調査票の主な内容は、児要因（出生時体重、在胎期間、先天奇形合併）、産科要因（妊娠経過、妊娠時・出産時における問題：妊娠中の出血・切迫流産・帝王切開・異常分娩・妊娠悪阻・子癇前症、過去の妊娠歴・出産歴）、母親の要因（母親の病歴・薬剤服用歴、喫煙・飲酒、食事）、父親の要因（父親の病歴：不妊治療、泌尿器系疾患、喫煙・飲酒、食事）、化学物質曝露（内分泌攪乱物質の職業性曝露・食物からの摂取、農作業・家庭菜園での作業における農薬への曝露等）である。

児出生年、母親の児出生時年齢、世帯収入を調整因子として、ロジスティック回帰分析を行った。

4. 尿道下裂リスクと母親の CYP1A1, GSTM1, GSTT1 遺伝子多型との関連

症例は、2000-2004年に札幌市と名古屋市の泌尿器科2施設（大学病院：1、一般病院：1）で尿道下裂の手術の既往のある児の母31名を対象とした。対照として、札幌市の大学病院で出産を終えた、停留精巣・尿道下裂を持たない男児の母64名を対象とした。

自記式質問紙票を用いて、母親の出産時年齢、妊娠中の喫煙、教育歴、時の出生児体重、合併奇形について調べた。

手術をした泌尿器科医が、尿道下裂の重症度分類を行った。診断基準は、軽症（遠位）は龜頭、冠状溝、陰茎部の開口とし、重症（近位）は陰茎陰囊部、陰囊部の開口とした。

両群の母より2mlの末梢血を採取し、DNA抽出を行い、GSTM1, GSTT1はPCR法にて、CYP1A1 MspI多型はPCR-RLFP法にて解析を行った。

母親の児出生時年齢、出生児体重、母親の妊娠中の喫煙を調整因子として、ロジスティック回帰分析を行った。

5. 尿道下裂症例の長期予後に関する研究

尿道下裂症例は、1983年以降に6歳以下で初回手術を施行し、現在18歳以上となった症例で、現在連絡可能であり、了解が得られた33例を症例群とした。対照群は、尿道下裂既往のない18歳以上の男性50例とした。

症例群と対照群に、自己記入式質問表を記入してもらい、郵送にて返却とした。質問表では、現在の陰茎の状態・性機能（勃起の状態・性欲・射精・性交時の問題点）・性行動（自慰行為、性交）に対して、質問した。

解析はT検定、カイ自乗検定を行い、 $p < 0.05$ にて有意とした。

6. 妊娠維持機構および免疫学的生殖不全病態の解明

前方視的コホート研究として、自然流産の脱落膜中CD3-CD56+NK細胞のperforin, CD94, CD161, CD158a, CD158b, CD244発現を、およびCD8陽性T細胞のperforin発現をフローサイトメトリー法で解析し、同時に絨毛染色体核型分析を行った。染色体正常流産、異常流産、人工中絶間で比較検討した。

Poly(I:C) 誘導の免疫学的生殖不全マウスモデルを作成した。CBA/J×DBA/2J妊娠マウスにPoly(I:C) 60 200 μ gをi.p. (Day7)して胎仔吸収率（流産率）をDay13に調べた結果、Poly(I:C)用量依存性に流産率が上昇し、200 μ g i.p.によってプラトーに達し、コントロールの流産率20%から55 \pm 5 (M \pm SD) %に上昇した ($p < 0.01$)。

このマウスモデルを用いて、免疫グロブリン投与によって、流産率変化を解析した。

7. 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinの絨毛細胞における糖取り込みに関する研究

1. 細胞培養法

絨毛癌細胞株 JAR, JEG-3を10% fetal bovine serum加RPMI1640にて培養。単離浮遊細胞を10cmディッシュに1.0x10⁵ cells 37°C、5%CO₂インキュベータ内で2日間培養後、DMSOに溶解したTCDDを濃度10nM添加し培養0, 24, 48時間後の上清ならびに細胞を回収した。なお、コントロールとして同量のDMSOを加えた培養液で同様に添加・培養した。

2. 上清β-hCG測定

培養細胞の分化程度を決定するため、β-hCG RIAキットを用いて得られた上清の濃度を測定した。

3. RT-PCR

培養細胞をISOGENにて処置し、その溶解液からtotal RNAを採取。これら5μgRNAからDNase 1によるm-RNA精製後、random oligodeoxynucleotide primersを用い一本鎖cDNAを作成しPCRを施行した。

4. Western analysis

超音波破碎を行った細胞溶解から蛋白質を抽出し1xSDSサンプルバッファーに溶解した100μgを電気泳動、膜トランスファーの後GLUT1, 3各種抗体を作用させた。洗浄後、ペルオキシダーゼ結合2次抗体を作用し、βアクチンを基準にしNIH imageにて画像解析した。

8. 精子形成に関与するヒト精巣特異的遺伝子の同定

マウスの80個のTISP遺伝子の中からGenBankよりヒトと相同性の高い配列を検索した。指摘された相同部位にプライマーを設定し、ヒト組織（15臓器）のcDNAライブラリーを鋳型としてPCRを行い、精巣特異的なcDNAの同定を試みた。精巣特異的とされた遺伝子に関して3'RACE, 5'RACEを行いfull lengthの解析を行った。またアミノ酸レベルにおいてマウスとの相同性の比較を行なった。

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

ビオチンラベル化したPCR productをアビジン-HRP (horseradish peroxidase) で検出することで、サーマルサイクラー以外の特殊な機械を必要とせず、TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) 発色によって変異アレルを検出することを目的とした。また、マイクロアレイ法の利点である「一度に多数」の遺伝子について調べることができる。Multiplex法を用いたPCRの簡略化によって、PCR-RFLP法よりも簡便に遺伝子多型の検出を行うことができる可能性がある。

そこで、我々は、試験版としてP450を中心とした薬物代謝関連遺伝子のSNPグラスアレイを開発した。膨大なSNPの中でも、(1) cSNP (coding SNP) やrSNP (regulatory SNP) のようにfunctionに実際に関わっているSNPであること、

(2) 日本人に多い多型であること、(3) 特に変異原物質などを代謝する酵素群に焦点を絞ること、を条件に薬物代謝酵素関連遺伝子のアレルから数十種の遺伝子の選定を行った。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 (Nアセチルトランスフェラーゼ)、AhR (arylhydrocarbon receptor)、PPAR (peroxisome proliferators activated receptors) の11遺伝子、の32アレルをリストアップした。

10. オンライン固相抽出-液体クロマトグラフ/タンデム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一斉分析法の開発

測定試料の調製法は、血液試料（血漿・血清）に内標準物質を含むアセトニトリル溶液を加えて除タンパク操作を行い、遠心分離(3000 rpm 10 min)した後、上清をメンブランフィルターに通した。抽出・精製・濃縮は、前年度と同様にオンライン固相抽出用カートリッジを用いて行い、カラムスイッチングにより、分析対象物質をLC分離部及び検出部 (MS/MS) に導入する。検出には、エ

レクトロスプレーイオン化法(ESI)のネガティブモードを採用した。

11. 妊婦（200人）の血中PCDDs、PCDFs、ノンオルソ Co-PCBs およびモノオルソ Co-PCBs 濃度（2003-2004年）

2002年から2003年に採取した200件の妊婦母体血中ダイオキシン類を、超高感度精密分析法で測定した。すなわち、血液5g秤取後凍結乾燥し、ダイオキシン類の内標準を添加し、高速溶媒抽出器で脂質を抽出した。これをヘキサンに再溶解後、硫酸処理し、硝酸銀シリカゲルカラムおよび活性炭カラム直結して精製し、ダイオキシン類とPCB等に分離した。ダイオキシン画分は濃縮して溶媒除去大量試料注入装置（SCLV-system）を装着した高分解能ガスクロマトグラフィー・高分解能マスペクトロメトリー（HRGC/HRMS）で測定した。PCB画分は活性炭カラムでモノオルソPCBを分離精製してHRGC/HRMSで測定した。（2004年度はGPCカラムでPCB画分を精製してモノオルソPCBを含むヒト血中に残留する68種類のPCBsをHRGC/HRMSで測定した。）

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った。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した。対象者のプライバシーの保持には細心の注意を払った。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った。以上のように、本研究は、倫理面の十分な配慮のうえ行った。

C. 研究結果

1. 妊婦の血清葉酸値が児の出生時体重に及ぼす影響

妊婦532人の妊娠12週時の葉酸値の平均値は 7.3 ± 2.6 ng/mlであった。出生児体重を従属変数とし、4分位に分けた葉酸値と、母親の出産時年齢、妊娠前BMI、教育歴、新生児性別、在胎週数、出産経歴、喫煙およびC677TとA1298Cの遺伝子多型を独立変数として、強制投入法で重回帰分析を行った。その結果、喫煙や出産時年齢、新生児性別、在胎週数、出産経歴、妊娠前BMIにおいても出生時体重との関連がみられたが、それらの変数を調整しても、葉酸値が5.7ng/ml以下である群と出生時体重との間に負の関連がみられた。また、教育歴と、C677TとA1298C遺伝子多型と出生時体重との関連はみられなかった。

2. 妊娠中の母親の喫煙が乳児の身体的成長に及ぼす影響

対象の内訳は、喫煙群68名、禁煙群92名、非喫煙群390名であった。非喫煙群の児と比べて、喫煙群の児は、身長、体重、頭囲、胸囲すべてにおいて、出産年齢、在胎週数、出産回数、児性別、母親BMI、母親学歴で調整してもなお、有意に小さかった。一方、禁煙群の児と非喫煙群の児を比較したところ、有意な差はみられなかった。

3. 停留精巣と環境化学物質曝露との関連についての症例対照研究

妊娠中のつわりは、症例で高い傾向にあった。切迫流産、妊娠中毒症（浮腫、高血圧、蛋白尿のいずれかあり）は症例群で比較的多くみられたが、有意な差は認められなかった。帝王切開でリスクの上昇傾向、異常分娩（帝王切開、吸引分娩、鉗子分娩）では有意にリスクの上昇を認めた。

職業性の化学物質曝露については、症例で、父親の妊娠初期のディーゼル曝露のオッズ比が高い傾向にあった。母親の職業性化学物質曝露では有意な関連は無かった。

喫煙については、父の妊娠初期、妊娠中の喫煙

で有意なオッズ比の上昇が認められた。また、同居人の喫煙でもオッズ比の上昇が認められた。母の喫煙に関しては、差はみられなかった。

「牛乳を毎日飲む」群で、「ほとんど飲まない」と比較してオッズ比の上昇傾向がみられた。

4. 尿道下裂リスクと母親の CYP1A1, GSTM1, GSTT1 遺伝子多型との関連

低出生体重児で有意なオッズ比の上昇がみられた。症例で在胎週数37週未満が多かった。妊娠中の喫煙も有意な関連はみられなかった。

GSTM1, GSTT1に有意な関連はみられなかったが、CYP1A1野生型と比較して、変異型ヘテロ、変異型ヘテロ+ホモで有意なオッズ比の上昇がみられた（各 OR=0.31, 95%CI=0.1-0.8 OR=0.4 95%CI=0.2-1.0）。

母親の出産時年齢、出生児体重、妊娠中の喫煙で調整しても、GSTM1, GSTT1に有意な関連はみられなかったが、CYP1A1野生型と比較して、変異型ヘテロ、変異型ヘテロ+ホモで有意なオッズ比の上昇がみられた（各 OR=0.2, 95%CI=0.04-0.7 OR=0.3 95%CI=0.1-0.97）。

5. 尿道下裂症例の長期予後に関する研究

質問表を返却した症例群22例の尿道下裂の程度はdistal type 6例、middle type 5例、proximal type 9例、不明2例と比較的程度の強い症例が多かった。

他の人との違いがあるか？という質問に関しては、症例群で約6割、対照群で約4割が“ある”と答えていた。その内訳は症例群では小さいことが最も頻度が高かったのに対し、対照群では一番は包茎で、小ささは2番目であった。

勃起時の問題を訴えたのは有意に症例群で多く（症例群：73%、対照群：45%、 $p<0.05$ ）、その最も多かった問題点は小さいことであった。

性機能については、射精機能や性交機能についての満足度は同程度で、性的活動性もほぼ同様であった。

6. 妊娠維持機構および免疫学的生殖不全病態の解明

中絶群や染色体異常流産に比し、染色体正常流産では脱落膜中NK細胞では、CD158a+細胞やCD94+細胞が減少し、NK細胞とT細胞のperforin発現が有意に増加していた。またNK細胞におけるCD158aとCD94発現には、負の相関関係が認められた。NK細胞抑制型レセプターの減少と細胞障害性perforinの増加が、染色体正常流産と関連することが初めて明らかとなった。

Poly(I:C) 誘導免疫学的生殖不全マウスモデルにPoly(I:C) i.p.後、intactないしFab型ヒト免疫グロブリン 0.8g/kgを3日間i.p.したところ、intact型では流産率が8%に減少し、流産抑止効果が認められたが、Fab型では流産率は変化しなかった。この流産抑止効果はFc部分を介するものと考えられた。

免疫グロブリン投与非妊娠donorマウスからの脾細胞を分離し、Poly(I:C) 投与妊娠recipientマウスに尾静脈から注入して、未分画脾細胞、Thy1.2陽性T、B220陽性B、DX5陽性NK細胞、F4/80陽性Mφの流産抑止効果を調べた（養子移入実験）。この養子移入実験の結果、未分画脾細胞の移入によって、流産率は $13\pm 3\%$ に抑制された（ $p<0.0001$ ）。MACS法でT細胞、B細胞、NK細胞を除去して移入しても、流産率は各22%、10%、23%と流産抑止効果は残存したが、Mφを除去した場合、流産率49%と流産抑止効果が消失した。一方、免疫グロブリン投与非妊娠donorマウスにCL2MDP-liposome i.p.投与し、Mφを完全除去した脾細胞を分離して養子移入実験を行った結果、流産抑止効果は消失した。

7. 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin の絨毛細胞における糖取り込みに関する研究

JAR細胞株では、添加0時間後の細胞数と比較し、いずれの条件でも添加24時間後には約2.7倍、48時間後には約5倍の細胞増殖を認めた。JEG-3細胞株でも同様に、添加0時間後の細胞数と比較し、いずれの条件でも添加24時間後に約2倍、添

加48時間後に約4倍の細胞増殖を認めた。以上よりJARおよびJEG-3細胞株どちらもTCDD添加による細胞数増加に対する変化は認めなかった。

次に、JAR細胞株の細胞数105個あたりの β hCG分泌量を検討したところTCDD 1nM添加24時間後でコントロールと比較し1.4倍、TCDD 10nM添加では1.6倍の分泌量増加を認めた。しかしながら48時間後では、いずれの濃度においてもコントロールと同様の分泌量となった。

JAR細胞株において、TCDD 1nMと10nM添加24時間後において、両者共にGLUT1 m-RNA発現抑制を観察したが、添加48時間後には両者ともにコントロールの発現と同等に復帰した。JEG-3細胞株では、TCDD添加による変化は認めなかった。GLUT3 m-RNA発現は両細胞株共に添加条件・時間に依存せず同様に発現が認められた。

GLUT1およびGLUT3蛋白の発現はどちらの細胞株、添加条件においてもほぼ同様発現が認められた。

8. 精子形成に關与するヒト精巢特異的遺伝子の同定

80個のマウスTISP遺伝子からヒトと相同性の高い28個のヒトTISP 遺伝子について解析を行った。3個のみ精巢優位に発現し、5個については精巢自体にも発現がみられず、残りは精巢も含め他臓器で発現をみるものが多かった。今回、精巢特異的とされたTISP15, 43, 50の3個についてcDNAを解析し、TISP50についてはfull lengthを同定し、またアミノ酸レベルにおいてマウスとの相同性も83%と高かった。TISP15, 43についてはpartialながら同定した。

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

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。

変異検出には、ゲノムPCR産物のハイブリ後の発色で、スキャナーなどの光学機器を必要とせず、目視判定が可能であった。

ヒト血液20-50ulより各々genomeDNAを抽出し、SNPsを検出することができた。約50名のgenomeを用いて再現性や検出感度を確認したところ、CYP1B1*3、CYP2C19*3、GSTP1、AhRについては、確実な多型の検出が可能であった。CYP1A2、NAT2は非常に弱いシグナルが得られた。CYP2D6、PPAR、CYP2A6については、安定した結果が得られなかった。

さらに、血液よりも非侵襲的なサンプルである毛髪や眉毛、爪からのゲノム抽出を行ったところ、それらのPCR産物がchipを用いた遺伝多型の判定に利用できる可能性が考えられた。DNAの増幅は1本の毛髪あるいは眉毛でも十分可能であった。

10. オンライン固相抽出-液体クロマトグラフ/タンデム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一斉分析法の開発

本分析法を母体血207検体の分析に応用した。有機フッ素系化合物5種類を測定した。母体血より、PFOS及びPFOAが高頻度で検出された。それぞれの化合物の検出率は、100%(PFOS)、88%(PFOA)であり、検出された濃度範囲は2.8~16.2ppb(PFOS)、N.D~4.8ppb(PFOA)であった。

11. 妊婦(200人)の血中PCDDs、PCDFs、ノンオルソCo-PCBs およびモノオルソCo-PCBs濃度(2003-2004年)

分析された200名の中1名でOCDFが2854pg/g lipidという極端な高濃度を示した。異常値を除いた妊婦199名の内訳は初産婦96名、経産婦103名で両者はほぼ同数であった。平均年齢は、それぞれ、29.5歳及び32.3歳で、経産婦の方が2.8歳高かった。血中脂質含量は、両者とも0.36%であった。血中ダイオキシン類濃度をTEQ値で見ると、初産婦のPCDDs、PCDFs、ノンオルソ-Co-PCBsモノオルソCo-PCBsおよびTotal TEQ平均値は、それぞれ、8.37、4.53、7.31および20.2 pg-TEQ/g lipidであ

り、一方、経産婦では7.24、3.82、4.46および17.5pg-TEQ/g lipidであった。

D. 考 察

平成17年1月までに、北海道の産科病院のうち40病院の協力が得られ、参加妊婦人数は、累計6508人である。新生児個票の戻った1923人中、先天性心疾患11人、水頭症、停留精巣、多指症各3人、口蓋裂、水腎症、多趾症、ダウン症候群、臍帯ヘルニア各2人、口唇口蓋裂、尿道下裂、合指症、合趾症、少頭症、小腸閉鎖各1名であった（延べ人数）。今度末までに約7000人の妊婦の参加が見込まれ、出産を終えた時点で、停留精巣は49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2.5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。

今回対象となった妊婦の血清葉酸値は、 7.3 ± 2.6 ng/mlであった。欧米と比較して神経管欠損症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。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るが、基準値の幅が広く、ま

たこの下限値未満の葉酸値を示す妊婦は、約2%ほどであった。出生時体重との関連を検討するために、葉酸値を4分位にわけて解析をおこなったところ、葉酸値が5.7ng/ml以下である場合に、出生時体重との間に負の有意な関連がみられた。Alayneらは、葉酸値と出生時体重との関連について、有意な関連がなかったことを報告している。異なった結果となった理由は、解析対象者の血清葉酸値の計測時期が異なることにも関連していると考えられる。本研究では、妊娠初期の血清葉酸値を計測しているが、先行研究では、研究対象となる妊婦の妊娠する前の血清葉酸値を計測している。またSchollらは、妊娠中の葉酸経口摂取量が、 $240 \mu\text{g}/\text{d}$ 未満であると低出生体重になるリスクが上昇すると報告している。

また葉酸経口摂取量と血清葉酸値は、有意な相関があることが報告されている。したがって今回の結果は、妊娠前よりも妊娠中の葉酸値が低値になると、出生時体重に影響を及ぼす可能性があり、妊娠中における葉酸摂取の必要性が示唆された。

初産婦と経産婦の血中ダイオキシン類濃度（TEQ-pg/g lipid表示）を比較すると、初産婦の方が経産婦よりわずかに高値を示した。また、初産婦と経産婦血中ダイオキシン類濃度にしめるPCDDs、PCDFs、ノンオルソCo-PCBsおよびモノオルソCo-PCBsの割合は、初産婦で42%、22%、24%および12%、経産婦で41%、22%、24%および13%と、両者はほとんど同じであった。このことから出産に伴い母体中に蓄積されていたダイオキシン類が排出または児へ移行したと考えられる。また、ダイオキシン類の排出または児へ移行はPCDDs、PCDFs、ノンオルソCo-PCBsおよびモノオルソCo-PCBsのそれぞれで大きな差はないと考えられる。

過去に、福岡県内に居住する50名の未婚女性の血中ダイオキシン類濃度を測定した（平均年齢20.2歳：採取時期、1993年6月から1994年6月：モノオルソCo-PCBは測定せず）血中ダイオキシン類濃度（モノオルソCo-PCBsを除く）は $24.1 \text{ pg-TEQ}/\text{g lipid}$ であった。一方、北海道の初産婦

のモノオルソCo-PCBを除いた血中ダイオキシン類濃度は17.7pg-TEQ/g lipidである。初産婦（北海道）の方が青年女子（福岡）より平均年齢が9.3歳高いにもかかわらず、血中濃度は逆に青年女子の方が1.4倍高い結果であった。ダイオキシン類の環境への排出はこの間、1/10以下に抑制されており、その効果が示唆される。両集団の血中PCDDs、PCDFsおよびノンオルソCo-PCBs濃度を比較すると、PCDDs及びPCDFs濃度は北海道の初産婦の方が低い、ノンオルソCo-PCBs濃度はほとんど同じであることが明らかになった。これは、削減努力を行ったPCDDs及びPCDFsの人体中濃度が相対的に減少し、削減対策が困難であったPCBsについては変化しなかったと推測される。

E. 結 論

平成15年2月から平成17年1月までの本研究への参加妊婦数は、累計6508人であった。このうち平成15年11月までに本調査に同意のうえ参加され、出産を終えた妊婦532人を対象として、妊娠13週未満の血清を用いて葉酸値の測定を行ったところ、 7.3 ± 2.6 ng/mlであった。葉酸値が5.7ng/ml以下であると出生時体重との間に負の関連がみられた。

北海道で採取された初産婦96名及び経産婦103名の血中ダイオキシン類濃度の平均は、それぞれ、20.21 pg-TEQ/g lipid及び17.52 pg-TEQ/g lipidであった。今後の継続的な調査が必要である。

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, 佐田文宏, 西條泰明. 内分泌かく乱物質によるヒトへの影響—疫学研究的現状と課題. 保健医療科学, 印刷中.
2. Kurahashi N, Kasai S, Shibata T, Kakizaki H, Nonomura K, Sata F, Kishi R. Parental and neonatal risk factors for cryptorchidism. *Med Sci Monit*, in press.
3. Sata F, Yamada H, Suzuki K, Saijo Y, Kato EH, Morikawa M, Minakami H, Kishi R. Caffeine intake, CYP1A2 polymorphism and the risk of recurrent pregnancy loss. *Mol Hum Reprod*, in press
4. Kurahashi N, Sata F, Kasai S, Shibata T, Moriya K, Yamada H, Kakizaki H, Minakami H, Nonomura K, Kishi R. Maternal genetic polymorphisms in CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 and the risk of hypospadias. *Mol Hum Reprod* 2005; 11(2): 93-98.
5. Saijo Y, Sata F, Yamada H, Suzuki K, Sasaki S, Kondo T, Gong YY, Kato EH, Shimada S, Morikawa M, Minakami H, Kishi R. Ah receptor, CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 gene polymorphisms are not involved in the risk of recurrent pregnancy loss. *Mol Hum Reprod*. 2004; 10(10): 729-733.
6. 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(3): 237-241.
7. 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; 51(3): 241-247.
8. 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; 19(4): 1018-1024.
9. Morikawa M, Yamada H, Kato EH, Shimada S, Yamada T, Minakami H. Embryo loss pattern is predominant in miscarriages with normal chromosome karyotype among women with repeated miscarriage. *Hum Reprod* 2004; 19(11): 2644-2647.
10. 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(1): 45-49.
11. Yamada H, Sata F, Saijo Y, Kishi R, Minakami H. Genetic factors of fetal growth restriction and miscarriage. *Semin Thromb Hemost*, in press.
12. 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2004; 88(3): 101-104.
13. 森川 守, 山田秀人, 平山恵美, 片岡宙門, 島田茂樹, 渡利道子, 山田 俊, 長 和俊, 森本裕二, 水上尚典. 脊髄損傷合併妊娠の1例. 周産期医学, 印刷中.
14. 森川 守, 山田秀人, 山田 俊, 平山恵美, 島田茂樹, 片岡宙門, 長 和俊, 水上尚典. 胎児尿管遺残の1例. 周産期医学, 印刷中.
15. Sasaki Y, Miyamoto T, Sengoku K, Hayashi H, Takuma N, Ishikawa M. The human transcript induced in spermatogenesis 50. *Reprod Med Biol* 2004; 3(4): 237-243.
16. Muzandu K, Shaban Z, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Possible involvement of peroxynitrite in estrogen-induced oxidative stress. *Free Radic Res*, in press.
17. Shaban Z, Soliman M, El-shazly S, El-bohi K, Abdelazeez A, Kehelo K, Kim H, Muzandu K, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. AhR and PPAR α Antagonistic effects on CYP2B and CYP3A and additive inhibitory effects on CYP2C11. *Xenobiotica* 2005;35(1):51-68.
18. Nikaidou S, Ishizuka M, Maeda Y, Hara T, Kazusaka A, Fujita S. Effect of components of green tea extracts, caffeine and catechins on hepatic drug metabolizing enzyme activities and mutagenic transformation of carcinogens. *J Vet Med Sci* 2005;67(1):137-138.
19. Shaban Z, El-Shazly S, Abdelhady S, Fattouh I, Muzandu K, Ishizuka M, Kimura K, Kazusaka A, Fujita S. Down regulation of hepatic PPAR α function by AhR ligand. *J Vet Med Sci* 2004; 66(11):1377-1386.
20. Sakamoto KQ, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Iodine intake as a possible cause of discontinuous decline in sperm counts: a re-evaluation of historical and geographic variation in semen quality. *Jpn J Vet Res*. 2004; 52(2): 85-94.
21. Kim HS, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Alterations of activities of cytosolic phospholipase A2 and arachidonic acid-metabolizing enzymes in di-(2-ethylhexyl)phthalate-induced testicular atrophy. *J Vet Med Sci* 2004; 66(9): 1119-1124.
22. Saito K, Sakai N, Kim HS, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Strain differences in diazepam metabolism at its three metabolic sites in sprague-dawley, brown norway, dark agouti, and wistar strain rats. *Drug Metab Dispos* 2004; 32(9):959-965.
23. Shaban Z, El-Shazly S, Ishizuka M, Kimura K, Kazusaka A, Fujita S. PPAR α -dependent modulation of hepatic CYP1A by clofibrilic acid in rats. *Arch Toxicol* 2004; 78(9): 496-507.

24. Saito K, Kim HS, Sakai N, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Polymorphism in diazepam metabolism in Wistar rats. *J Pharm Sci* 2004; 93(5):1271-1278.
 25. Inoue K, Okada F, Ito R, Kawaguchi M, Okanouchi N, Nakazawa H. Determination of perfluorooctane sulfonate, perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonylamide in human plasma by column-switching liquid chromatography - electrospray mass spectrometry coupled with solid phase extraction. *J Chromatogr B*, 2004; 810(1): 49-56.
 26. Inoue K, Okada F, Ito R, Kato S, Sasaki S, Nakajima S, Uno A, Saijo Y, Sata F, Yoshimura Y, Kishi R, Nakazawa H. Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and related perfluorinated compounds in human maternal and cord blood samples: assessment of PFOS exposure in a susceptible population during pregnancy. *Environ Health Perspect* 2004; 112(11): 1204-1207.
- 2) 学会発表
1. 倉橋典絵, 笠井世津子, 柴田隆, 柿崎秀宏, 野々村克也, 佐田文宏, 岸玲子. 停留精巢のリスク要因に関する症例対照研究. 第14回日本疫学会, 山形, 2004年1月22-23日.
 2. 佐田文宏, 森岡三果, 倉橋典絵, 鈴木佳奈, 西條泰明, 山田秀人, 水上尚典, 櫻木範明, 遠藤俊明, 石川睦男, 兼元敏隆, 岸玲子. 妊婦の葉酸値と喫煙等の関連～「環境と子供の健康に関するモニタリング調査」報告(1). 第52回日本産科婦人科学会北日本連合地方部会総会・第82回北海道産科婦人科学会総会, 札幌, 2004年9月10-11日.
 3. 倉橋典絵, 佐田文宏, 森岡三果, 鈴木佳奈, 近藤朋子, 森ゆうこ, 笠井世津子, 西條泰明, 守屋仁彦, 柿崎秀宏, 山田秀人, 遠藤俊明, 野々村克也, 石川睦男, 水上尚典, 岸玲子. 尿道下裂リスクと葉酸代謝酵素 Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) 遺伝子多型との関連. 第15回日本疫学会, 大津, 2005年1月21-22日.
 4. 森岡三果, 倉橋典絵, 鈴木佳奈, 近藤朋子, 森ゆうこ, 西條泰明, 佐田文宏, 岸玲子. 妊婦の葉酸値と出生時体重との関連. 第75回日本衛生学会総会, 新潟, 2005年3月27-30日.
 5. 近藤朋子, 佐々木成子, 加藤静恵, 中島そのみ, 鶴野安希子, 金上宣夫, 飯田隆雄, 西條泰明, 佐田文宏, 岸玲子. 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—(3)血液中ダイオキシン類濃度とマイクロアレイを用いた遺伝子多型の関連. 第75回日本衛生学会総会, 新潟, 2005年3月27-30日.
 6. 鈴木佳奈, 佐田文宏, 西條泰明, 敦賀律子, 山田秀人, 水上尚典, 岸玲子. 習慣流産リスクと妊娠関連血漿蛋白A遺伝子多型. 第75回日本衛生学会総会, 新潟, 2005年3月27-30日.
 7. 守屋仁彦, 古野剛史, 柿崎秀宏, 野々村克也: 尿道下裂症例の生殖予後. 第49回日本不妊学会および第22回日本受精着床学会, 旭川, 2004年9月2-4日.
 8. Yamada H, Shimada S, Morikawa M, Kato EH, Nishida R, Minakami H. Decrease in a specific killer cell immunoglobulin-like receptor on natural killer cells in the decidua of spontaneous abortion with normal chromosome karyotype. 9th International Congress of Reproductive Immunology, Hakone, October 12-15, 2004.
 9. 山田秀人. 不育症における免疫学的異常と遺伝学的素因. 第7回阪神不妊治療懇話会(特別講演), 尼崎, 2004年9月16日.
 10. 山田秀人, 敦賀律子, 平山恵美, 古田伊都子, 小橋元, 渥美達也, 小池隆夫, 松浦栄治, 水上尚典. 抗リン脂質抗体と妊娠中毒症との関連. 第25回日本妊娠中毒症学会(ワークショップ), 東京, 2004年9月24-25日.

11. 山田秀人, 平山恵美, 島田茂樹, 森川 守, 櫻木範明, 佐田文宏, 岸 玲子, 水上尚典. 習慣流産の遺伝学的素因: GSTM1, CYP17, IL-6. 第56回日本産科婦人科学会, 東京, 2004年4月10-13日.
 12. Yamada H, Kato EH, Morikawa M, Shimada S, Nishihira J, Minakami H. Decreased serum levels of macrophage migration inhibitory factor in miscarriages with normal chromosome karyotype. 第19回日本生殖免疫学会, 箱根, 2004年 10月11-12日.
 13. 宮本敏伸, 田熊直之, 佐々木禎仁, 石川睦男. ヒト精子特異的遺伝子であるTISP50, TISP15, TISP43についての解析. 第52回北日本産科婦人科学会, 札幌, 2004年9月10-11日.
 14. Shaban Z, El-Shazly S, 石塚真由美, 数坂昭夫, 藤田正一. Ah受容体リガンドによるPPAR α 機能の抑制. 内分泌攪乱化学物質学会第7回研究発表会, 名古屋, 2004年12月14日.
 15. 石塚真由美, 高菅卓三, 谷川力, 数坂昭夫, 藤田正一. 野生ドブネズミに蓄積する環境汚染物質と生体影響のgenomics解析. 内分泌攪乱化学物質学会第7回研究発表会, 名古屋, 2004年12月14日.
 16. 藤田正一, 石塚真由美, 高菅卓三, 谷川力, 千葉一成, 佐治尚介, 坂本健太郎, 数坂昭夫. 日本の野生生物における内分泌攪乱と環境汚染. 内分泌攪乱化学物質学会第7回研究発表会, 名古屋市, 2004年12月14日.
 17. Muzandu KM, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Possible involvement of peroxynitrite in estrogen-induced oxidative stress and protective role of carotenoids. 10th International Congress of Toxicology, Tampere, Finland, July11-15, 2004.
 18. Kim HS, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Di-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses tamoxifen-induced apoptosis in pituitary GH3 cells. 10th International Congress of Toxicology, Tampere, Finland, July11-15, 2004.
 19. Ishizuka M, Takasuga T, Tanikwa T, Fujita S. Suppression of testosterone syntheses in testes of wild Norway rats in Japan: accumulation of persistent organochlorine pollutions and polybrominated diphenyl ether and their effect. 10th International Congress of Toxicology, Tampere, Finland, July11-15, 2004.
 20. 岡田文雄, 中田彩子, 井之上浩一, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 花岡知之, 小林実夏, 月野浩昌, 津金昌一郎, 中澤裕之. 日本人における有機フッ素系化合物の暴露状況. 日本薬学会第125年会, 東京, 2005年3月29-31日.
 21. 中澤裕之: 生体試料中の有機フッ素系化合物の分析と残留. 第14回環境ホルモン学会講演会, 東京, 2005年1月28日.
 22. 岡田文雄, 井之上浩一, 伊藤里恵, 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, 岸 玲子, 中澤裕之: ヒト母体血及び臍帯血における有機フッ素系化合物の胎児移行性評価. 日本薬学会第124年会, 大阪, 2004年3月29-31日.
 23. Hirakawa H, Todaka T, Hori T, Tobiishi K, Iida T, Kishi R, Sata F, Saijo Y, Kato S, Nakajima S, Sasaki S, Uno A, Kondo T, Mori Y. The levels of PCDDs, PCDFs, Non-ortho PCBs and Mono-ortho PCBs in the blood of pregnant women. 内分泌攪乱化学物質学会第7回研究発表会, 名古屋, 2004年12月14日.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

妊婦の血清葉酸値が児の出生時体重に及ぼす影響について

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
分担研究者	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
	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
	遠藤 俊明	札幌医科大学産婦人科学講座 助教授
	石川 睦男	旭川医科大学産婦人科学講座 教授
	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

研究要旨

葉酸は、ホモシステインをメチオニンに転換する過程で不可欠であり、欠乏すると、ホモシステインが高値となり、胎児発育遅延や低出生体重のリスクが高まることが報告されている。しかし、葉酸値と出生時体重の関連を報告したものは、少ない。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。そこで本研究では、妊婦の血清葉酸値と出生時体重との関連を検討した。妊婦を対象にした前向きコホート研究の一環で、平成15年1月から11月までに本調査に同意された全妊婦605人を対象として、妊娠13週未満の血清を用いてCLIA法で葉酸値の測定を行った。さらに葉酸代謝酵素であるMTHFRのC677T及びA1298C多型の遺伝子型を、リアルタイムPCR法で解析した。母親の出産時年齢、妊娠前BMI、教育歴、新生児性別、在胎週数、出産経歴、喫煙および遺伝子型で調整した場合、葉酸値が5.7ng/ml以下であると出生時体重との間に負の関連が見られた。またC677T及びA1298C多型のそれぞれの遺伝子型と出生時体重との有意な関連はみられなかった。葉酸値が低値になると、出生時体重に影響を及ぼす可能性があり、周産期における葉酸摂取の必要性が示唆された。

【研究協力者】

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

林 卓宏、斉藤 豪

札幌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周産母子センター

宮本 敏伸、佐々木禎仁

旭川医科大学産婦人科学講座

西條 泰明、近藤 朋子、森 ゆうこ、

倉橋 典絵、森岡 三果、鈴木 佳奈、

小池 晶、田中 亜美、宮崎美代乃

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

【研究協力機関】

青葉産婦人科クリニック、秋山記念病院、旭川

医科大学附属病院、旭川赤十字病院、岩見沢こども・産婦人科クリニック、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、札幌徳州会病院、市立札幌病院、市立士別総合病院、市立函館病院、市立稚内病院、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、朋佑会札幌産科婦人科、北海道大学附属病院

(平成17年3月現在)

A. 研究目的

葉酸は生体内では DNA 合成の際の補酵として重要であり、またアミノ酸であるホモシステインをメチオニンに転換する過程で重要である。葉酸が欠乏すると高ホモシステイン血症になり、高ホモシステイン血症は流産や胎児発育遅延、胎児奇形の発生との関連も報告されており、周産期疾患予防の観点からも、葉酸は重要であると考えられる。近年、欧米を中心とした疫学調査によって妊娠前から妊娠初期の葉酸の十分な摂取が神経管欠損症 (NTD) やその他の先天異常 (先天性心疾患) に対しての予防効果が報告されたことや、葉酸欠乏状態は早産や低出生体重になるリスクが上昇することが報告されている。また妊婦を対象とした調査によると喫煙によって葉酸値が低下することや葉酸代謝酵素である MTHFR が変異型ホモ 677TT をもつ妊婦では、葉酸値がより低くなることを報告している。一方、日本では欧米諸国と比較して二分脊椎の発症率が低いことなどの理由から、これまで関連する疫学調査は行われていなかったが、ICBDMS (国際先天異常監視機構) によると、わ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や、今後、わが国の食生活の多様化により、食物摂取の個人差が大きくなり、葉酸摂取量が減少していく可能性があることから、日本においても妊娠可能な女性に対しての葉酸摂取は、検討すべき課題であると考えられる。そこで本研究では、妊娠初期の葉酸値、喫煙、その他の環境要因、遺伝子多型 (MTHFR) の感受性素因と児への影響 (出生時体重) の関連の検討を行った。

B. 研究方法

1. 対象

前向きコホート研究を設定し、平成 15 年 1 月から 11 月までに北海道の 3 産科施設に通院中で、本調査に同意を得た妊婦 605 人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、腎不全患者および先天異常をもつ児を出産した母

16 人である妊婦 73 人を除いた、532 人を解析対象とした。

2. 方法

- ① 妊婦の血清葉酸値の測定は、妊娠初期 (13 週未満) の血清 800 μ l を用いて CLIA 法で測定した。
- ② 自記式質問紙票を用いて、母親の属性 (母親の出産時年齢、妊娠前身長、体重、教育歴、既往歴、妊娠初期の喫煙、葉酸サプリメントの摂取) を調べた。さらにまた児の属性については、出産後に医療機関で記載された新生児個票から (新生児性別、在胎週数、出生時体重、奇形の有無) の情報を得た。
- ③ 出産後の母体血を採取し、DNA 抽出を行い、MTHFR 遺伝子の C677T と A1298C の多型について、リアルタイム PCR 法による allelic discrimination assay で解析を行った。

3. 解析方法

統計解析は、SPSS ver.11.0 を用い、出生時体重に関連する因子である、母親の出産時年齢、妊娠前 BMI、出産経歴、新生児性別、在胎週数、喫煙、教育歴および妊婦の血清葉酸値 (四分位)、C677T と A1298C の遺伝子型で調整して重回帰分析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、参加病院または代表研究機関の倫理委員会にて、全て承認されている。本研究のデータ保管は、個人情報管理者を置き、厳格な管理が行われ、調査結果の公表に際しては、個人名を公表したり、個人を特定できる形にはせず、妊婦のプライバシーは厳重に保護されている。

C. 研究結果

1. 基本的属性 (表 1)

初産、経産婦の割合は、ほぼ同じであった。また喫煙群は、14.8%を占めていた。

35歳以上の妊婦の割合は、80人（15.3%）であった。また低出生体重児（出生時体重が2500g未満）532人中34人（6.4%）であり、早産（在胎週数37週未満の出産）の児は、30人（5.6%）であった。

2. 血清葉酸値と出生時体重との関連について

（表2）

出生児体重を従属変数とし、4分位に分けた葉酸値と、母親の出産時年齢、妊娠前BMI、教育歴、新生児性別、在胎週数、出産経歴、喫煙およびC677TとA1298Cの遺伝子多型を独立変数として、強制投入法で重回帰分析を行った。その結果、喫煙や出産時年齢、新生児性別、在胎週数、出産経歴、妊娠前BMIにおいても出生時体重との関連が見られたが、それらの変数を調整しても、葉酸値が5.7ng/ml以下である群と出生時体重との間に負の関連が見られた。

また、教育歴と、C677TとA1298C遺伝子多型と出生時体重との関連は見られなかった。

D. 考 察

今回対象となった妊婦の血清葉酸値は、7.3±2.6ng/mlであった。欧米と比較して神経管欠損症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8.1ng/mlであり、大きな差はみられなかった(1)。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るが、基準値の幅が広く、またこの下限値未満の葉酸値を示す妊婦は、約2%ほどであった。

そこで、出生時体重との関連を検討するために、葉酸値を4分位にわけて解析をおこなったところ、葉酸値が5.7ng/ml以下である場合に、出生時体重との間に負の有意な関連が見られた。Alayneらは、葉酸値と出生時体重との関連について、有意な関連がなかったことを報告している(2)。異

なった結果となった理由は、解析対象者の血清葉酸値の計測時期が異なることにも関連していると考えられる。本研究では、妊娠初期の血清葉酸値を計測しているが、先行研究では、研究対象となる妊婦の妊娠する前の血清葉酸値を計測している。またSchollらは、妊娠中の葉酸経口摂取量が、240μg/d未満であると低出生体重になるリスクが上昇すると報告している(3)。

また葉酸経口摂取量と血清葉酸値は、有意な相関があることが報告されている。したがって今回の結果は、妊娠前よりも妊娠中の葉酸値が低値になると、出生時体重に影響を及ぼす可能性があり、妊娠中における葉酸摂取の必要性が示唆された。

E. 参考文献

- (1) 近藤 他 二分脊椎症と葉酸:葉酸経口摂取量と葉酸血清濃度 日本泌尿器科学会雑誌 2003 Jul;94(5):551-9.
- (2) Alayne, et al. Preconception homocysteine and B vitamin status and birth outcomes in Chinese women. Am J Clin Nutr 2002;76:1385-91
- (3) Scholl, et al. Dietary and serum folate: their influence on the outcome of pregnancy. Am J Clin Nutr 1996;63:520-5

F. 研究発表

1. 学会発表

森岡三果、倉橋典絵、鈴木佳奈、近藤朋子、森ゆうこ、西條泰明、佐田文宏、岸玲子:「妊婦の葉酸値と出生時体重との関連」、第75回日本衛生学会総会、新潟(2005.3.27-30)