

20050119/A

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17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生殖・発達医学講座産科・生殖医学分野 水上 尚典

分担研究者

札幌医科大学産婦人科学講座	遠藤 俊明
旭川医科大学病院	石川 陸男
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18（2006）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（水上尚典ほか）	2
III. 分担研究報告書	
1. 尿道下裂リスクと胎児 <i>ESR1</i> 、 <i>CYP17</i> 、 <i>CYP19</i> 遺伝子多型（水上尚典ほか）	23
2. 尿道下裂リスクと葉酸代謝遺伝子多型 <i>MTHFR</i> との関連（水上尚典ほか）	29
3. 尿道下裂修復術の長期予後に関する研究－排尿症状に関する検討－（野々村克也ほか）	33
4. 唇裂口蓋裂リスク要因に関する文献研究（水上尚典ほか）	38
5. 妊婦の血清葉酸値が胎児の発育に及ぼす影響について（水上尚典ほか）	47
6. 妊婦の血清葉酸値を低下させる要因について（水上尚典ほか）	51
7. 葉酸の経口摂取状況に関する文献研究（水上尚典ほか）	56
8. バイオマーカーcytochrome P450に関する研究（藤田正一ほか）	60
9. 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 ヒト母体血中有機フッ素系化合物の分析及び次世代影響の検討（中澤裕之ほか）	64
10. 血液及び母乳中のダイオキシン類の濃度（飯田隆雄ほか）	72
11. 母体血中PCB・ダイオキシン類濃度と毛髪水銀濃度の検討（飯田隆雄ほか）	81
12. マイクロアレイを用いた遺伝子多型、喫煙とPCB・ダイオキシン濃度との関連 （藤田正一、飯田隆雄ほか）	86
13. 母体血PCB・ダイオキシン類と臍帯血IgEとの関連（飯田隆雄ほか）	93
14. 母親の機能性カテコール-O-メチル転移酵素遺伝子多型と 胎児発育遅延（佐田文宏ほか）	98
15. 早産、低出生体重、子宮内発育遅延と <i>IL1A</i> 、 <i>IL1B</i> 遺伝子多型との関連（佐田文宏ほか）	102
16. 習慣流産リスクと妊娠関連血漿蛋白A遺伝子多型（佐田文宏ほか）	107
17. IgG avidityとPCR法を用いた先天性トキソプラズマ症の管理（水上尚典ほか）	111
18. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin(TCDD)の絨毛細胞における glucose transport protein発現に関する研究（遠藤俊明ほか）	115
19. ヒト無精子症原因候補遺伝子であるヒト <i>MEI1</i> 遺伝子に関する研究（石川睦男ほか）	119

I. はじめに

今年度（平成 17 年度）より新規研究として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」の主任研究者として旧課題研究を引継ぎ、研究開始から 4 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。今後も母体血中や臍帯血中の PCB 類や農薬などの環境汚染物質を分析測定し、アウトカムである出産時の児の異常の有無や胎児発育への影響、あるいは生後数年間、児を追跡することによりアレルギー発症への影響について詳細に調べていく予定です。また、新たに北大教育学研究科ならびに札幌医大保健医療学部の先生方のご協力も得て神経発達の評価にも力を入れる予定です。

加えて化学物質の個体への影響の強弱については曝露された個体の異物（薬物）代謝酵素類の遺伝的多型にも影響を受けることが考えられます。この点についてもダイオキシンや喫煙などについてさらに検討していく予定です。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。

本研究は北海道内広範囲に分布する産婦人科医療機関の御協力が進められています。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分かります。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はありませんが、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、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 18 年 3 月

主任研究者 水上 尚典

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 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

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と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18年1月までの本研究への参加妊婦数は、累計9721人であった。このうち平成16年12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1789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負の関連がみられ、子宮内発育遅延（IUGR）のリスクが上昇した（オッズ比（OR）2.6、95%信頼区間（CI）1.3-5.0）。また*MTHFR*遺伝子C677T及びA1298C多型のそれぞれの遺伝子型と低出生体重（LBW）、IUGR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、胎児の発育に負の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。

有機フッ素系化合物（PFCs）は、生体内における蓄積性が高く、また臍帯血を介して胎児へ移行する可能性があることから次世代への影響が懸念されている。オンライン固相抽出-LC/MS/MS法を用いて母体血447検体を分析した結果、PFOS及びPFOAがそれぞれ100%、93.1%と高い頻度で検出された。これらの化合物は妊娠する度に減少していく傾向が見られた。

血液及び母乳中のダイオキシン類分析のため最新の技術と機器を導入し、血液5g、母乳2gからダイオキシン類濃度を正確に測定できる分析法を確立した。この方法を用いて、母体血（末梢血、妊婦70名分）と母乳（60名分）を採取し、血液及び母乳中のダイオキシン類濃度（PCDDs7種、PCDFs10種、ノンオルソCo-PCB4種 合計21種）を異性体別に測定した。その結果、母体血中ダイオキシン類平均濃度は13.42 pg-TEQ/g lipid及び母乳中ダイオキシン類平均濃度は11.23 pg-TEQ/g lipidであった。ダイオキシン類の分析を行った母体血サンプルについて、CYP1ファミリーのmRNA発現量の定量を行い、その相関性について明らかにした。本研究対象者456人の毛髪水銀濃度は、平均1.5ppm、最小値0.24ppm、最大値7.55ppmであった。また母体血中PCDDs、PCDFs、Coplanar PCBs濃度と毛髪水銀濃度の関連では、Total Non-orthoPCBs、Total Mono-orthoPCBs、Total Coplanar PCBsにおいて有意（ $P < 0.05$ ）な正相関が見られた。マイクロアレイ法において*CYP1A1*I462V、*CYP1B1*L432V、

GSTP1 I105V、*AhR* R554K 遺伝子多型について妥当性を得ることができた。また、喫煙群では、各血中 PCB 類濃度が非喫煙群と比較して有意に低い値を示した。*CYP1B1* L432V、*GSTP1* I105V と血中ダイオキシン TEQ 値との間で、有意ではなかったが相関傾向がみられた。母体血中におけるダイオキシン濃度と臍帯血 IgE との関連を検討したところ、全血液中濃度では 2,3,7,8-TCDD、1,2,3,6,7,8-HxCDF、Total PCDF、Total PCDDs-TEQ、Total PCDFs-TEQ、Total PCDDs/PCDFs-TEQ、Total dioxins-TEQ と、血液脂質中濃度では 2,3,7,8-TCDD、Total Coplanar PCB、Total dioxins、Total PCDDs-TEQ、Total PCDDs/PCDFs-TEQ、Total dioxins-TEQ にて有意な負の相関が認められた。

前向きコホート研究と並行して、尿道下裂、停留精巣、IUGR/LBW、不育症（習慣流産）、不妊症の症例対照研究も実施した。エストロゲン活性に影響を与えることが示唆されている *CYP17*、*CYP19*、*ESR1*、葉酸代謝に係わる *MTHFR* と尿道下裂との関連を明らかにするために、症例 62~92 名、対照 215~233 名で症例対照研究を行なったところ、*CYP19*R264C 部位において、R/R 型と比較して (R/C + C/C) 型では有意にオッズ比が上昇した (OR = 1.65、95% CI = 1.01-2.71)。さらに、*CYP17*Msp I 部位の遺伝子型と *CYP19* R264C 部位の遺伝子型と尿道下裂との関連について解析を行った結果、A1/A1 型+R/R 型と比較して、(A1/A2 + A2/A2) 型+ (R/C + C/C) 型の組み合わせでは、尿道下裂に対する有意なオッズ比の上昇がみられた (OR = 2.92、95% CI = 1.24-6.88)。*MTHFR*A1298C ヘテロ接合(1298AC)で強い関連がみられ、677CT/1298AC の組み合わせで、単独の遺伝子との関連よりもより強いオッズ比の上昇がみられた (OR = 4.0、95% CI = 1.03-15.84)。*CYP17*、*ESR1* 単独では有意な関連はみられなかった。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 33 症例と尿道下裂既往のない 18 歳以上の男性 50 例と比較すると、尿の切れに関して、対照群では 97% が良好と回答したが、症例群では良好と回答したのは 68% であり、有意な差を認めた。

2001~2005 年に単胎児を出産した女性 412~452 名を対象に、*COMT*Val158Met、*IL1A*A114S 及び *IL1B*-511C/T 多型と LBW/IUGR、早産 (PTB) との関連を調べたところ、*COMT* の低活性アリルをホモ接合 (Met/Met) に持つ女性の LBW に対する OR は 2.98 (95% CI=1.10-8.11)、IUGR に対する OR は 2.63/2.57 (95% CI=1.14-6.05/0.96-6.88) であった。*IL1A*A114S の多型については G/T、T/T 型のオッズ比が PTB との関連で 2.67、2.49、LBW との関連で 2.23、2.36 とそれぞれ上昇した。また、T/T 型のみ IUGR との関連で 2.88(10 パーセントイル)、4.55(-1.5SD)と、オッズ比が上昇した。不育症 (習慣流産) 症例 (n=215)、健常経産婦 (n=420) を対象とし、*PAPPA* 遺伝子 C3671A 多型と習慣流産との関連を調べた。3671C アリルを持つ女性は習慣流産のリスクが高まる傾向がみられ、特に、少なくとも 1 回、妊娠 9 週以降に流産を経験するリスクは有意に上昇した (AA 型に対する AC 型の OR, 1.54; 95% CI, 0.95-2.49; CC 型の OR, 2.83; 95% CI, 1.00-8.05; P trend, 0.02)。

さらにトキソプラズマ感染検査法、絨毛癌株を用いたダイオキシン添加実験、男性不妊の遺伝的要因の検討を行なった。妊娠初期にトキソプラズマ抗体 (HA) が陽性で、かつ IgM 抗体が陽性の妊婦に対して、母体血トキソプラズマ IgG avidity を測定し、初感染時期を判断するためのトキソプラズマ IgG avidity 検査とトキソプラズマ PCR 検査法の有用性を示した。絨毛癌株を用いたダイオキシン添加実験では、glucose transport protein (GLUT) m-RNA および蛋白発現は一時的に抑制され、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。ヒト無精子症に何らかの関与をしているのではないかと考えられる *MEI1* 遺伝子の 4 部位の一塩基多型 (SNP) のうち 2 部位において、無精子症患者群と正常コントロール群の頻度差がみられ、ヒトの精子形成過程における減数分裂において重要な役割を担っていることが提言された。

【分担研究者】

遠藤 俊明

札幌医科大学産婦人科学講座助教授

石川 睦男

旭川医科大学病院長

櫻木 範明

北海道大学大学院医学研究科生殖・発達医学講座婦人科学分野教授

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】

岸 玲子、西條 泰明、坂 晋

竹田 誠、佐々木成子、加藤 静恵

中島そのみ、小西 香苗、鷺野 考揚

鈴木 佳奈、東 倫子、松澤 重行

戸屋 真吾、近藤 朋子、森 ゆうこ

倉橋 典絵、森岡 三果、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

山田 俊、長 和俊 太田智佳子

北海道大学病院周産母子センター

斉藤 豪、林 卓宏

札幌医科大学産婦人科学講座

千石 一雄、宮本 敏伸

旭川医科大学産婦人科学講座

田熊 直之

旭川医科大学病院周産母子センター

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

石塚 真由美、Gihan Gamal El Sayed Moustafa

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、伊藤 里恵、岩崎 雄介

仲田 尚生、勝又 常信、中田 彩子

星薬科大学薬品分析化学講座

吉村 健清、中川 礼子、松枝 隆彦

梶原 淳睦、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、五輪橋産科婦人科小児科病院、市立札幌病院、札幌医科大学附属病院、札幌厚生病院、札幌東豊病院、札幌徳州会病院、市立土別総合病院、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、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、市立函館

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、朋佑会札幌産科婦人科、北海道社会保険病院、北海道大学病院、公立芽室病院、道立紋別病院、市立稚内病院（平成18年3月まで）

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*）を指標とする感受性素因と児への影響（出生時体重）との関連の検討を行った。併せて高感度微量測定法で測定した有機フッ素系化合物、PCB・ダイオキシン類、水銀などの曝露指標と異物代謝酵素遺伝子の発現、児の成長や免疫系への影響の検討も行なった。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た。

B. 研究方法

1. 尿道下裂リスクと胎児の *ESR1*, *CYP17*, *CYP19* 遺伝子多型との関連

1. 対象

症例は、2000～2005年に北海道、埼玉県、愛知県、徳島県の泌尿器科4施設で尿道下裂の手術を行った患児92名を対象とした。

対照として、北海道の産婦人科で出生した先天異常を有しない健常男児215名とした。

2. 方法

症例と対照の血液から抽出したDNAを用いて、*ESR1*のPvu II部位ならびにXba I部位、*CYP17*のMsp I部位、*CYP19*のR264C遺伝子多型をTaqMan法で判別し、疾患との関連をロジスティック回帰分析により解析した。

2. 尿道下裂リスクと葉酸代謝遺伝子多型

MTHFRとの関連

1. 対 象

症例は、2000～2004年に北海道・埼玉県・愛知県・徳島県の泌尿器科4施設（大学病院：2、一般病院：2）で尿道下裂の手術の既往のある児62人とその母39人とし、対照は、北海道内の産婦人科19施設で出生した先天異常を持たない男児233人とその母233人とした。

2. 方 法

- ① 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。
- ② 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。
- ③ 症例の児は手術時に、母は児の入院中に、2 mlの末梢血を採取し、DNA抽出を行った。また、対照の児は出産時臍帯血を採取し、母は出産時に2 mlの末梢血を採取し、DNA抽出を行った。*MTHFR*の遺伝子多型C677T、A1298Cは、リアルタイムPCR法で解析した。
- ④ 母親の出産時年齢、妊娠中の喫煙、妊娠中の飲酒、教育歴、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。

3. 尿道下裂修復術の長期予後に関する研究－排

尿症状に関する検討－

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。

方法は症例群と対照群に、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、現在の排尿症状（尿線の方向・尿勢・頻尿の有無・尿の切れ・排尿姿勢）に対して、質問した。解析はt検定、カイ自乗検定を行った。

4. 唇裂口蓋裂リスク要因に関する文献研究

唇裂口蓋裂（OFC）のリスク要因に関する疫学研究を1966年にさかのぼってPubMedを利用して検索した。フィールド限定検索を用いてヒトを対象とする文献のみを対象とした。

5. 妊婦の血清葉酸値が胎児の発育に及ぼす影響について

6. 妊婦の血清葉酸値を低下させる要因について

1. 対 象

前向きコホート研究を設定し、平成15年1月から平成16年12月までに北海道の39産科施設に通院中で、本調査に同意を得た妊婦1789人を対象とした。

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 出生時体重と血清葉酸値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）を独立変数として重回帰分析を行った。さらに子宮内発育遅延を従属変数とし、母親の出産時年齢、妊娠前BMI、喫煙、教育歴および妊婦の血清葉酸値（四分位）を共変量として、ロジスティック回帰分析を行った。
- ④ 妊婦の血清葉酸値を低下させる要因を明らかにするために、血清葉酸値を従属変数とし、出産歴、妊娠前BMI、出産時年齢、母教育歴、*MTHFR* C677TとA1298Cを独立変数とし、重回帰分析を行った。さらに、喫煙と*MTHFR*

の組み合わせが児の出生時体重に及ぼす影響については、児の出生時体重と関連する、在胎週数、児性別、出産歴、妊娠前 BMI で調整し重回帰分析を行った。

7. 葉酸の経口摂取状況に関する文献研究

食事調査および、サプリメントによる葉酸の経口摂取量、血液中の葉酸値及び喫煙の食生活に対する影響に注目し、1950 年にさかのぼり、MEDLINE にて文献検索し、レビューを行なった。

8. バイオマーカー cytochrome P450 に関する研究

札幌市内病院より妊婦の母体血を採集し、Total RNA は TriReagent (Sigma-Aldrich) を用いて抽出した。TaqMan Probe (ABI: Applied Biosystem, Inc) を用いて、real-time RT-PCR によって CYP1A1 の mRNA 発現レベルを測定した。

9. オンライン固相抽出ー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母体血中有機フッ素系化合物の分析及び次世代影響の検討

生体曝露評価に応用できる迅速かつ高感度・高精度な分析法を開発し、本法を北海道在中妊婦 447 名の血液の分析に応用し、得られた結果をもとに、次世代への影響について検討した。

10. 血液及び母乳中のダイオキシン類の濃度

2004 年に採取した 70 件の妊婦母体血と 60 件の母乳中ダイオキシン類を、超高感度精密分析法で測定した。

11. 母体血中 PCB・ダイオキシン類濃度と毛髪水銀濃度の検討

対象者は、札幌市の一般病院・産科を受診した妊娠 23 週～35 週の妊婦で、母子 514 組を対照とした。妊婦とその配偶者に対して、既往歴、学歴、経済状況、生活環境、食品摂取状況などに関する質問紙調査を行った。

出産後 1 週間以内に母親の毛髪採取を行い、原

子吸光法により総水銀濃度を求めた。

解析には、毛髪水銀データ 430 人、前年度測定した母体血中 PCB 類・ダイオキシン類データ 200 人のデータを用いた。

12. マイクロアレイを用いた遺伝子多型、喫煙と PCB・ダイオキシン濃度との関連

1. 対象

対象者は札幌市内の産科において、インフォームドコンセントを得られた妊娠約 200 名である。リクルート時に自記式調査票にて、喫煙の有無を調べた。また、遺伝子多型判定ならびに血中ダイオキシン、PCB 類濃度を測定するために、血液を採取した。

2. 遺伝子多型判定の妥当性評価

我々は、これまで P450 として *CYP1A1*、*CYP1A2*、*CYP1B1*、*CYP2A6*、*CYP2C19*、*CYP2D6*、その他の薬物代謝酵素や調整因子として、GSTP1、NAT2、AhR、PPAR γ の 10 遺伝子、28 アレルをスポットした試験版ガラスアレイと Multiplex-PCR 法を用いたマイクロアレイ法を開発した。このマイクロアレイ法の妥当性を、約 200 サンプルについて、遺伝子多型の判別としては信頼性の高い TaqMan 法ならびに Allelic discrimination 法を用いた結果から κ 統計量を計算し、一致率の検定を行うことにより、検討した。

3. 各遺伝子多型、喫煙と血中ダイオキシン、PCB 類との関連

上記の評価で、妥当と判断した遺伝子ならびに喫煙の有無について、遺伝子多型と血中ダイオキシン、PCB との関連を二元配置分散分析により検討した。

13. 母体血 PCB・ダイオキシン類と臍帯血 IgE との関連

札幌市内において調査協力が得られた産婦人科医院を受診した妊婦のうち、PCB・ダイオキシン

類と臍帯血 IgE のともにそろった 97 例を対象とし、母体血 PCB・ダイオキシン類と臍帯血 IgE との関連を検討した。

14. 母親の機能性カテコール-O-メチル転移酵素 遺伝子多型と胎児発育遅延

15. 早産, 低出生体重, 子宮内発育遅延と *IL1A*, *IL1B* 遺伝子多型との関連

2001～2005 年に北海道大学病院で単胎児を出産し、本研究に参加することに同意の得られた女性 412 および 452 名を対象とした。対象者の末梢血白血球より DNA を抽出し、allelic discrimination assay によって *COMT* Val158Met, *IL1A*A114S, 及び *IL1B*-511C/T 多型の遺伝子型を判定した。この多型と低出生体重 (LBW, 2,500g 未満) と IUGR (10 パーセントイル未満/−1.5 標準偏差 (SD) 未満) との関連をロジスティック回帰分析により解析し、出生体重との関連を重回帰分析により解析した。

16. 習慣流産リスクと妊娠関連血漿蛋白 A 遺伝子 多型

北海道大学病院産科の不育症外来を受診した女性 (n=215) を症例、産後外来を受診した健常経産婦 (n=420) を対象とし、症例対照研究を行った。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、*PAPPA* 遺伝子 C3671A 多型を、リアルタイム PCR 法で解析し、習慣流産との関連をロジスティック回帰分析で解析した。

17. IgG avidity と PCR 法を用いた先天性トキソ プラズマ症の管理

2004 年の北海道における地域別の抗体陽性率 (HA 抗体, IgM) を調べ、比較検討した。前方視的研究として、妊娠初期にトキソプラズマ抗体 (HA) が陽性で、かつ IgM 抗体が陽性の妊婦に対して、同意を得て母体血トキソプラズマ IgG avidity を測定 (IDL) した。また、母体血、羊水、

出生時の臍帯血を採取し、PCR 法 (Nested PCR) でトキソプラズマの有無を検討し、新生児感染の有無を調べた。

18. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) の絨毛細胞における glucose transport protein 発現に関する研究

絨毛癌細胞株 JAR, JEG-3 を 10% fetal bovine serum 加え、RPMI1640 にて培養した。単離浮遊細胞を 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。培養細胞の分化程度を決定するため、上清の β -hCG 濃度を測定した。培養細胞を ISOGEN にて処置し、その溶解液から total RNA を採取し、RT-PCR を施行した。細胞溶解から蛋白質を抽出し、GLUT 各種抗体を作用させた。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 NIH image にて画像解析した。

19. ヒト無精子症原因候補遺伝子であるヒト *MEI1* 遺伝子に関する研究

ヒト *MEI1* 遺伝子とヒト無精子症の関係を解析するために、アメリカ人患者 13 名及びイスラエル人患者 13 名、計 26 名の患者 DNA を用いて mutation 解析を施行した。mutation 解析により 4 つの新たな single-nucleotide polymorphism (SNP1, 2, 3, 4) を同定した。これらの SNP に関して、無精子症患者群と正常コントロール群においてその頻度の差を Fisher's exact test を用いて有意差検定した。

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. 尿道下裂リスクと胎児の *ESR1*, *CYP17*, *CYP19* 遺伝子多型との関連

1. *ESR1* (PvuII 部位ならびに XbaI 部位) と尿道下裂との関連

Pvu II 部位については、尿道下裂との有意な関連は見られなかった。また、Xba I 部位については、x/x 型と比較して X/x 型、X/X 型、および (X/x+X/X) 型では、それぞれオッズ比の減少傾向がみられたが有意ではなかった。

さらに、*ESR1* の Pvu II 部位の遺伝子型と Xba I 部位の遺伝子型の組み合わせと尿道下裂との関連について解析を行った。p/p 型+x/x 型の組み合わせと比較して、(P/p + P/P) 型+ (X/x + X/X) 型の組み合わせでは、オッズ比の減少傾向がみられたが有意ではなかった。

2. *CYP17* Msp I 部位ならびに *CYP19* R264C 部位と尿道下裂との関連

CYP17 Msp I 部位については、A1/A1 型と比較して、A1/A2 型、A2/A2 型、および (A1/A2 + A2/A2) 型ではそれぞれオッズの上昇傾向がみられたが有意ではなかった。また、*CYP19* R264C 部位では、R/R 型と比較して (R/C + C/C) 型では有意にオッズ比が上昇した (OR = 1.65, 95% CI = 1.01 - 2.71)。

次に、*CYP17* Msp I 部位の遺伝子型と *CYP19* R264C 部位の遺伝子型と尿道下裂との関連について解析を行った。A1/A1 型+R/R 型と比較して、A1/A1 型+ (R/C + C/C) 型の組み合わせ、ならびに (A1/A2 + A2/A2) 型+R/R 型の組み合わせでは、

尿道下裂との有意な関連はみられなかったが、(A1/A2 + A2/A2) 型+ (R/C + C/C) 型の組み合わせでは、尿道下裂に対する有意なオッズ比の上昇がみられた (OR = 2.92, 95% CI = 1.24-6.88)。

2. 尿道下裂リスクと葉酸代謝遺伝子多型 *MTHFR* との関連

1. 基本的属性

症例と対照で、母親の出産時年齢、母親の BMI、教育歴では有意な差は見られなかった。出生時体重は、症例で有意に低く、在胎週数も症例で有意に低かった。

2. 母体要因、児要因のオッズ比

母親の年齢 35 才以上の割合、母親の BMI 2.5 以上の割合、母親の妊娠中の喫煙の有無、母親の教育歴では、では有意な関連は見られなかった。

児の低出生体重で OR=31.3 (95%CI=13.85 - 70.51)、早産で OR=8.0 (95%CI=3.74 - 17.21) と、有意なオッズ比の上昇が見られた。

3. 遺伝子多型オッズ比

母親の *MTHFR* C677T 遺伝子型と A1298C 遺伝子型では、有意な関連は見られなかった。児の C677T 遺伝子型では 677CT の割合が症例で多かったが、有意な関連は見られなかった。A1298C 遺伝子型では、母出産時年齢、母親の教育歴、妊娠中の喫煙、出生時体重、在胎週数で調整しても、1298AC で有意なオッズ比の上昇が見られた。

2 つの遺伝子の組み合わせでは、児の 677CT/1298AC で症例の割合が高く、有意なオッズ比の上昇が見られた。同様に母親についても解析を行ったが、有意な関連は見られなかった。

3. 尿道下裂修復術の長期予後に関する研究－排尿症状に関する検討－

返却率は尿道下裂症例群 22/33 例(66.7%)、対照群で 38/50 例(76.0%)であった。質問表を返却した症例群 22 例の尿道下裂の程度は distal type 9 例、

proxymal type 11例、不明3例と比較的程度の強い症例が多かった。

1. 尿線の方向

尿線が真直ぐであると回答したのは尿道下裂症例群で77.2%、対照群で71.1%とほぼ同様であった。その他の尿線の方向は、尿道下裂症例群で右:4.5%・左:9.1%・無回答:9.1%、対照群では右:7.9%・左:10.5%・飛び散る:2.6%であった。

2. 尿勢

尿勢に関しては、“非常に良い”“良い”“普通”“悪い”“非常に悪い”の5段階で質問したが、尿道下裂症例群・対照群とも全例で普通以上の尿勢であると回答した。

3. 頻尿

頻尿については“全く困らない”“困らない”“困っている”“非常に困っている”の4段階で質問した。尿道下裂症例群の95.5%、対照群で89.5%の“全く困らない”あるいは“困らない”と回答した。

4. 排尿姿勢

“立位で排尿する”“主に立位で排尿するが時々座位で排尿する”との回答が尿道下裂症例群の90.9%、対照群で84.2%で得られた。

5. 尿の切れ

“良い”あるいは“あまり良くはないが困っていない”と回答したのが、尿道下裂症例群で68.2%、対照群で97.4%であり、有意に尿道下裂群で少なかった($p<0.01$)。

4. 唇裂口蓋裂リスク要因に関する文献研究

本疾患では、以前は環境要因それぞれの発症リスク評価、染色体異常や奇形症候群の一症状としての検討が研究の中心であった。しかし最近の10年で本疾患の候補遺伝子が次々に明らかにされ、環境要因と遺伝要因の相互作用への研究が進み始めている。また葉酸を含むサプリメントの開発、普及に伴って、これを用いた発症予防の可能性についての研究がさかんになっている。

5. 妊婦の血清葉酸値が胎児の発育に及ぼす影響について

1. 基本的属性

初産、経産婦の割合は、ほぼ同じであった。喫煙群は16.0%を占めていた。低出生体重児（出生時体重が2500g未満）128人中34人(7.2%)であり、早産（在胎週数37週未満の出産）の児は、70人(3.9%)、子宮内発育遅延児（mean-1.5SD、厚生労働省ハイリスク母児管理研究班、1983年）であった。

2. 葉酸値と出生時体重との関連

出生児体重を従属変数とし、妊婦の血清葉酸値（四分位）、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、喫煙を独立変数として、変数固定法で重回帰分析を行った。その結果、喫煙、新生児性別、在胎週数、出産経歴、妊娠前BMIにおいて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以下の群と出生時体重との間に負の関連が見られた。

子宮内発育遅延を従属変数とし、母親の出産時年齢、妊娠前BMI、喫煙、教育歴および妊婦の血清葉酸値（四分位）を共変量としてロジスティック回帰分析を行った。その結果、葉酸値が5.7ng/ml以下の群で子宮内発育遅延のオッズ比2.6（95%CI1.3-5.0）と有意にリスクが上昇した。

6. 妊婦の血清葉酸値を低下させる要因について

1. 基本的属性

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。MTHFR C677T多型とA1298C多型はハーディー・ワインバーグ平衡に従っていた。

2. 妊婦の血清葉酸値を低下させる要因

妊婦の血清葉酸値は喫煙群とMTHFR C677T多型の変異型Tアレルを持つ群では血清葉酸値と

有意な負の関連がみられた。また、出産時年齢及び母親の教育歴と血清葉酸値はそれぞれ有意な正の関連がみられた。

3. *MTHFR*多型の組み合わせが児の出生時体重に及ぼす影響

C677T 多型の野生型ホモ接合非喫煙群と比較して、変異型 T アリルを持つ群では非喫煙群、禁煙群、喫煙群いずれにおいても児の出生時体重に有意な差が見られた。交絡要因と考えられる（児の出生時体重と有意な関連があった）、在胎週数、児性別、出産歴、母親の妊娠前 BMI で調整すると、T アリルを持つ群では非喫煙群では正の、喫煙群では負の有意な関連がみられた。A1298C 多型では、多型よりも喫煙が強い影響を及ぼしていた。

7. 葉酸の経口摂取状況に関する文献研究

先行研究の対象者の食品による葉酸経口摂取量は 51.4 $\mu\text{g}/\text{d}$ ～356 $\mu\text{g}/\text{d}$ であった。これら対象者の血清・血漿葉酸濃度は 2.1 ng/ml ～11.9 ng/ml であった。血清葉酸値は食事による葉酸経口摂取量が多い方が、血中葉酸値濃度の上昇が見られた。サプリメント投与群の血清・血漿葉酸値は 7.4 ng/ml ～11.24 ng/ml であった。葉酸サプリメントを投与した群において、血中葉酸値濃度の上昇が見られた。喫煙群と非喫煙群において、妊娠第 1 期における血漿葉酸値の平均値は禁煙群で 12.2 nmol/l 、喫煙群 8.2 nmol/l 、妊娠第 2 期における血漿葉酸値については禁煙群で 11.1 nmol/l 、喫煙群で 6.4 nmol/l 、妊娠第 3 期における禁煙群の血漿葉酸値は 12.1 nmol/l 、喫煙群では 4.1 nmol/l 、妊娠第 4 期における血漿葉酸値は禁煙群で 9.3 nmol/l 、喫煙群では 3.7 nmol/l と、全体を通して喫煙群は禁煙群に比べて血漿葉酸値は低下していた。妊婦の年齢や教育歴により、食生活を含む生活習慣の違いがあり、それが葉酸経口摂取量の差として見られた可能性がある。

8. バイオマーカー-cytochrome P450 に関する研究

妊婦 61 人の血液に発現する CYP1A1mRNA 発現レベルと PCDD の TEQ 値 との関連は、直線回帰相関係数 $R=0.689$ 、 $P=0.0247$ であった。レベルについては、直線回帰で相関係数 $R=0.802$ 、 $P<0.0001$ であった。PCDD および PCDF の合計 TEQ 値と CYP1A1mRNA レベルとの関係は、直線回帰で $R=0.746$ であった。また、ノンオルソ及びモノオルソ co-PCB の TEQ 値と CYP1A1mRNA 発現レベルについては直線回帰で、相関係数 $R=0.751$ 、 $P<0.0001$ であった。PCDD、PCDF、co-PCB の総 TEQ 値と CYP1A1mRNA の相関は、直線回帰で、相関係数 $R=0.855$ 、 $P<0.0001$ であった。

9. 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母体血中有機フッ素系化合物の分析及び次世代影響の検討

1. 母体血（血漿）の測定結果

本分析法を用いて、北海道在住妊婦ボランティア 447 名の母体血（血漿）を測定した。PFOS は全ての検体から、PFOA 及び PFNA に関してはそれぞれ、93.1%、43.9%の検体から検出された。また、検出範囲は、PFOS は 1.3～16.2 ng/ml 、PFOA は N.D. ($<0.5 \text{ ng}/\text{ml}$)～5.2 ng/ml 、PFNA は N.D. ($<0.5 \text{ ng}/\text{ml}$)～1.6 ng/ml であった。PFOSA 及び PFDA に関しては、ほとんど検出されることがなく、また検出されても定量限界 (0.5 ng/ml) 付近と極微量であった。

2. 次世代影響の検討

血中 PFOS 及び PFOA 濃度と妊娠期間及び新生児の発育との関連性について調査したところ、新生児の発育とは関連性は得られなかったものの、妊娠回数の増加に伴って、母体血中 PFOS 及び PFOA 濃度が減少していく傾向が見られた。

10. 血液及び母乳中のダイオキシン類の濃度

分析した妊婦母体血 70 件の中 1 件の 33'44'

TCB(#77)が 474.8pg/g lipid という極端な高濃度を示した。異常値を除いた 69 件の妊婦母体血と 60 件の母乳中ダイオキシン類の分析した。

妊婦 69 名の内訳は初産婦 35 名、経産婦 34 名であった。全体平均年齢は 30.9 歳で初産婦の平均年齢は 29.0 歳、経産婦では 32.8 歳であった。血中脂質含量は全体平均 0.38%であった。血中ダイオキシン類濃度を TEQ 値で見ると、PCDDs、PCDFs、ノンオルソ-Co-PCBs および Total TEQ 平均値は、それぞれ、6.34、3.22、3.83 および 13.41pg-TEQ/g lipid であった。

母乳を採取した母親 60 名の内訳は初産婦 30 名、経産婦 30 名であり、平均年齢は 30.1 歳と 32.2 歳、全体では 31.2 歳であった。母乳の平均脂質含量は 3.97%であった。母乳中ダイオキシン類濃度を TEQ 値で見ると、PCDDs、PCDFs、ノンオルソ-Co-PCBs および Total TEQ 平均値は、それぞれ、4.58、2.89、3.77 および 11.23pg-TEQ/g lipid であった。

11. 母体血中 PCB・ダイオキシン類濃度と毛髪水銀濃度の検討

毛髪水銀濃度データあるいは母体血中 PCB・ダイオキシン類濃度データがあった対象者は 456 人であり、解析対象者とした。解析対象者の分娩時年齢は平均で 30.7 歳 (SD±4.9)、初産婦 220 人 (48.2%)・経産婦 236 人 (51.8%) であった。

本調査対象者の毛髪水銀濃度は、平均 1.5ppm、最小値 0.24ppm、最大値 7.55ppm であった。

母体血中 PCB・ダイオキシン類濃度と毛髪水銀濃度の関連を重回帰分析にて検討した。Total Non-ortho PCBs、Total Mono-ortho PCBs、Total Coplanar-PCBs、Total dioxins において有意な関連がみられた。TEQ においても同様に Total Non-ortho PCBs、Total Mono-ortho PCBs、Total Coplanar-PCBs において有意な関連がみられた。Total PCDDs、Total PCDFs、Total PCDDs/PCDFs においては水銀との関連は見られず、この傾向は TEQ においても同様であった。

また、母体血中 PCB・ダイオキシン類濃度および母親毛髪水銀濃度と魚の推定摂取量との関連を重回帰分析にて検討した。Total Non-ortho PCBs、Total Mono-ortho PCBs、Total Coplanar-PCBs、Total dioxins と、母親の毛髪水銀濃度において有意な関連がみられた ($P<0.01$)。TEQ においても同様の傾向であった。

12. マイクロアレイを用いた遺伝子多型、喫煙と PCB・ダイオキシン濃度との関連

1. マイクロアレイ法による遺伝子多型判定の妥当性評価

試験版ガラスアレイにスポットした 10 遺伝子、28 アレルのうち、*CYP2A6* I471T、*NAT2* R197Q、*NAT2* G286E、*CYP2C19* 681G> A については、安定した発色を得ることができなかった。*CYP1A1* I462V、*CYP1B1* L432V、*GSTP1* I105V、*AhR* R554K については、安定した発色を得ることができたため、信頼性の高い TaqMan 法ならびに Allelic discrimination 法での結果を比較した。その結果、*CYP1A1* I462V、*CYP1B1* L432V、*GSTP1* I105V、*AhR* R554K について、(一致率、 κ 係数) はそれぞれ (0.97、0.94)、(0.95、0.86)、(0.86、0.66)、(0.93、0.89) であった。

2. 各遺伝子多型、喫煙と血中ダイオキシン、PCB 類との関連

上記の評価で、妥当と判断した遺伝子ならびに喫煙の有無について、遺伝子多型と血中ダイオキシン、PCB との関連を解析した結果、各血中ダイオキシン類 TEQ 値 (Total PCDDs-TEQ 値、Total PCDFs-TEQ 値、Total PCDDs/PCDFs-TEQ 値) は、喫煙群では、非喫煙群と比較して低い傾向がみられたが、有意な相関ではなかった。また、各血中 PCB 類 TEQ 値 (Total Nonortho PCBs-TEQ 値、Total Monoortho PCBs-TEQ 値、Total Coplanar PCBs-TEQ 値) ならびに Total-TEQ 値は、喫煙群では非喫煙群と比較して、有意に低い値であった。

また、*CYP1A1* I462V 遺伝子多型と、各血中ダイオキシン、PCB 類濃度との間には、関連はみられなかった。

次に、*CYP1B1* L432V 遺伝子多型と各血中ダイオキシン、PCB 類濃度との相関を調べた結果、Total PCDDs-TEQ 値、Total PCDDs/PCDFs-TEQ 値、Total-TEQ 値は、有意ではなかったが、(L/V + V/V) 型では、L/L 型と比較して低い傾向がみられた。また、Total PCDFs-TEQ 値は、(L/V + V/V) 型では、L/L 型と比較して有意に低い値であった (L/L: 1.39 ± 0.40 , L/V + V/V: 1.24 ± 0.39 , $P = 0.03$)。 *CYP1B1* L432V 遺伝子多型と各血中 PCB 類濃度との間には、関連はみられなかった。

GSTP1 I105V 遺伝子多型と各血中ダイオキシン、PCB 類濃度との相関を調べた結果、Total PCDDs-TEQ 値、Total PCDFs-TEQ 値、Total-TEQ 値は、有意ではなかったが、(I/V + V/V) 型では、I/I 型と比較して低い傾向がみられた。また、Total PCDDs/PCDFs-TEQ 値は、(I/V + V/V) 型では、I/I 型と比較して有意に低い値であった (I/I: 2.43 ± 0.38 , I/V + V/V: 2.28 ± 0.46 , $P = 0.04$)。 *GSTP1* I105V 遺伝子多型と各血中 PCB 類濃度との間には、関連はみられなかった。

また、*AhR* R554K 遺伝子多型と、各血中ダイオキシン、PCB 類濃度との間には、関連はみられなかった。

いずれの遺伝子多型においても血中ダイオキシン、PCB に対して、多型と喫煙との間に交互作用はみられなかった。

14. 母親の機能性カテコール-O-メチル転移酵素遺伝子多型と胎児発育遅延

低活性アリル (*COMT-L*) をホモ接合 (Met/Met) に持つ女性の LBW に対するオッズ比 (OR) は、2.98、95%信頼区間 (CI) は 1.10–8.11、IUGR に対する OR は、2.63/2.57、95%CI は 1.14–6.05/0.96–6.88 であり、出生体重とも負の関連傾向がみられた。

15. 早産、低出生体重、子宮内発育遅延と *IL1A*、*IL1B* 遺伝子多型との関連

早産との関連について、カイ二乗検定を行ったところ、出生体重 ($P < 0.01$)、*IL1A* A114S ($P = 0.02$) が有意な結果となった。

IL1A A114S、*IL1B* C-511T と PTB、LBW、IUGR についてロジスティック回帰分析を行った (年齢、出産歴、出産児の性別で調整)。

IL1A A114S は G/T、T/T 型において、PTB (2.67, 2.49)、LBW (2.23, 2.36) のオッズ比が上昇した。また、T/T 型のみ IUGR 2.88 (10 パーセントイル)、4.55 (-1.5SD) のオッズ比が上昇した。

一方、*IL1B* -511 は PTB、LBW、IUGR ともに有意な結果は得られなかった。

16. 習慣流産リスクと妊娠関連血漿蛋白 A 遺伝子多型

PAPPA 3671C アリルを持つ女性は習慣流産のリスクが高まる傾向がみられた (AA 型に対する AC 型の OR, 1.17; 95% CI, 0.82-1.68; CC 型の OR, 2.06; 95% CI, 0.87-4.90; P trend, 0.10)。特に、少なくとも 1 回、妊娠 9 週以降に流産を経験するリスクは有意に上昇した (AA 型に対する AC 型の OR, 1.54; 95% CI, 0.95–2.49; CC 型の OR, 2.83; 95% CI, 1.00–8.05; P for trend, 0.02)。

17. IgG avidity と PCR 法を用いた先天性トキソプラズマ症の管理

1) 妊婦における HA 抗体陽性率と HA 抗体

陽性者中の IgM 陽性率は、各々 2.7~5.0%、9.1~27% であった。妊婦において初感染が疑われる IgM 陽性者の率は、0.4~1.1% と計算された。したがって、1000 妊婦中、4~11 人に初感染が疑われ、精査・治療対象となり得ることが判明した。

現在まで、HA 抗体陽性かつ IgM 陽性の 25 妊婦において、トキソプラズマ IgG avidity 値は、3~80% を示した。

Nested PCR 法では、検体あたり数~10 ゲノムコピーで診断が可能で、30 例の陰性コントロー

ルでは、すべて陰性であった。3 症例において、母体血トキソプラズマ PCR が陽性であった（陽性率 12%）。

18. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) の絨毛細胞における glucose transport protein 発現に関する研究

1. 細胞増殖および β hCG 分泌量

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、JEG-3 細胞株細胞株の細胞数 10^5 個あたりの β hCG 分泌量を検討したところ、コントロールと比較し変化はなかった。

2. GLUT1、3 および 12 m-RNA の発現

JAR、JEG-3 細胞株ともに、GLUT1 および 3 m-RNA 発現を認め、TCDD 添加による m-RNA 発現変化は認めなかった。

3. GLUT4 m-RNA の発現

JEG-3 細胞株において、TCDD 1 および 10nM 添加 24 時間後に GLUT4 m-RNA 発現低下を認めた。

4. GLUT9 m-RNA の発現

JAR 細胞株では GLUT9 m-RNA 発現は認めなかったが、JEG-3 細胞株ではいずれの条件でも同様に発現を認めた。

5. GLUT4 蛋白発現の検討

次に JEG-3 細胞株は TCDD 10nM 添加 24 時間後に GLUT4 蛋白発現の減弱を認めた。

19. ヒト無精子症原因候補遺伝子であるヒト MEI1 遺伝子に関する研究

我々はマウス Meil 遺伝子のアミノ酸配列をもとに、ヒト MEI1 cDNA を単離した。ヒト MEI1 遺伝子は 16 個のエクソンより構成され、染色体 22q13.2 領域に局在している。ヒト MEI1 はヒト

精巣組織に優位に発現していた。ヒト MEI1 の mutation 解析にて Open Reading Frame (ORF) 内に 4 つの新たな single-nucleotide-polymorphism (SNP1, 2, 3, 4) を検出した。

アメリカ人患者 13 名と 61 名のアメリカ人正常コントロール群では SNP3 及び SNP4 のアレルの頻度に有意な差を認めた。

D. 考 察

平成 18 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 9721 人である。新生児個票の戻った 5998 人中、先天性心疾患 28 人（動脈管開存症 14、心房中隔欠損症 5、ファロー四徴症 4、心室中隔欠損症 2、左心低形成症候群 2 他）、ダウン症候群 10 人、口唇口蓋裂 8 人、副耳、水腎症各 6 人、多指症 5 人、無脳症、異形成腎、停留精巣各 4 人、水頭症、口蓋裂、腹壁破裂、多趾症、合趾症、合指症、横隔膜ヘルニア各 3 人、埋没耳、脊髄髄膜瘤、臍帯ヘルニア、十二指腸閉鎖、尿道下裂、小顎、卵巣のう腫各 2 人等であった（延べ人数）。今度末までに約 10,000 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 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 3～4 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、 $7.3 \pm 2.4 \text{ ng/ml}$ 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 $3.6 \sim 12.9 \text{ ng/ml}$ 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 5.7 ng/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、IUGRのオッズ比が上昇した。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、 $240 \mu\text{g/d}$ 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、胎児の発育、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。

初産婦と経産婦及び年齢が31才以下と32才以上の血中及び母乳中のダイオキシン類濃度（TEQ-pg/g lipid表示）の比較すると、初産婦の方が経産婦より高く、年齢の高い方がダイオキシン類濃度は高い値を示した。また、血中及び母乳中のダイオキシン類濃度にしめるPCDDs、

PCDFsおよびノンオルソCo-PCBsの割合は初産婦と経産婦あるいは31才以下と32才以上で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胎児へ移行し減少する一方で加齢に伴いダイオキシン類は体内に蓄積されると考えられる。また、ダイオキシン類の排出または蓄積の比率はPCDDs、PCDFsおよびノンオルソCo-PCBsのそれぞれで大きな差はないと考えられた。

今回測定した血中及び母乳中のダイオキシン類濃度を過去の測定結果と比較する。1993年6月から1994年6月に福岡県内に居住する50名の未婚女性（平均年齢20.2歳）の血中ダイオキシン類濃度は $24.1 \text{ pg-TEQ/g lipid}$ であった。一方、北海道の初産婦（平均年齢28.8才）の血中ダイオキシン類濃度は $13.8 \text{ pg-TEQ/g lipid}$ であった。母乳中ダイオキシン類濃度では1994-96年に西日本地区で測定された母乳中ダイオキシン類のTotal TEQは $20 \sim 28 \text{ pg-TEQ/g lipid}$ 、1999年に厚生省が報告した国内での母乳中ダイオキシン類の平均濃度は $24.0 \text{ pg-TEQ/g lipid}$ であり、今回（2004年）北海道での母乳中ダイオキシン類濃度は $11.23 \text{ pg-TEQ/g lipid}$ であった。血中及び母乳中のダイオキシン類濃度は過去の測定値と比較すると約1/2に低下している。食物や嗜好性の違いによる地域的特性による影響も考えられるが、ダイオキシン類の環境への排出はこの間、1/10以下に低減しており、その効果が示唆される。

有機フッ素系化合物に関しても、PFOSは全ての検体から、PFOAは93.1%の検体から検出された。このことから、PFOS及びPFOAに広く暴露している危険性が示唆された。さらに、妊娠回数増加に伴い、母体血中PFOS濃度及びPFOA濃度が減少していく傾向が確認された。今後、次世代影響や妊娠期疾患との関連性を見ていくために、疾病診断の精度や妊娠回数、年齢などを考慮し、検討する必要があると考えられた。

E. 結 論

平成15年2月から平成18年1月までの本研究への参加妊婦数は、累計9721人であった。このうち平成16年12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1789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 ± 2.4 (中央値 7.0) 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、IUGRのリスクが上昇した。

2004年度に北海道で採取された70件の妊婦母体血と60件の母乳中ダイオキシン類を、超高感度精密分析法で測定したところ、血中ダイオキシン類濃度はPCDDs、PCDFs、ノンオルソ-Co-PCBsおよびTotal TEQの平均値がそれぞれ、6.34、3.22、3.83、および13.41pg-TEQ/g lipidであり、母乳中ダイオキシン類濃度は4.58、2.89、3.77および11.23pg-TEQ/g lipidであった。血中及び母乳中のダイオキシン類濃度は出産で低下し、加齢と共に増加する傾向にあるが、10年前と比較するとTotal-TEQで約1/2に低下していると推察された。有機フッ素系化合物に関しても、PFOS、PFOAはほとんどの検体から検出され、PFOS及びPFOAに広く暴露している危険性が示唆された。さらに、妊娠回数の増加に伴い、母体血中PFOS濃度及びPFOA濃度が減少していく傾向が確認された。今後、継続的な調査が必要と考えられた。

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—疫学研究の現状と課題. 保健医療科学 54:7-16、2005
2. 岸 玲子、佐田文宏、西條泰明、水上尚典、櫻木範明、遠藤俊明、石川陸男. 内分泌かく乱化学物質の小児への影響—尿道下裂・停留精巣など先天異常と乳幼児の神経発達に関する疫学研究. 周産期学シンポジウム 23:27-33、2005
3. 岸 玲子、佐田文宏、西條泰明、倉橋典絵、加藤静恵、中島そのみ、佐々木成子. 内分泌かく乱化学物質の小児への影響に関する疫学研究—現状と課題. 日本衛生学雑誌 61:19-31、2006
4. 倉橋典絵、笠井世津子、西條泰明、佐田文宏、岸 玲子. 内分泌かく乱物質曝露に関する疫学研究の実際と課題—特に尿道下裂と停留精巣について. 日本衛生学雑誌 60:15-22、2005
5. 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 11:93-98, 2005
6. Kurahashi N, Kasai S, Shibata T, Kakizaki H, Nonomura K, Sata F, Kishi R. Parental and neonatal risk factors for cryptorchidism. Med Sci Monit 11:CR274-283, 2005
7. 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 11:357-360, 2005
8. Nakajima S, Saijo Y, Kato S, Sasaki S, Uno A, Kanagami N, Hirakawa H, Hori T, Tobiishi K, Todaka T, Nakamura Y, Yanagiya S, Sengoku Y, Iida T, Sata F, Kishi R. Effects of prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins on mental and motor development in Japanese children at six months. Environ

- Health Perspect, in press [Online 15 December 2005]
9. Sasaki S, Kondo T, Sata F, Saijo Y, Katoh, Nakajima S, Ishizuka M, Fujita S, Kishi R. Maternal smoking during pregnancy and genetic polymorphisms in the Ah receptor, CYP1A1 and GSTM1 affect infant birth size in Japanese subjects. *Mol Hum Reprod*, in press
 10. Moriya K, Kakizaki H, Tanaka H, Furuno T, Higashiyama H, Sano H, Kitta T, Nonomura K. Long-term cosmetic and sexual outcome of hypospadias surgery: Norm-related study in adolescent. *J Urol*, in press
 11. Ishizuka M., Lee, J.J., Masuda, M., Akahori F, Kazusaka A., Fujita, S. CYP2D related metabolism in animals of the Canioidea super family — The species difference. *Vet Res Comm.* (In press)
 12. Jinno A, Maruyama Y, Ishizuka M, Kazusaka A, Nakamura A, Fujita S. Induction of cytochrome P450-1A by the equine estrogen equilenin, a new endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand. *J Steroid Biochem Mol Biol.* (2006) 98(1):48-55.
 13. Sakai N, Saito K, Kim HS, Kazusaka A, Ishizuka M, Funae Y, Fujita S. Importance of CYP2D3 in polymorphism of diazepam p-hydroxylation in rats. *Drug Metab Dispos.* (2005) 33(11):1657-60
 14. Muzandu K, Shaban Z, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Nitric oxide enhances catechol estrogen-induced oxidative stress in LNCaP cells. *Free Radic Res.* (2005) 39(4):389-98.
 15. Nikaidou S, Ishizuka M, Maeda Y, Hara Y, 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. *Jpn J Vet Res.* (2005) 52(4):185-92.
 16. Ishizuka M, Takasuga T, Senthilkumar K, Tanikawa T, Fujita S. Accumulation of persistent organochlorine pollutants and polybrominated diphenyl ether in wild rats, and toxicogenomic analyses of their effects. *Organohalogen compound* (2005) 67:2435-2436
 17. Muzandu K, El Bohi K, Shaban Z, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Lycopene and beta-carotene ameliorate catechol estrogen-mediated DNA damage. *Jpn J Vet Res.* (2005) 52(4):173-84.
 18. El Bohi KM, Sabik L, Muzandu K, Shaban Z, Soliman M, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Antigenotoxic effect of *Pleurotus cornucopiae* extracts on the mutagenesis of *Salmonella typhimurium* TA98 elicited by benzo[a]pyrene and oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells. *Jpn J Vet Res.* (2005) 52(4):163-72.
 19. Shaban Z, Soliman M, El-Shazly S, El-Bohi K, Abdelazeez A, Kehelo K, Kim HS, Muzandu K, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. AhR and PPARalpha: antagonistic effects on CYP2B and CYP3A, and additive inhibitory effects on CYP2C11. *Xenobiotica.* 2005 Jan;35(1):51-68.
 20. Nikaidou S, Ishizuka M, Maeda Y, Hara Y, Kazusaka A, Fujita S. Effect of catechins on mutagenesis of *Salmonella typhimurium* TA 102 elicited by tert-butyl hydroperoxide (t-BuOOH). *J Vet Med Sci.* (2005) 67(1):137-8.
 21. 仲田尚生、中田彩子、岡田文雄、伊藤里恵、

- 井之上浩一、齊藤貢一、中澤裕之：オンライン固相抽出 - 高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計を用いるヒト血しょう中有機フッ素系化合物の一斉分析法の開発 分析化学、54、877-884 (2005)
22. INOUE K., OKADA F., ITO R., KAWAGUCHI M., OKANOUCI N. AND 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, 810, 49-56 (2004)
23. INOUE K., OKADA F., ITO R., KATO S., SASAKI S., NAKAJIMA S., UNO A., SAIJO Y., SATA F., YOSHIMURA Y., KISHI R. AND NAKAZAWA H.: Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) and Related Perfluorinated Compounds in Human Maternal and Cord Blood Samples: Assessment of PFOS Exposure in Susceptible Population during Pregnancy. Environ. Health Perspect., 112, 1204-1207 (2004)
24. Yamada H, Sata F, Saijo Y, Kishi R, Minakami H. (2005) Genetic factors of fetal growth restriction and miscarriage. Semin Thromb Hemost 31(3),334-345.
25. Kobashi G, Kato EH, Morikawa M, Shimada S, Ohta K, Fujimoto S, Minakami H, Yamada H. (2005) *MTHFR* C677T polymorphism and Leiden mutation of factor V are not associated with recurrent spontaneous abortion of unexplained etiology in Japanese women. Semin Thromb Hemost 31(3),266-271.
26. Kobashi G, Hata A, Shido K, Ohta K, Yamada H, Kato EH, Minakami H, Tamashiro H, Fujimoto S, Kondo K. (2005) Insertion/ deletion polymorphism of angiotensin-converting enzyme gene and preeclampsia in Japanese patients. Semin Thromb Hemost 31(3),346-350.
27. Kobashi G, Ohta K, Shido K, Hata A, Yamada H, Minakami H, Tamashiro H, Fujimoto S, Kondo K. (2005) The egogram is a potent, independent risk factor for hypertension in pregnancy. Semin Thromb Hemost 31(3),302-306.
28. Morikawa M, Yamada H, Kato EH, Wada S, Suzuki S, Sakuragi N, Minakami H. (2005) Failure of thromboprophylaxis in pregnancy caused by dual deficiencies of protein S and protein C. Semin.Thromb.Hemost.31(3),261-265.
29. Morikawa M, Cho K, Kataoka S, Kato EH, Yamada T, Yamada H, Minakami H. (2005) Magnetic resonance image findings of placental lake: report of two cases. Prenat Diagn 25(3), 250-252.
30. Yamada H, Morikawa M. (2005) Recurrent miscarriage and embryonic loss (letter to the editor). Hum Reprod 20, 2036-2037.
31. Morikawa M, Yamada T, Kataoka S, Cho K, Yamada H, Suzuki S, Sakuragi N, Minakami H. (2005) Changes in antithrombin activity and platelet counts in the late stage of twin and triplet pregnancies. Semin Thromb Hemost 31(3), 290-296.
32. Yamada H, Shimada S, Morikawa M, Iwabuchi K, Kishi R, Onoé K, Minakami H. (2005) Divergence of natural killer cell receptor and related molecule in the decidua from sporadic miscarriage with normal chromosome karyotype. Mol