

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18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

札幌医科大学産科・周産期科／生殖内分泌科	遠藤 俊明
旭川医科大学産婦人科学講座	千石 一雄
北海道大学大学院医学研究科生殖・発達医学講座生殖内分泌腫瘍学分野	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	梶原 淳睦
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 19 (2007) 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. 先天性形態異常の発生状況、および形態異常のリスク要因についての 検討（水上尚典ほか） .....	22
2. 尿道下裂と胎児エストロゲンレセプター遺伝子多型との関連（水上尚典ほか） .....	37
3. 母体血中 PFOS・PFOA 濃度と出生時体格との関連（水上尚典ほか） .....	41
4. 妊婦の喫煙状態・遺伝子多型と PCB・ダイオキシン類濃度との関連（水上尚典ほか） .....	46
5. 妊婦の血清葉酸値が児の体重に及ぼす影響（水上尚典ほか） .....	54
6. 妊婦の葉酸摂取と血清葉酸値及び児の出生時体重（水上尚典ほか） .....	60
7. 妊婦の血清葉酸値、喫煙及び飲酒が新生児の体格に及ぼす影響（水上尚典ほか） .....	73
8. 妊婦の血清葉酸値及び喫煙、飲酒が乳児の体格に及ぼす影響（水上尚典ほか） .....	82
9. 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たヒト母乳中有機フッ素 化合物の分析（中澤裕之ほか） .....	90
10. 妊婦の血液及び母乳中のダイオキシン類、PCB 類濃度（梶原淳睦ほか） .....	94
11. 尿道下裂症例の内分泌学的予後に関する研究（野々村克也ほか） .....	105
12. バイオマーカー-cytochrome P450 に関する研究（藤田正一ほか） .....	110
13. ヒト無精子症原因候補遺伝子であるヒト FKBP6 遺伝子に関する 研究（千石一雄ほか） .....	116
14. 多嚢胞性卵巣症候群における遺伝子多型に関する研究（遠藤俊明ほか） .....	120
15. 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） .....	123

## I はじめに

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き継ぎ、研究開始から 5 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妊娠早期（胎児期）からの前向きコホート研究の形で実施されていることです。

これまで内分泌かく乱物質の次世代への直接的な影響と因果関係は、ほとんど解明されていません。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、農薬、フタル酸エステル類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。

加えて化学物質の個体への影響の強弱については暴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。平成 18 年末までに全道から約 12,000 名の妊婦さん方が本研究に参加しております。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と思われれます。

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 19 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、諸外国において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19年1月までの本研究への参加妊婦数は、累計12686人であった。このうち、平成18年10月までに参加しこどもの出産前後の情報を記載した新生児個票のある8267名を対象として、先天性形態異常の頻度、内容を調査したところ、先天性形態異常のあるこどもは185名、形態異常総数は225、形態異常児の出産頻度は2.09%であった。これは、日本産婦人科医会先天異常モニタリング（JAOG）に比べると、形態異常を有するこどもの出産頻度が高く、胎児期、新生児期に問題となる重篤な奇形は少なく、病院ベース調査であるJAOGに対して地域ベースの特徴を反映した結果であった。また、このうち、妊娠初期に自記式調査を行っている5596名を対象にして、妊娠前後の種々の要因の先天性形態異常発症リスクを検討したところ、出産時在胎週数、出産時体重がリスク要因であると考えられた。

平成17年9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3362人を対象として、血清葉酸値について、四分位に分け、中央値を含む7.1-8.7 ng/mlの群と比較すると、2.5-5.7 ng/mlの群において、有意に出生体重の低下と関連していた（ $p = 0.005$ ）。サプリメント非服用者における血清葉酸値が出生体重に及ぼす影響について、解析を行ったところ、血清葉酸値が低い群（2.5-5.7 ng/ml）において、低出生体重と有意な関連が認められた（ $p = 0.017$ ）。また、葉酸サプリメント服用者における血清葉酸値が出生体重に及ぼす影響について、解析を行ったところ、有意な関連は見られなかった。このことから、サプリメント服用により低出生体重に与える影響が低くなることが示唆された。

パーフルオロ化合物（PFCs）は難分解性・蓄積性であり、ヒト血液からも高頻度に検出

される。また、最近では PFCs の母乳移行性についても示唆され、子どもに及ぼす影響が危惧されている。そこで本研究では高感度・選択性を有する高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法(LC/MS/MS)を用いてヒト母乳中 PFCs の分析を行い、母乳栄養による乳児の PFCs 暴露評価を行った。本法を用いて検量線を作成したところ、0.2~20 ng/ml の範囲で良好な直線性が得られた。ヒト母乳試料を用いた添加回収試験においては、平均回収率 93.4%以上 (RSD<10.3, n=6) と良好な結果が得られた。本分析法を用いて母乳試料 40 検体を分析したところ、すべての検体から PFOS が検出され、他の PFCs についても高頻度で検出された。また、PFOS・PFOA 濃度と出生時体格の関連を調べたところ、PFOS と出生時体重で有意な負の相関が得られた ( $p=0.032$ )。

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 5 g、母乳 2 g からダイオキシン類及び PCB 類濃度を正確に測定した。母体血 (2002 年 99 名、2003 年 100 名、2004 年 70 名、2005 年 100 名) と母乳 (2004 年 60 名分) を採取し、血液及び母乳中のダイオキシン類濃度 (PCDDs 7 種、PCDFs 10 種、ノンオルソ-PCB 4 種、モノオルソ-PCB 8 種 合計 29 種) および PCB 類 (70 種) 濃度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 18.1 pg TEQ/g lipid、総 PCB 類濃度は 438.1 pg/g であり、母乳中ダイオキシン類平均濃度は 13.7 pg TEQ/g lipid、総 PCB 類濃度は 4,084.9 pg/g であった。母体中のダイオキシン類濃度は出産によって低下し、加齢によって増加すると推察された。母体血から母乳へのダイオキシン類及び PCB 類の移行は塩素数の多いものほど移行しにくい傾向があった。

23 週-35 週の妊婦 263 名において、喫煙状態 (喫煙、受動喫煙、非喫煙) と化学物質代謝に関与する遺伝子多型 (*AhR* R554K, *CYP1A1* I462V, *CYP1B1* L432V, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* I105V) と血中の PCB・ダイオキシン類濃度との関連について調べた。その結果、Lys アレルを有する非喫煙群と比べ、Arg/Arg 型の喫煙群では、Total non-ortho PCBs TEQ、Total mono-ortho PCBs TEQ、Total coplanar PCBs TEQ、Total TEQ が低い値であるとともに (それぞれ  $P < 0.001$ ,  $= 0.001$ ,  $< 0.001$ ,  $< 0.001$ )、Total non-ortho PCBs TEQ、Total coplanar PCBs TEQ、Total TEQ について、Lys アレルを有する喫煙群 (それぞれ  $P = 0.006$ ,  $0.012$ ,  $0.024$ ) では有意に低い結果が得られた。さらに、Lys アレルを有する非喫煙群と比べて、Arg/Arg 型の受動喫煙群では、Total non-ortho PCBs TEQ ならびに Total coplanar PCBs TEQ が有意に低い値であった (それぞれ  $P = 0.021$ ,  $0.026$ )。このことから、*AhR*R554K 多型と喫煙による血中 PCB TEQ 値への負の複合影響が明らかになった。また、前向きコホート研究と並行して、尿道下裂の症例対照研究も実施した。*ESR1* の *PvuII* 部位ならびに *XbaI* 部位、*ESR2* の 2681-4A>G 部位の遺伝子多型と尿道下裂との関連について調べた。その結果、*ESR1* の *PvuII* 部位ならびに *XbaI* 部位について、ハプロタイプが CG の場合、尿道下裂患者において、その割合は対照と比較して、有意に低かった。また、*ESR2* の 2681-4A>G 遺伝子多型について、G アレルを有する場合は、尿道下裂に対するオッズ比は、0.57 (95% CI = 0.33-0.97) であり、有意な減少がみられた。これらの結果から、*ESR1* の CG ハプロタイプ (*PvuII* 部位/*XbaI* 部位)、*ESR2* の 2681-4A>G 部位の G アレルは尿道下裂に対するリスクを減少させることが明ら

かになった。

また、尿道下裂既往のある15歳以上の30症例を対象とし、思春期以降の性腺の状態および内分泌環境を検査することにより、内分泌学的予後を検討した。内分泌学的評価（LH, FSH, テストステロン）および精巣容積の測定を行い、尿道下裂の程度と思春期の内分泌環境、さらに精巣容積との関係を検討した。尿道下裂の程度は遠位型8例、近位型18例、不明4であった。尿道下裂の程度と内分泌の関係では、遠位型尿道下裂8例中2例（低LH 1例、低テストステロン 2例 重複あり）、近位型18例中9例（低LH 1例/高LH 6例、低FSH 1例/高FSH 6例、低テストステロン5例 重複あり）に異常を認め、尿道下裂の程度が高度となるほど内分泌異常の頻度が増加していた。

分担研究者

遠藤 俊明

札幌医科大学産科・周産期科/  
生殖内分泌科助教授

千石 一雄

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

生殖内分泌腫瘍学分野教授

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教室教授

中澤 裕之

星薬科大学薬品分析化学教室教授

梶原 淳睦

福岡県保健環境研究所専門研究員

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、吉岡 英治、坂 晋、

金澤 文子、小西 香苗、鷺野 考揚、

東 倫子、松澤 重行、鈴木 佳奈

金澤 文子、小西 香苗、鷺野 考揚、

東 倫子、松澤 重行、鈴木 佳奈

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

北海道大学病院周産母子センター

馬場 剛

札幌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

宮本 敏伸

旭川医科大学産婦人科学講座

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

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教室

斉藤 貢一、伊藤 里恵、岩崎 雄介

星薬科大学薬品分析化学教室

吉村 健清、中川 礼子、平川 博仙、

堀 就英、芦塚 由紀、村田さつき、

松枝 隆彦、飛石 和大、安武 大輔

福岡県保健環境研究所  
戸高 尊  
九州大学医学部  
井上 英  
厚生労働省  
飯田 隆雄  
北九州生活科学センター

#### 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、北海道大学病院、公立芽室病院、道立紋別病院、市立稚内病院（平成19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）について、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重要である。

葉酸は生体内では DNA 合成の際の補酵素として重要であり、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る。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いることから、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。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、葉酸サプリメントの摂

取状況、妊娠初期の葉酸値、喫煙、その他の環境要因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、児の成長への影響の検討を行うとともに、喫煙や異物代謝酵素遺伝子多型などの感受性素因が PCB・ダイオキシン類などの曝露に与える影響を調べた。また、喫煙や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. 先天性形態異常の発生状況、および形態異常のリスク要因についての検討

平成 15 年 1 月から平成 18 年 10 月までにコホートに参加しこどもの出産前後の情報を記載した新生児個票のある 8267 名を対象として、先天性形態異常の頻度、内容を調査した。また、この対象者のうち妊娠初期に自記式調査を行っている 5596 名を対象にして、妊娠前後の種々の要因の先天性形態異常発症リスクを検討した。

### 2. 尿道下裂と胎児エストロゲンレセプター一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 87 名を対象とした。

対照は、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 286 名を対象とした。

#### 2. 方法

症例と対照の血液から抽出した DNA を用いて、*ESR1* の *PvuII* 部位ならびに *XbaI* 部位、*ESR2* の 2681-4A>G 部位の遺伝子多型を TaqMan 法により判別し、疾患との関連をロジスティック回帰分析を用いて解析した。また、*ESR1* のハプロタイプについては、expectstion-maximization algorithm に基づいて解析した。

### 3. 母体血中 PFOS・PFOA 濃度と出生時体格との関連

札幌市内において調査協力が得られた産婦人科医院で、妊婦と小児を対象に前向きコホート研究を実施し、382 例の母体血中 PFOS・PFOA 濃度と児の出生時体格について重回帰分析を行い、検討した。

### 4. 妊婦の喫煙状態・遺伝子多型と PCB・ダイオキシン類濃度との関連

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 23 週-35 週の妊婦 263 名である。リクルート時に自記式調査票にて、妊娠初期における対象者ならびにパートナーの喫煙の有無を調べ、対象者を非喫煙群（80 名）、受動喫煙群（89 名）、喫煙群（94 名）の 3 群に区分した。また、対象者の血液から抽出した DNA を用いて、TaqMan 法により、*AhR* R554K, *CYP1A1* I462V, *CYP1B1* L432V, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* I105V の各遺伝子多型を判定した。さらに、対象者の血液中の PCB・ダイオキシン類濃度を測定した。

喫煙状態、各遺伝子多型と血液中の PCB・ダイオキシン類濃度との関連について、重回帰分析により解析を行った。

### 5. 妊婦の血清葉酸値が児の体重に及ぼす影響



本研究は、平成 15 年 11 月から平成 16 年 12 月までに、妊婦 3295 人を解析対象とした。妊婦の血清葉酸値測定は妊娠初期（13 週未満）の血清 800  $\mu$ l を用いて、化学発光免疫測定法（CLIA 法）で測定した。

妊娠初期（13 週未満）に自記式質問票により質問紙調査を行った。質問項目は、妊婦の基本的属性（出産時年齢、妊娠前身長、妊娠前体重、教育歴、世帯収入、既往歴、出産歴、葉酸サプリメントの摂取、妊娠初期の喫煙習慣）である。児の属性（新生児性別、在胎週数、出産時体重、奇形の有無）については、出産時に医療機関で記載された新生児個票から情報を得た。

妊娠初期の血清葉酸値が児の出生時体重に及ぼす影響を検討するために、児の出生時体重を従属変数とし、在胎週数、児性別、出産時年齢、母親の教育歴、出産歴、妊娠前 BMI、妊娠初期喫煙状況、血清葉酸値（4 分位にわけたもの）を独立変数とし、変数固定法で重回帰分析を行った。

## 6. 妊婦の葉酸摂取と血清葉酸値及び児の出生時体重

### 1. サプリメント服用状況と血清葉酸値について

平成 15 年 1 月から平成 17 年 9 月までの期間、北海道内 41 施設の産科外来を受診した妊婦のうち 3507 人について、サプリメント服用状況と血清葉酸値との関係を調べた。対象妊婦を、葉酸を含むサプリメント服用状況により、葉酸サプリメント非服用者、葉酸サプリメント服用者、総合ビタミン服用者、両剤服用者（葉酸サプリメントと総合ビタミン服用者）の 4 群に分類し、葉酸サプリメント服用状況と血清葉酸値について、重回帰分析を行ない、解析を行った。

### 2. サプリメント服用状況と児の出生体重について

サプリメント服用状況と血清葉酸値についての解析対象者 3507 人のうち、児の出生体重に影響を及ぼす既往歴を持たず、単胎出産の確認ができ、出産情報が得られた 3362 人について、葉酸を含むサプリメント服用状況により、葉酸サプリメント非服用者、葉酸サプリメント服用者、総合ビタミン服用者に分類した。葉酸を含むサプリメント服用状況及び児の出生体重について、Kruskal-Wallis 検定を行った。血清葉酸値と出生体重について対象者全体と葉酸を含むサプリメント非服用者、葉酸サプリメント服用者それぞれについて重回帰分析を行った。

## 7. 妊婦の血清葉酸値、喫煙及び飲酒が新生児の体格に及ぼす影響

平成 18 年 8 月までに生後 4 ヶ月時調査に回答した 4584 人を対象とし、妊娠初期（13 週未満）及びに生後 4 ヶ月時に自記式質問票により質問紙調査を行った。妊娠初期調査の質問項目は、妊婦の基本的属性（出産時年齢、妊娠前身長、妊娠前体重、教育歴、世帯収入、既往歴、出産歴、葉酸サプリメントの摂取、妊娠初期の喫煙習慣）である。また、4 ヶ月調査では、出生時の身長、体重、頭囲、胸囲、性別、妊娠経過、母親及び父親の妊娠中の喫煙状況を調査した。在胎週数、奇形の有無等については、出産時に医療機関で記載された新生児個票から情報を得た。妊婦の血清葉酸値は、妊娠初期（13 週未満）の血清 800  $\mu$ l を用いて、化学発光免疫測定法（CLIA 法）で測定した。

統計解析は、新生児体格と血清葉酸値、

喫煙・飲酒状況との関連は、一元配置分散分析、Tukey 検定による多重比較、t 検定（2 群の場合）及び重回帰分析により、低出生体重と血清葉酸値、喫煙・飲酒状況との関連は、ロジスティック回帰分析により行った。

#### 8. 妊婦の血清葉酸値及び喫煙、飲酒が乳児の体格に及ぼす影響

葉酸サプリメントを摂取せず、単胎児を出産し、平成 18 年 10 月までに生後 1 歳時調査に回答した 2537 人を対象とし、妊娠初期（13 週未満）、生後 4 ヶ月時及び 1 年時に自記式質問票により質問紙調査を実施した。妊娠初期調査の質問項目は、妊婦の基本的属性（出産時年齢、妊娠前身長、妊娠前体重、教育歴、世帯収入、既往歴、出産歴、葉酸サプリメントの摂取、妊娠初期の喫煙習慣）である。生後 4 ヶ月調査では、出生時の身長、体重、頭囲、胸囲、性別、妊娠経過、母親及び父親の妊娠中の喫煙状況を調査した。また、生後 1 年時調査では、乳児検診時の身長、体重、頭囲、胸囲、栄養方法、健康状態、父母の喫煙状況、アレルギー疾患の既往を調査した。在胎週数、奇形の有無等については、出産時に医療機関で記載された新生児個票から情報を得た。妊婦の血清葉酸値は、妊娠初期（13 週未満）の血清 800 $\mu$ l を用いて、化学発光免疫測定法（CLIA 法）で測定した。

乳児の体格に関しては、10 ヶ月健診受診者 1076 人を解析対象とした。

統計解析は、乳児の体格と胎児期の母親の血清葉酸値、喫煙・飲酒状況との関連は、一元配置分散分析、Tukey 検定による多重比較、t 検定（2 群の場合）及び重回帰分析により行った。

#### 9. 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たヒト母乳中有機フッ素化合物の分析

高感度・選択性を有する高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法（LC/MS/MS）を用いてヒト母乳中 PFCs を分析し、母乳栄養による乳児の PFCs 暴露評価を行った。

#### 10. 妊婦の血液及び母乳中のダイオキシン類、PCB 類濃度

先天異常の疫学研究の基礎資料を得ることを目的に、母体血（2002 年 99 名、2003 年 100 名、2004 年 70 名、2005 年 100 名）と母乳（2004 年 60 名分）を検査対象とし、妊婦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-PCB 4 種 モノオルソ-PCB 8 種 合計 29 種）及び PCB 類（70 異性体）を精密に測定し、母体に蓄積されているダイオキシン類及び PCB 類濃度の把握と母体から母乳への移行について解析した。

#### 11. 尿道下裂症例の内分泌学的予後に関する研究

北海道大学病院泌尿器科にて経過観察中の尿道下裂既往のある症例のうち、15 歳以上で二次性徴を迎え、評価可能であった 30 症例を対象とした。

評価は内分泌学的評価（LH, FSH, テストステロン）およびオルキオメーターを用いての精巣容積の測定を行い、尿道下裂の程度と思春期の内分泌環境、さらに精巣容積との関係を検討した。

#### 12. バイオマーカー cytochrome P450 に関する研究

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が本研究の目的である。昨年度は、新鮮なヒト血液サンプルにおいて、総和 TEQ と CYP1A 発現レベルに相関が見られた。しかし、CYP1A1 は血液における恒常的な発現レベルは低く、サンプルの状態によっては血液では発現が検出されないものもあった。そこで、今年度は、血液に恒常的に発現し、AhR リガンドで発現が変動する P450 分子種の探索を行った。さらに、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、これら P450 の発現を測定し、新規バイオマーカーの探索を行った。

### 13. ヒト無精子症原因候補遺伝子であるヒト FKBP6 遺伝子に関する研究。

近年、Fkbp6 遺伝子のノックアウトマウスが報告され、homo-mutant のオスは成熟精子を全く有していなかった。詳細な解析の結果ノックアウトマウスのオスは減数分裂過程における異常により、濃縮した核をもつ特徴的な pachytene spermatocyte を有し、pachytene stage を超える細胞は全く観察されなかった。そこで我々はヒト FKBP6 遺伝子のヒト無精子症への関与を解析した。

### 14. 多嚢胞性卵巣症候群における遺伝子多型に関する研究

アンドロゲン産生に関与する遺伝子である、17,20-hydroxylase ならびに 17,20-lyase (CYP17)、aromatase (CYP19)、17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 5 (HSD17B5) について、またインスリン抵抗性に関与する Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1)、Glycoprotein PC-1 (PC-1)、Resistin (RETN)、

Adiponectin (apM1) について、SNP と PCOS との関連を検討した。

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

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 (札幌ジェネティックラボ) した。新生児感染の有無を調べた。

### 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. 先天性形態異常の発生状況、および形態異常のリスク要因についての検討

8267 名のうち先天性形態異常のある子どもは 185 名、形態異常総数は 225、形態異常児の出産頻度は 2.09% であった。8267

名のうち先天性形態異常のあるこどもは185名、形態異常総数は225、形態異常児の出産頻度は2.09%であった。

形態異常の $\beta$ 係数、オッズ比は出産時在胎週数（ $\beta = -0.37$ ,  $p = 0.014$ ）、こどもの生死（調整オッズ比=17.9、95%信頼区間：3.66-68.1）に対して有意に高値を示し、形態異常がこれらの要因のリスク因子であることを示した。

## 2. 尿道下裂と胎児エストロゲンレセプター一遺伝子多型との関連

*ESR1* の *PvuII* 部位について、尿道下裂との有意な関連はみられなかった。また、*ESR1* の *XbaI* 部位について、尿道下裂に対するオッズ比は、AG型では0.61 (95% CI = 0.35-1.06)、GG型では0.23 (95% CI = 0.03-1.80)であった。また、Gアレルを有する場合は、尿道下裂に対するオッズ比は、0.57 (95% CI = 0.33-0.97)であり、有意な減少がみられた。

*ESR2* の 2681-4A>G 遺伝子多型について、ヘテロ型における尿道下裂に対するオッズ比は、0.57 (95% CI = 0.34-0.95)、Gアレルを有する場合における尿道下裂に対するオッズ比は、0.59 (95% CI = 0.37-0.97)であり、それぞれ有意な減少がみられた。

*ESR1* の *PvuII* 部位ならびに *XbaI* 部位について、ハプロタイプと尿道下裂との関連を調べたところ、*PvuII/XbaI* がCGの場合の Chi Square は 4.763 ( $P = 0.029$ )であった。

## 3. 母体血中 PFOS・PFOA 濃度と出生時体格との関連

母年齢、母学歴、妊娠中喫煙、母BMI、妊娠週数、出産回数（第1子か否か）、児の性、採血時期にて調整し、PFOS・PFOA濃度

と出生時体格の関連を調べたところ、PFOSと出生時体重で有意な負の相関が得られた ( $p = 0.032$ )。

## 4. 妊婦の喫煙状態・遺伝子多型と PCB・ダイオキシン類濃度との関連

喫煙、各遺伝子多型と血中 PCB・ダイオキシン類値との関連を調べた。*AhR* R554K 多型との間には、Lysアレルを有する集団に比べ、Arg/Ars型の集団では、Total non-ortho PCBs TEQ、Total mono-ortho PCBs TEQ、Total coplanar PCBs TEQ、Total TEQ が有意に低い値であった（それぞれ  $P = 0.010$ ,  $0.005$ ,  $0.006$ ,  $0.023$ ）。また、Total non-ortho PCBs TEQ、Total coplanar PCBs TEQ、Total TEQ は、非喫煙群に比べ、喫煙群において有意に低い値であった（それぞれ  $P < 0.001$ ,  $0.001$ ,  $P = 0.002$ ）。

血中 PCB 量に影響のみられた AhR 多型と喫煙との組み合わせと血中 PCB・ダイオキシン類 TEQ 値との関連を調べたところ、Lysアレルを有する非喫煙群と比べ、Arg/Arg型の喫煙群では、有意に Total PCDDs TEQ、Total PCDFs TEQ、Total PCDD/PCDFs TEQ が低い値であった（それぞれ  $P = 0.009$ ,  $0.003$ ,  $0.003$ ）。また、同様に、Lysアレルを有する非喫煙群と比べ、Arg/Arg型の喫煙群では、Total non-ortho PCBs TEQ、Total mono-ortho PCBs TEQ、Total coplanar PCBs TEQ、Total TEQ が低い値であるとともに ( $P < 0.001$ ,  $= 0.001$ ,  $< 0.001$ ,  $< 0.001$ )、Total non-ortho PCBs TEQ、Total coplanar PCBs TEQ、Total TEQ について、Lysアレルを有する喫煙群（それぞれ  $P = 0.006$ ,  $0.012$ ,  $0.024$ ）では有意に低い結果が得られた。さらに、Lysアレルを有する非喫煙群と比べて、Arg/Arg

型の受動喫煙群では、Total non-ortho PCBs TEQ ならびに Total coplanar PCBs TEQ が有意に低い値であった（それぞれ  $P = 0.021, 0.026$ ）。

#### 5. 妊婦の血清葉酸値が児の体重に及ぼす影響

全妊婦の血清葉酸値を4分位にわけ、全妊婦の血清葉酸値の平均である 7.3ng/ml を含む群を基準とし、重回帰分析を行ったところ、血清葉酸値 5.6ng/ml 以下の群で児の出生時体重との関連がみられた（ $\beta = -0.062, p = 0.004$ ）。在胎週数、児性別、出産歴、母親の妊娠前 BMI、出産時年齢、母親の教育歴、母親の妊娠初期喫煙状況を調整してもなお、血清葉酸値 5.7ng/ml 以下の群で児の出生時体重と有意な関連がみられた（ $\beta = -0.042, p = 0.02$ ）。

#### 6. 妊婦の葉酸摂取と血清葉酸値及び児の出生時体重

##### 1. サプリメント服用状況と血清葉酸値について

葉酸を含むサプリメント服用状況と血清葉酸値について、Bonferroni 補正による Mann-Whitney 検定を行った結果、葉酸サプリメント非服用者と比較して葉酸サプリメント服用者及び総合ビタミン服用者、両剤服用者において高値（それぞれ  $p < 0.001$ ）であった。また、総合ビタミン服用者は、葉酸サプリメント服用者、両剤服用者と比較して、それぞれ低値（ $p < 0.001$ ）であった。

##### 2. サプリメント服用状況と児の出生体重について

血清葉酸値について、四分位に分け、中央値を含む 7.1-8.7 ng/ml の群と比較すると、2.5-5.7 ng/ml の群において、有意に出生体重の低下と関連していた。調整後も有

意差が見られた。

サプリメント非服用者における血清葉酸値が出生体重に及ぼす影響について、単回帰分析の結果、血清葉酸値が低い群（2.5-5.7 ng/ml）において、低出生体重と有意な関連が認められた。調整後も有意な関連が見られた（ $p = 0.017$ ）。

葉酸サプリメント服用者における血清葉酸値が出生体重に及ぼす影響についての単回帰分析結果では、有意な関連は見られなかった。調整後も有意な関連はみられなかった。

#### 7. 妊婦の血清葉酸値、喫煙及び飲酒が新生児の体格に及ぼす影響

新生児の出生時体重、身長、頭囲、胸囲と血清葉酸値、妊娠時喫煙状況、妊娠時飲酒状況、母親の妊娠前 body mass index (BMI)、出産時年齢との関連を重回帰分析で解析したところ、出生時体重、身長、頭囲、胸囲に関してはいずれも、血清葉酸値最低値群と他のいずれかの群との間に、喫煙群は非喫煙群との間に、飲酒群は非飲酒群との間に有意差がみられた。

低出生体重と血清葉酸値、妊娠時喫煙状況、妊娠時飲酒状況との関連をロジスティック回帰分析で解析したところ、禁煙群でのみ有意なリスクの上昇が観察された（オッズ比 1.59, 95%信頼区間 1.02 - 2.48）。

母親の妊娠時喫煙・飲酒状況別の血清葉酸値を Kruskal Wallis 検定で解析したところ、いずれも有意差がみられた。喫煙群、禁煙群の血清葉酸値はいずれも非喫煙群の葉酸値よりも有意に低下し、喫煙群の葉酸値は禁煙群の葉酸値よりも有意に低下していた。一方、飲酒群、禁酒群の血清葉酸値はいずれも非飲酒群の葉酸値よりも有意に上昇していた。

## 8. 妊婦の血清葉酸値及び喫煙、飲酒が乳児の体格に及ぼす影響

10ヶ月健診受診者を対象に、母親の妊娠初期の血清葉酸値4分位、妊娠時喫煙状況（3群）、妊娠時飲酒状況（3群）における10ヶ月児の体重、体重増加率、身長、身長増加率の群間に差がみられるかを一元配置分散分析で解析したところ、体重は、母親の妊娠初期の血清葉酸値4分位（ $p=0.050$ ）との間に、体重増加率は、血清葉酸値4分位（ $p=0.023$ ）と妊娠時喫煙状況（ $p=0.039$ ）との間に有意差がみられた。特に、喫煙群の体重増加率は、非喫煙群（ $p<0.01$ ）、禁煙群（ $p<0.05$ ）に比べ有意に増加していた。また、血清葉酸値7.1~8.6ng/ml群で、体重、体重増加率、身長増加率が、残りの対象児に比べ有意に増加していた。

10ヶ月児の出生時体重、体重増加率、身長、身長増加率と母親の妊娠初期の血清葉酸値、妊娠時喫煙状況、妊娠時飲酒状況、母親の妊娠前 body mass index (BMI)、出産時年齢との関連を重回帰分析で解析したところ、体重、体重増加率、身長増加率に関してはいずれも、血清葉酸値7.1~8.6ng/ml群と他のいずれかの群との間に有意差がみられた。また、体重増加率に関しては、喫煙群が非喫煙群に比べ増加し、身長に関しては、飲酒群が非飲酒群に減少した。

## 9. 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たヒト母乳中有機フッ素化合物の分析

本分析法を用いて北海道在住妊婦ボランティア41名の母乳を測定した。血液中の結果と同様に、すべての検体からPFOSが検出された。PFOAについては、他の測定対

象物質と比較しても検出率が低かったが、これはPFOAが測定環境からのコンタミネーションの影響を受けることから、定量限界を0.1 ng/mlと高く設定したためと思われる。PFOAの最大値としては、PFOSよりも高い濃度で検出された。また、PFHxS、PFNAについては、PFOS、PFOAと比較すると微量レベルであった。

同一人物から採取した母乳及び血液中PFOS濃度の関連性について調査したところ、 $r=0.74(n=41)$ という相関性が得られ、母体血の濃度依存的に母乳中濃度が高くなるという傾向が見られた。

## 10. 妊婦の血液及び母乳中のダイオキシン類・PCB類濃度

本年度は2005年に収集された妊婦血液100名分のダイオキシン類濃度（PCDDs 7種、PCDFs 10種、ノンオルソ-PCB 4種合計21種）及び2002-2004年に採取した母体血（269名分）と母乳（60名分）のPCB類（70異性体）を精密に測定した。この結果、前年度までの測定結果と合わせて2002-2004年に採取した母体血（269名分）と母乳（60名分）のダイオキシン類（29種）及びPCB類（70種）濃度の詳細な異性体別濃度を明らかにした。

妊婦269名の内訳は初産婦132名、経産婦137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29.3歳、経産婦では32.4歳であり、血中脂質含量は全体平均0.37%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-PCBs、モノオルソ-PCBsおよびTotal TEQ平均値は、それぞれ、7.4、3.9、4.3、2.4および18.1 pg TEQ/g lipidであった。血中総PCB類濃度は438.1 pg/g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-PCBs、モノオルソ-PCBs および Total TEQ 平均値は、それぞれ、4.6、2.9、3.8、2.5 および 13.7pg TEQ/g lipid であった。母乳中の総 PCB 類濃度は 4,084.9 pg/g であった。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-PCBs の割合は初産婦と経産婦でほとんど同じであった。

#### 11. 尿道下裂症例の内分泌学的予後に関する研究

遠位型尿道下裂 8 例中、低 LH を 1 例、低テストステロンを 2 例に認めた。近位型 18 例では、低 LH 1 例・高 LH 6 例、低 FSH 1 例・高 FSH 6 例、低テストステロンを 5 例に認め、尿道下裂の程度が不明な 4 例では高 LH 1 例・高 FSH 2 例・低テストステロンを 1 例に認めた。

精巣サイズが 10ml 未満であった 9 例中 7 例(78%)で高 LH、8 例(89%)で高 FSH を呈した反面、精巣サイズが 10ml 以上で高 LH/高 FSH を呈した症例は認めず、精巣サイズと高 gonadotrophin 状態には明らかな相関が認められた。また、低 LH を呈した症例は 10~15ml であった 3 例中 1 例(33%)、15ml 以上の 18 例中 1 例(6%)、低 FSH は 5ml 以上の 18 例中 1 例(6%)で認めるのみであった。

他方、高テストステロン値を示した症例は認められず、精巣サイズが 10ml 未満であった 9 例中 4 例(44%)、10~15ml であった 3 例中 1 例(33%)、15ml 以上の 18 例中

3 例(17%)で低テストステロンを認め、精巣サイズが大きくなるとともに低テストステロンを呈する症例の割合が減少していた(図 2a、2b、2c)。

#### 12. バイオマーカー-cytochrome P450 に関する研究

血液では、他の P450 分子種に比べると CYP2A6 は比較的発現レベルが高かった。CYP2A6 および CYP1B1 は AhR によって発現制御を受けていることが我々の実験も含めて示唆されたが、CYP1A1 以外の P450 分子種では、mRNA の発現と血液に蓄積するダイオキシン類との間に、相関関係は得られなかった。

#### 13. ヒト無精子症原因候補遺伝子であるヒト FKBP6 遺伝子に関する研究

ヒト FKBP6 はマウス同様その精巣に特異的な発現パターンを呈した。また mutation 解析を施行したところ、患者 19 名中 4 名において Exon3 においてシトシンからグアニンへの変換をヘテロに認めた。ヘテロを認めた患者 1 名のみの精巣からの RNA を得ることができ、解析したところ、RNA レベルで発現しているのはシトシンのみであった。また同様に解析した正常コントロール 4 名でも RNA レベルではシトシンのみが発現していた、さらに、Exon6 でヘテロを検出した多型部位での解析でも RNA レベルでは mono allelic な発現を呈した。

#### 14. 多嚢胞性卵巣症候群における遺伝子多型に関する研究

CYP17、CYP19、HSD17B5 のアンドロゲン産生関連遺伝子の genotype 頻度は PCOS と正常コントロールにおいて有意差

のないことが判明した。インスリン抵抗性関連遺伝子のうち、IRS-1に関してはPCOS症例で有意に variant allele 陽性例が多いことが判明した(10.6% vs. 4.8%, OR:3.31, 95% CI:1.49-7.35)。RETN に関しては、homozygous variant genotype が PCOS 症例において有意に多いことが判明した(15.4% vs. 8.4%, OR:2.03, 95% CI:1.05-3.92)。

PCOS 症例において、IRS-1、RETN genotype と BMI、FPG、IRI、Adiponectin、Total-testosterone、DHEAS、Androstenedione の値について検討したところ、RETN homogeneous variant genotype において有意に BMI 高値、IRI 高値、HOMA-IR 高値、Adiponectin 低値であったが、IRS-1 genotype による差異は認められなかった。

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

現在まで、HA 抗体陽性かつ IgM 陽性の 48 妊婦がエントリーし、うち 36 人で分娩が終了した。トキソプラズマ IgG avidity 値は、3～80%を示した。初感染とされる 25%未満が 12 人 (25%)、判定保留とされる 25～35%が 9 人、慢性感染とされる 35%以上は 27 人であった。

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。母体血 3/48 人、羊水 2/32 人、臍帯血 0/36 人で PCR が陽性であった。1 症例で、出生前および分娩時羊水中でトキソプラズマ PCR が陽性だった。その新生児は、脳内石灰化を認めたが、臍帯血 PCR と IgM は陰性で、髄液 PCR も陰性であった。本症例妊婦の IgG avidity 値は、23% (28 週)であっ

た。IgG avidity 値 25%以上の 36 人中、胎内感染が認められた症例はいなかった。

#### D. 考察

平成 19 年 1 月までに、北海道の産科病院のうち 42 病院の協力が得られ、参加妊婦人数は、累計 12686 人である。新生児個票の戻った 8351 人中、先天性心疾患 28 人（動脈管開存症 2、心房中隔欠損症 6、ファロー四徴症 4、心室中隔欠損症 14、肺動脈閉鎖 2、心臓内膜床欠損症 2、他）、ダウン症候群 11 人、口唇口蓋裂 9 人、水腎症 8 人、多指症 7 人、副耳、停留精巣各 6 人、無脳症 5 人、口蓋裂、横隔膜ヘルニア各 4 人、水頭症、合指症、直腸肛門奇形、腹壁破裂、異形成腎各、多趾症、合趾症各 3 人等であった（延べ人数）。今度末までに約 13000 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 91 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 4～5 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。

最近の日本における大規模な地域ベースの有病率研究は本研究の他にはなく、今回提示した有病率データは非常に貴重な情報と考えられる。先天性形態異常のあるこどもの出産頻度は、本研究では 2.09%であり、日本で唯一の全国規模の調査である「日本産婦人科医会先天異常モニタリング (JAOG)」(日本産婦人科医会 (日母)、横浜市立大学医学部先天異常モニタリングセンター)の 1.77%に比べて多かった。また、形態異常の疾患ごとの頻度をみると、本研究では水頭症、脊髄髄膜瘤、消化管閉鎖、複雑心奇形など、胎児期に診断され出生直後の集中的な対応が必要とされる重篤な形態異常の頻度が JAOG 調査よりも低い傾向



がみられた。JAOG 調査は全国 331 病院が参加し、全国の出産児の約 1 割が対象となる大規模な病院ベースの貴重な調査であり、その性格から有病率の低い異常を集積し解析する上で大きな意義があると考えられる。一方、本研究は参加規模では JAOG 調査に及ばないが、大規模な地域ベース前向きコホート研究であるという特徴を有しており、一般的な地域の有病率を把握する上で非常に重要である。また、JAOG の協力施設が主に大学病院や地域の中核病院などの大規模病院であり、胎児期から出生直後の集中的な対応の必要な疾患が集積する傾向があるのに対し、本研究では北海道全域の大規模病院や専門病院から開業産科医院までさまざまな規模の施設が参加しており、地域の一般的傾向をよく反映していると考えられる。本研究と JAOG 調査の出産頻度や各疾患の有病率の違いはこれらの研究デザインの違いに起因していると考えられる。

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。日本では、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いる。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、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。

今回対象となった妊婦の血清葉酸値は、 $7.9 \pm 4.1$  ng/ml であった。また、サプリメント非服用者では  $7.4 \pm 3.0$  ng/ml だったのに対し、葉酸サプリメント服用者では  $11.9 \pm 8.3$  ng/ml であり、葉酸サプリメント服用による血清葉酸値の上昇がみられた。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る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、サプリメント非服用者における血清葉酸値が出生体重に及ぼす影響について、血清葉酸値が低い群 (2.5-5.7 ng/ml) において、低出生体重と有意な関連が認められたのに対し、葉酸サプリメント服用者において、有意な関連は見られなかったことから、サプリメント服用により低出生体重に与える影響が低くなると考えられる。しかし、サプリメント服用者の中でも、血清葉酸値が低い (2.5-5.7 ng/ml) 対象者が約 13% 存在している。また、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 か月であることについて、未だ、周知されていない可能性が疑われた。

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り

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。

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、総 PCB 類濃度は加齢とともに増加するが、出産による影響は小さいと推察された。また、血液から母乳へのダイオキシン類および PCB 類の移行は塩素数の多い異性体のほうが移行しにくい傾向にあった。また、血中の PCB・ダイオキシン類濃度には、喫煙や AhR の遺伝子型などが影響を及ぼすことが明らかになった。

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 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19.7 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20-28 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 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13.7 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、すべての検体から PFOS が検出され、血液および母乳中の PFOS 濃度については相関性が示唆された。このことから、PFOS が広く暴露している危険性が示唆された。さらに、母体血中 PFOS 濃度と児の出生体重との間に負の関連がみられたことから、PFOS による次世代影響が懸念される。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19年1月までの本研究への参加妊婦数は、累計12686人であった。また、先天性形態異常のあるこどもの出産頻度は、本研究では2.09%であった。平成17年9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3362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、 $7.9 \pm 4.1$  ng/mlであった。また、サプリメント非服用者では $7.4 \pm 3.0$  ng/mlだったのに対し、葉酸サプリメント服用者では $11.9 \pm 8.3$  ng/mlであり、葉酸サプリメント服用による血清葉酸値の上昇がみられた。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。また、サプリメント服用者では、この負の関連はみられなかった。

2002-2004年に採取した妊婦269名の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-PCBs、モノオルソ-PCBs および Total TEQ 平均値は、それぞれ、7.4、3.9、4.3、2.4 および 18.1 pg TEQ/g lipid であった。血中総 PCB 類濃度は438.1 pg/g であった。また、2004年に

採取した妊婦の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-PCBs、モノオルソ-PCBs および Total TEQ 平均値は、それぞれ、4.6、2.9、3.8、2.5 および 13.7 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出産で低下し、加齢と共に増加する傾向にあるが、総 PCB 類濃度は加齢とともに増加するが、出産による影響は小さいと推察された。また、血液から母乳へのダイオキシン類および PCB 類の移行は塩素数の多い異性体のほうが移行しにくい傾向にあった。また、血中の PCB・ダイオキシン類濃度には、喫煙や AhR の遺伝子型などが影響を及ぼすことが明らかになった。

有機フッ素系化合物に関しても、すべての検体から PFOS が検出され、血液および母乳中の PFOS 濃度については相関性が示唆された。このことから、PFOS が広く暴露している危険性が示唆された。さらに、母体血中 PFOS 濃度と児の出生体重との間に負の関連がみられたことから、PFOS による次世代影響が懸念される。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. Kajiwara J., Todaka T., Hirakawa H., Hori T., Iida T., Washino N., Konishi K., Matuzawa S., Ban S., Sata F., Kishi R. and Yoshimura T. Dioxin and related chemicals concentration in human milk. (2006) *Organohalogen Compounds* 68:1608-1610.
2. Moriya K, Kakizaki H, Tanaka H, Furuno T, Higashiyama H, Sano H, Kitta T and Katsuya Nonomura Long-term cosmetic and sexual outcome of hypospadias surgery: Norm-related study in adolescent. (2006) *J Urol* 176: 1889-1992.
3. Muzandu K, Ishizuka M, Sakamoto KQ, Shaban Z, El Bohi K, Kazusaka A, Fujita S. Effect of lycopene and beta-carotene on peroxynitrite-mediated cellular modifications. (2006) *Toxicol Appl Pharmacol.* 215(3):330-40.
4. Ishizuka M, Lee JJ, Masuda M, Akahori F, Kazusaka A, Fujita S. CYP2D-related metabolism in animals of the Canoidea superfamily - species differences. (2006) *Vet Res Commun.* 30:505-12.
5. 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. (2006) *J Steroid Biochem Mol Biol.* 98(1):48-55.
6. Sasaki S, Kondo T, Sata F, Saijo Y, Katoh S, 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. (2006) *Mol Hum Reprod.* 12(2):77-83.
7. Miyamoto T, Sato H, Yogev L, Kleiman S, Namiki M, Koh E, Sakugawa N, Hayashi H, Ishikawa M, Lamb DJ, Sengoku K. Is a genetic

- defect in FKBP6 a common cause of azoospermia? (2006) *Cell Mol Biol Lett* 11: 567-569.
8. Tanaka K, Yamada H, Minami M, Kataoka S, Numazaki K, Minakami H, Tsutsumi H. Screening for vaginal shedding of cytomegalovirus in healthy pregnant women using real-time PCR: correlation of CMV in vagina and adverse outcome of pregnancy. (2006) *J Med Virol* 78, 757-759.
  9. Sato H, Miyamoto T, Yogev L, Namiki M, Koh E, Hayashi H, Sasaki Y, Ishikawa M, Lamb DJ, Matsumoto N, Birk OS, Niikawa N, Sengoku K. Polymorphic alleles of the human MEI1 gene are associated with human azoospermia by meiotic arrest. (2006) *J Hum Genet* 51: 533-540.
  10. Sasaki Y, Miyamoto T, Hidaka Y, Sato H, Takuma N, Sengoku K, Sugimori H, Inaoka T, Aburano T. Three-dimensional magnetic resonance imaging after ultrasonography for assessment of fetal gastroschisis. (2006) *Magn Reson Imaging* 24: 201-203.
  11. Shimada S, Nishida R, Takeda M, Iwabuchi K, Kishi R, Onoé K, Minakami H, Yamada H. (2006) Natural killer, natural killer T, helper and cytotoxic T cells in the decidua from sporadic miscarriage. *Am J Reprod Immunol* 56, 193-200.
  12. Yamada H, Shimada S, Nishida R, Yakubo K. (2006) Topological factors in placental surface arteries correlate with neonatal birth weight. *Hokkaido J Med Sci* 81(5), 365-370.
  13. Ishizuka M, Okajima F, Tanikawa T, Min H, Tanaka KD, Sakamoto KQ, Fujita S. Elevated warfarin metabolism in warfarin-resistant roof rats (*Rattus rattus*) in Tokyo. (2007) *Drug Metab Dispos.* 35(1):62-6.
  14. Ishizuka M, Nagai S, Sakamoto QK, Fujita S. Plasma pharmacokinetics and CYP3A12-dependent metabolism of c-kit inhibitor imatinib in dogs. *Xenobiotica*. (in press)
  15. Kim HS, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Di-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses tamoxifen-induced apoptosis in GH3 pituitary cells. *Arch Toxicol*. (in press)
  16. Miyamoto T, Yu YS, Sato H, Hayashi H, Sakugawa N, Ishikawa M, Sengoku K. Mutational analysis of the human MBX gene in four Korean families demonstrating microphthalmia with congenital cataract. *Turk J Pediatr* (in press).
  17. 守屋仁彦、田中 博、三井貴彦、野々村克也 内分泌症候群(第2版) II-その他の内分泌疾患を含めて-VII 性分化、発育 その他 尿道下裂と類縁疾患。別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.2 610-613、(2006)
  18. 谷川力、石塚真由美、藤田正一、ワルファリン抵抗性と感受性クマネズミに対するジフェチアロン製剤の効力 衛生学会誌 57(4): 355-359 (2006)
  19. 山田秀人、松田秀雄、上塘正人、丸山有子、平野秀人、松岡 隆、山田 俊、