

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、停留精巢のリスク要因と
内分泌かく乱物質に対する感受性の解明

平成19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

札幌医科大学医学部産科・周産期科／生殖内分泌科

遠藤 俊明

旭川医科大学医学部産婦人科学講座

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

岸 玲子

平成 20 (2008) 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. 先天奇形の発生状況、およびリスク要因についての検討 （水上尚典、岸 玲子、遠藤俊明、石川睦男、千石一雄ほか）	28
2. 尿道下裂とエストロゲンレセプター遺伝子多型との関連 （岸 玲子、野々村克也ほか）	42
3. 母体血中 PFOS・PFOA 濃度と出生時体格との関連 （岸 玲子、中澤裕之ほか）	51
4. 母体血中ダイオキシン類濃度と出生体重および SGA との関連 （岸 玲子、飯田隆雄、梶原淳睦ほか）	56
5. 妊婦の喫煙状態と血中ダイオキシン類との関連について （岸 玲子、飯田隆雄、梶原淳睦ほか）	64
6. ヒト母体血中有機フッ素系化合物の分析および PFCs 移行性に関する研究 （中澤裕之ほか）	71
7. 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）	74
8. 尿道下裂形成術後の下部尿路機能（野々村克也ほか）	84
9. バイオマーカーcytochrome P450 に関する研究（藤田正一ほか）	87
10. 新生児に対するフタル酸エステル曝露を評価するため後方視的検討 （水上尚典ほか）	92
11. ヒト無精子症と化学物質に関する研究（千石一雄ほか）	96
12. 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）	101
13. 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）	104
14. 免疫学的生殖不全病態の解明と治療方法の開発（櫻木範明ほか）	110

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 6 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。また、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を研究して参りました。今後も、生後数年間、児を追跡することにより更に詳細な研究を進め、アレルギー発症への影響についても検討する予定です。

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、この点についてもダイオキシンや喫煙などについて検討してきました。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であろうと考えます。

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 19 年 10 月末までに全道から約 14,500 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 20 年 3 月
主任研究者 水上 尚典

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

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による胎児への健康影響を解明し、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・調査票の回収、(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20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15年1月から平成19年10月までにコホートに参加し子どもの出産前後の情報を記載した新生児個票のある出生児10913名を対象として、先天奇形の頻度、内容を調査したところ、先天奇形のある児は231名、先天奇形総数は281、先天奇形児の出産頻度は2.12%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、形態異常を有する子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、平成15年1月より平成18年12月までに、本研究に参加し自記式調査票に記入した妊娠初期の妊婦9746名を対象として、妊婦の基本的属性や妊娠前後の生活習慣などを先天奇形のリスク要因として検討したところ、妊婦の日常薬使用による先天奇形のオッズ比が有意に上昇し(OR = 2.15; 95% CI = 1.01-4.55)、催奇形性薬剤そのものの作用、あるいは薬物治療を要する疾患あるいは疾患重症度が発症に関与している可能性が考えられた。

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。本研究では、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)を用いてヒト血液中PFCsの高感度分析法を構築し、ヒト母体血(n=447)の分析を行った。また、母体血と同一個人から採取した臍帯血、母乳についても分析を行い、母体血から臍帯血および母乳中へのPFCs移行性について評価した。その結果、全ての母体血、臍帯血および母乳の検体からPFOSが検出された。臍帯血の分析結果は、PFCsが母体血から胎盤を介して臍帯血に移行することが示唆され、子どもは胎児期からPFCsに曝露していると考えられた。また、母乳中のPFCs

濃度は臍帯血と比較してごく微量であったが、母乳は授乳期に母体から大量に分泌され、乳児が毎日摂取するものであることから、母乳栄養を介した乳児のPFCs曝露量の推定を行うことが重要であると考えられた。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($p = 0.033$)。

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及び PCB 類濃度を正確に測定した。2007 年度は母体血 56 名分と母乳 65 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)を異性体別に測定した。母体血中ダイオキシン類平均濃度は 15 pg TEQ/g lipid、母乳中ダイオキシン類平均濃度は 10 pg TEQ/g lipid 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、年齢が上昇すると増加すると推察されたため、2003 年から 2005 年までに分析した 195 名の妊婦の血中ダイオキシン類濃度に対する出産と加齢の影響を統計学的に解析し検証した。その結果、出産により母体中のダイオキシン類濃度は約 20%減少すると推察された。また、年齢の上昇に伴いダイオキシン類濃度も有意に上昇した。さらに、他地域と比較して低濃度のバックグラウンドレベルである本研究の対象者においても、PCDFs 類による出生体重への有意な負の影響($p < 0.001$)ならびに PCDDs/PCDFs による SGA への負の影響($OR = 1.72, p = 0.009$)がみられたことから、ダイオキシン類による次世代影響が懸念された。血中コチニンをバイオマーカーとして、その妥当性を検証するとともに、妊婦の喫煙と血中ダイオキシン類との関連について調べた結果、喫煙者では非喫煙者と比較して、血中 Total non-ortho PCBs、Total non-ortho PCBs TEQ、Total coplanar-ortho PCBs TEQ が、それぞれ有意に低いことが明らかになった(それぞれ β (SD), p 値 = -12.466 (5.712), $p = 0.030$; -0.952 (0.362), $p = 0.009$; -1.171 (0.517), $p = 0.024$)。その結果、高環境的喫煙群では、低環境的喫煙群と比較して、Total non-ortho PCBs、Total PCDFs TEQ、Total PCDD/DFs TEQ、Total TEQ が有意に低いこと(それぞれ β (SD) = -9.826 (4.691), $p = 0.049$; β (SD) = -0.460 (0.205), $p = 0.026$; β (SD) = -1.173 (0.560), $p = 0.037$; β (SD) = -1.794 (0.909), $p = 0.050$)が明らかになった。このことから、今後は妊婦の喫煙習慣だけでなく、周囲の環境も考慮する必要があることが示唆された。*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 PvuII*, *XbaI* の C-A haplotype の割合が尿道下裂群で有意に高く($p = 0.024$)、特に軽症型で高かった($p = 0.002$)。また、AG genotype ならびに G アレルを有する genotype (AG +GG)の頻度が尿道下裂群で有意に高く(それぞれ $OR = 0.55, p = 0.045$; $OR = 0.52, p = 0.048$)、特に軽症型で高かった(それぞれ $OR = 0.37, p = 0.008$; $OR = 0.41, p = 0.009$)。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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 准教授
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
毒性学教室教授
中澤 裕之
星薬科大学大学院薬品分析化学教室教授
梶原 淳睦
福岡県保健環境研究所
食品分析化学専門研究員
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

研究協力者

湯浅 資之、吉岡 英治、坂 晋、
金澤 文子、小西 香苗、鷲野 考揚、
渡邊 亜美、イーラ・タマ・アヨ
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
長 和俊、山田 俊、小西 祥平
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、
中田 彩子、手塚 浩子
星薬科大学薬品分析化学教室
吉村 健清、中村 又善、中川 礼子、
平川 博仙、堀 就英、芦塚 由紀、
村田さつき、新谷 依子、小野塚大介
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
飯田隆雄
北九州生活科学センター
那須民江、伊藤由起
名古屋大学大学院医学系研究科環境労
働衛生学

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、市立士別総合病院、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 20 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、リスク要因を検討した。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した。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した。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した。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。

近年、環境要因やライフスタイルの変化が妊娠女性の健康や胎児の発育に及ぼす影響が懸念されているが、これらについての解明は十分とはいえない。また、日本における先天奇形の有病率はほとんどが病院ベースの調査に基づいており、地域の正確な情報が不足している。そこで、北海道地域の前向きコホート研

究において種々の先天奇形の有病率を明らかにし、加えて形態異常に対する妊婦の基本的属性や妊娠前後の要因のリスクを検討した。

また、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. 先天異常の発生状況およびリスク要因についての検討

1. 対象

1) 先天異常の発生状況

平成 15 年1月から道内の 39 産科施設に通院中の妊婦で本調査に同意した者を連続的にサンプリングし、現在もリクルートを継続している。平成 15 年1月から平成 19 年 10 月までに新生児個票（子どもを出産または死産、流産した場合に病院担当者が子どもの属性などを記載した用紙）のある者（10913 名）を対象とした。

2) 先天異常のリスク要因の検討

平成 15 年 1 月より平成 18 年 12 月までに、本研究に参加し、自記式調査票に記入した妊娠初期の妊婦 9746 名を対象とした。このうち、新生児個票を回収できた 8376 名（回収率 85.9%）のうち、双胎児を出産した 81 名を除外した 8295 名を解析対象とした。

2. 方法

1) 先天異常の発生状況

出産後に医療機関で記載された新生児個票を用いて、各先天異常の発生状況を算出した。

2) 先天異常のリスク要因の検討

妊娠初期に自記式質問紙票を用いて、妊婦の基本的属性と妊娠前後の種々の要因を調べた。また、出産後に医療機関で記載された新生児個票を用いて、子どもの基本的属性（性別、出生時在胎週数、出生時体重）、形態異常の有無について情報を得た。これらの情報をもとに、先天異常のリスク要因の検討を行った。

2. 尿道下裂とエストロゲンレセプター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63名を対象とした。このうち、Klippel-Trenaunay症候群(1名)、VATER症候群(1名)および混合型性腺不全症候群(2名)を除いた59名を解析対象とした。また、専門医により患児の症状を診断し、本研究においては、軽症型40名(penile, coronal, glanular)と重症型19名(penosrotal, scrotal, perineal)として、解析を行った。外来受診時あるいは入院治療時に保護者にインフォームドコンセントのうえ、症例から遺伝子多型のための血液を採取した。

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。母親にインフォームドコンセントのうえ、対照から遺伝子多型のための臍帯血を採取した。

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2002年～2005年に前向きコホート研究を実施した。曝露評価は、妊娠中期から後期に採取した母体血とした。貧血で妊娠中採血できなかった場合、出産後の入院中に血液を採取した。母体血清中のPFOS・PFOA濃度の測定は全て星薬科大学薬品分析化学教室においてLC/MS/MS法で測定された。

447名の母体血中PFOS・PFOA濃度が測定されたが、そのうち双胎、妊娠中毒症、糖尿病、高血圧、胎児心不全を除外した387例について検討した。母体血中PFOS・PFOA濃度を対数変換し、交絡要因を調整し、重回帰分析を行った。なお、PFOA濃度の検出限界以下に関しては、検出限界の半値0.25 ng/mlで解析を行った。

4. 母体血中ダイオキシン類濃度と出生体重およびSGAとの関連

対象者は、2002年7月から2005年10月の間に、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、インフォームドコンセントの得られた母子514組である。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。また、PCB 類・ダイオキシン類測定のために、リクルート時に妊婦の採血を行い、高感度 GCMS 法による母体血中 PCDDs、PCDFs、Coplanar-PCBs の濃度測定を行い解析に用いた。

魚の推定摂取量は、毛髪採取の際に行った魚摂取状況調査より、1 日あたりの推定摂取量(g)を算出して、解析に用いた。

解析には、毛髪水銀データ 430 人、母体血中ダイオキシン類測定データ 270 人(うち1人は異常値を示したため除外)のデータを用いた。両データの揃った対象者は 237 人、どちらか一方のデータがある対象者は 461 人であった。このうち、妊娠中に重症の妊娠中毒症、高血圧症、糖尿病であった対象者および新生児心不全の対象者 22 名を除く 439 名を解析対象とした。

母体血中 PCB 類・ダイオキシン類濃度、毛髪水銀濃度と出生体重との関連には重回帰分析を、SGA との関連にはロジスティック回帰分析を、SPSS Ver13.0 を用いて行った。

5. 妊婦の喫煙状態と血中ダイオキシン類との関連について

1. 対象

対象者は 2002-2004 年に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 23 週-35 週の妊婦である。出産前における血中ダイオキシン類の測定を実施した 254 名のうち、異常値を示したもの(1 名)、血清コチニン値不明者 12 名を除外した 242 名を解析対象者とした。

2. 方法

リクルート時に自記式調査票にて、対象者の基本属性を得るとともに、妊娠中期における喫煙状況(妊娠時に非喫煙、妊娠判明時に禁煙、喫煙)の情報を得た。また、出産前に採血した血液を用いて、血中ダイオキシン類を測定した。また、血清コチニン値を Cozart EIA cotinine Kit (Cozart)を用いた ELISA 法により 2 回測定を行い、平均値を解析に用いた。

6. ヒト母体血中有機フッ素系化合物の分析およびPFCs移行性に関する研究

1. オンライン固相抽出-LC/MS/MS 法による血液試料の測定方法

測定装置としては、高感度・高選択性を有する LC/MS/MS を採用した。また、オンライン固相抽出法を用いることにより、簡便かつ迅速な試料前処理が可能となった。前処理手順としては、まず-80℃で凍結保存した血液試料を室温で解凍し、ピペッターで 100 μL を量り取る。次に内標準物質を含有したアセトニトリルで除タンパクを行い、遠心分離後の上清をフィルターでろ過し、LC/MS/MS による測定に供した。

2. 固相抽出-LC/MS/MS 法によるヒト母乳中 PFCs の測定方法

母乳は血液と比較して PFCs 濃度が極微量であり、脂溶性の夾雑物質を多く含むため、試料前処理に固相抽出法を採用することとし、Oasis WAX カートリッジを検討した。試料量は 5 mL とし、ギ酸で除タンパクした後に固相抽出による精製を行い、50 倍に濃縮して LC/MS/MS で測定した。

7. 妊婦の血液及び母乳中のダイオキシン類、PCB類濃度

2007年度は母体血 56 名分と母乳 65 名分を分析対象とし、ダイオキシン類及び PCB 類を、超高感度精密分析法で測定した。分析方法は血液 5g または母乳 2g を秤取後凍結乾燥し、ダイオキシン類及び PCB 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を直結して精製し、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を装着した高分解能ガスクロマトグラフ・高分解能マスペクトロメーター（HRGC/HRMS）で PCDDs7 種、PCDFs10 種、ノンオルソ-PCB4種の合計 21 種を測定した。

母体中のダイオキシン類濃度の出産および加齢による影響を解析するため、2003 年から 2005 年までに採取し、血中ダイオキシン類濃度を測定した 269 名の妊婦のうち、出産前に採血された 195 名の妊婦の血中ダイオキシン類濃度を統計学的に解析した。解析には SAS 社の統計解析ソフトを用い Mann-Whitney's *U* test と Spearman の順位相関係数を計算した。

8. 尿道下裂症例の内分泌学的予後に関する研究

1. 北海道大学病院泌尿器科にて 6 歳以下で初回手術を施行し、現在 10 歳以上となった尿道下裂症例で尿流量測定、残尿測定を施行した 55 例を対象とした。

評価は、尿流量測定において、Toguri らのノモグラムより尿流量率を normal (N) : >25 パーセントイル値、equivocal (E) : 5-25

パーセントイル値の間、obstruction (O) : <5 パーセントイル値、に分類し、評価した。残尿量は、正常を 20ml 以下または残尿率が 25%以下と定義し、評価を行った。

2. 下部尿路症状に関するアンケートに回答のあった尿道下裂症例 21 例と対照症例 15 例(尿道下裂既往のない男性)に対して、国際前立腺スコア(IPSS)、過活動膀胱症状スコア(OABSS)の下部尿路症状に関するアンケートを郵送し、下部尿路症状の有無について検討した。

9. バイオマーカー cytochrome P450 に関する研究

1. 人の胎盤に発現する CYP1A1

札幌市内病院より妊婦の母体血を採集した。母体血は液体窒素によって凍結し、分析まで -80 °C にて保存した。TotalRNA は TriReagent (Sigma-Aldrich) を用いて抽出した。real-time RT-PCR および DNA マイクロアレイ法によって、P450 やその発現調節因子の mRNA 発現レベルを測定した。

なお、RNAを抽出した血液サンプルに蓄積するポリ塩素化ジベンゾダイオキシン(PCDD: polychlorinated dibenzo-p-dioxins)、ポリ塩素化ジベンゾフラン(PCDF: polychlorinated dibenzofurans)、コプラナー PCB (cp-PCB : coplanar polychlorinated bi-phenyls)のダイオキシン類は、福岡県保健環境研究所によって測定された。

2. 複合汚染下でのバイオマーカー

野生のドブネズミは大阪、東京から採集した。汚染亢進地区としてごみ埋立場、汚染の進んでいない地域として北海道離島より溝鼠を採

集した。肝臓の脂肪画分から GC-MS を用いて、PCDD、PCDF、co-PCB、DDT などの有機塩素系農薬、ジフェニルエーテルなどの臭素系難燃剤の蓄積濃度を調べた。

また、肝臓より RNA を抽出し、DNA マイクロアレイを用いて、汚染域で変動する遺伝子について検索した。

10. 新生児に対するフタル酸エステルの曝露を評価するため後方視的検討

1. 対象

2001 年から 2005 年までの 5 年間に当院 NICU に入院した児 1613 名のうち、妊娠 35 週未満で出生した 265 名を対象に、出生時から生後 1 か月まで持続的に経鼻あるいは経口より栄養チューブを必要とした児 62 名で検討した。なお生後 1 か月までに輸血を行った児および消化管手術を行った児は除外した。

2. 研究方法

2003 年 4 月以前に塩化ビニル製の栄養チューブを使用していた児を A 群(n=39)、それ以降 PVC フリーの栄養チューブを使用していた児を B 群(n=23)に分け、臍帯血および生後 1 か月の凍結保存血清を用いて、フタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) の代謝物であるフタル酸モノ 2 エチルヘキシル (MEHP) 濃度を測定し比較検討した。

検査は名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学のご協力で、GC-MS6890/5973N (Agilent technologies 社製)を用い行った。

測定条件は以下の通りであった。

HP-5MS 5%phenyl methyl siloxane キャピラリーカラム (長さ 30m×内径 0.25mm×膜厚 0.25 μm) キャリアーガス: 高純度ヘリウム、初期流量 1ml/分、注入 1min-split、カラム温

度 80°C 2 分→20°C/分→260°C 5 分、注入口 Split ratio 50:1、スプリットレス、SIM mode

検体は血清 60 μl を用い、酢酸エチルによる抽出およびシリル化誘導を行い GC/MS にて特定のイオンのみを拾う SIM モードで測定した。内部標準液として MEHP を重水素置換体したものをを用いた。

3. 統計学的方法

A, B の 2 群間比較、および母乳と MEHP 濃度の関係の検討には Mann-Whitney の U 検定を用いた。また線形回帰解析を用いて生年月日と MEHP 濃度の関係を検討し、Wilcoxon の符合付順位和検定を用いて臍帯血と生後 1 か月の MEHP 濃度の関係を検討した。生後 1 か月の MEHP 濃度に影響する因子は、重回帰解析を行い検討した。

なお、 $p < 0.05$ を有意とした。

11. ヒト無精子症と化学物質に関する研究

ヒト FKBP6 の発現様式を解析するために、Clontech 社のヒト成人 cDNA パネル (15 臓器) を鋳型として PCR 法を施行した。対象は組織学的に減数分裂停止による無精子症と診断された患者 19 名及び正常コントロール 40 名である。本研究に参加したすべての患者及び正常コントロールは全て文章による同意を得た後に血液を採取し、DNA を抽出した。全ての患者は染色体異常がないこと、またその Y 染色体の微小欠失が存在しないことが確認されている。

更に、ヒト FKBP6 の coding region である Exon1 から Exon8 までの隣接するイントロンにプライマーを各々設定し、PCR 法を施行してダイレクトシーケンス解析した。これにより検出された single nucleotide polymorphism (SNP) において、正常コントロ

ール群でも同様に PCR 及びダイレクトシーケンス解析を施行した。

また、検出された 2 つの SNP において genomic imprinting の有無を解析するために患者精巣及び正常精巣組織から各々 RNA を抽出し、RT-PCR 法を施行し、それぞれダイレクトシーケンス解析を施行した。

12. 多嚢胞性卵巣症候群における遺伝子多型に関する研究

症例は札幌医科大学附属病院婦人科で診断された多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) 症例 123 例、対象は北海道大学医学部附属病院を受診した正常産後症例 380 例とした。EDTA を含んだ採血管に末梢血を採血した全血から DNA を抽出し、TaqMan PCR 法で SNP を検出した。PCOS 症例については、身長と体重計測に加え、月経 3-5 日目に採血して Follicle stimulating hormone (FSH)、Luteinizing hormone (LH)、Estradiol、Prolactin、Total testosterone、Free testosterone、Androstenedione、Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS)、Fasting plasma glucose (FPG)、Fasting insulin (IRI)、Adiponectin 値を測定した。インスリン抵抗性の診断は、homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) を用い、 $HOMA-IR \geq 2.0$ をインスリン抵抗性ありと診断した。なお、HOMA-IR の計算式は以下となる： $HOMA-IR = FPG (mg/dl) \times IRI (\mu IU/ml) \div 405$ 。

また、ホルモン値など臨床パラメーターの比較のため、出産例以外の健常者を新コントロール群として抽出し、PCOS 群と非出産健常コントロール群とで新たに検討することとした。

13. 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。

14. 免疫学的生殖不全病態の解明と治療方法の開発

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。

次に、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。

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. 先天奇形の発生状況、および形態異常のリスク要因についての検討

1) 先天異常の発生状況

本コホートの参加者のうち、平成19年10月末までに出産（生産、死産、流産）した妊婦（＝新生児個票が提出された妊婦）10913名のうち、先天異常のあるこどもの総数は231名、形態異常の総数は281（マーカー異常187、その他94）で、先天異常を有する児の出産頻度は2.12%であった。主な先天異常は、先天性心疾患41人、ダウン症候群14人、水腎症14人、口唇口蓋裂11人、停留精巣10人、多指症8人、口蓋裂7人、尿道下裂6人、口唇裂2人などであった。

2) 先天異常のリスク要因の検討

先天異常を有する妊婦と有しない妊婦の属性を比較した結果、先天異常を有する妊婦は、有しない妊婦と比較して、日常薬を使用している割合が有意に高い結果であった（ $p =$

0.006）。また、先天異常を有する妊婦は、有しない妊婦と比較して、妊娠前における鉄剤摂取を行っている妊婦の割合は、有意に高い結果であった（ $p = 0.047$ ）。さらに、先天異常を有する妊婦は、有しない妊婦と比較して、妊娠中の血清葉酸値が有意に高い値であった（ $p = 0.008$ ）。ロジスティック回帰分析の結果、日常薬の使用が有意に先天異常に対するリスクを高めていた（OR = 2.15, 95% CI = 1.01-4.55）。

先天異常を有する妊婦と有しない妊婦との間で、出産時の項目を比較した結果、先天異常を有する妊婦は、有しない妊婦と比較して、有意に在胎週数が短く（ $p < 0.001$ ）、出生体重が低い（ $p < 0.001$ ）結果が得られた。また、先天異常を有する妊婦では、有しない妊婦と比較して、性別判定不能の割合、早産または流産、死産、羊水異常の割合が有意に高かった（それぞれ $p < 0.001$ ）。

2. 尿道下裂とエストロゲンレセプター遺伝子多型との関連

ESR1 *Xba*I の G アレルならびに G アレルを有する genotype (AG +GG) は、それぞれ尿道下裂と有意な負の関連を示した（それぞれ OR = 0.55, $P = 0.045$; OR = 0.52, $P = 0.048$ ）。また、*ESR2* 2681-4A>G について、尿道下裂群における AG genotype ならびに G アレルを有する genotype (AG +GG) の頻度が有意に低い割合であった（それぞれ OR = 0.43, $P = 0.008$; OR = 0.50, $P = 0.016$ ）。

C-A haplotype の割合は尿道下裂群で有意に高く（ $P = 0.024$ ）、C-G haplotype の割合は対照群で有意に高かった（ $P = 0.048$ ）。また、C-A/C-A の組み合わせは他の組み合わせと比較して、有意に尿道下裂と正の関連を示した（OR = 3.07, $P = 0.024$ ）。

ESR1 PvuII の CC genotype は軽症型尿道下裂と有意な正の関連を示した (OR = 2.13, $P = 0.047$)。 *ESR2 2681-4A>G* について、軽症型尿道下裂における AG genotype ならびに G アレルを有する genotype (AG +GG) の頻度が有意に低い割合であった (それぞれ OR = 0.37, $P = 0.008$; OR = 0.41, $P = 0.009$)。

C-A haplotype の割合は軽症型尿道下裂で有意に高かったが ($P = 0.002$)、重症型ではみられなかった。 C-A/C-A の組み合わせの場合、他の組み合わせと比較して、有意に高い軽症型尿道下裂に対するオッズ比を示した (OR = 4.84, $P = 0.002$) が、重症型ではみられなかった。

3. 母体血中PFOS・PFOA濃度と出生時体格との関連

PFOS・PFOA 濃度と出生時体格の関連を調べるため、母年齢、母学歴、妊娠中喫煙状況、母 BMI、妊娠週数、出産回数 (第 1 子か否か)、児の性にて調整した結果、PFOS と出生時体重で有意な負の相関が得られた ($p = 0.033$)。

4. 母体血中ダイオキシン類濃度と出生体重およびSGAとの関連

Total PCDFs ($\beta = -321.9, p < 0.001$) と Total PCDFs TEQ ($\beta = -269.3, p < 0.05$) において、有意に出生体重を減少させる結果であった。毛髪水銀濃度と出生体重との関連は見られなかった。男児と女児に分けてみると、同様の有意な関連は男児においてのみみられた。

SGA に与える母体血中ダイオキシン類濃度の影響について解析したところ、Model I では Total PCDDs (オッズ比 : 1.70)、Total

PCDFs/PCDDs (オッズ比 : 1.72)、Total PCDFs TEQ (オッズ比 : 1.70) は、SGA のリスクを上昇させる傾向がうかがえた。一方、母親の毛髪水銀濃度は SGA のリスクを有意に下げる (オッズ : 0.64) 結果であった。毛髪水銀濃度をさらに調整因子として投入した Model II においても、同様の傾向がみられた。

5. 妊婦の喫煙状態と血中ダイオキシン類との関連について

1. 血清コチニン値による喫煙状態の妥当性

本研究の対象者において、血清コチニン値 15 ng/mL による喫煙の分類は妥当であると考え、本研究ではこの分類による喫煙状態 (非喫煙者 200 名、喫煙者 42 名) を使用した。

2. 喫煙による血中ダイオキシン類濃度への影響

重回帰分析により、喫煙による血中ダイオキシン類濃度への影響を調べた結果、喫煙者では非喫煙者と比較して、血中 Total non-ortho PCBs、Total non-ortho PCBs TEQ、Total coplanar-ortho PCBs TEQ が、それぞれ有意に低いことが明らかになった (それぞれ β (SD), P 値 = -12.466 (5.712), $P = 0.030$; -0.952 (0.362), $P = 0.009$; -1.171 (0.517), $P = 0.024$)。

3. 環境的喫煙による血中ダイオキシン類濃度への影響

非喫煙群を 2 分位 (低環境的喫煙群 100 名、高環境的喫煙群 100 名) し、喫煙群 42 名を加えた 3 群を用いて、環境的喫煙による血中ダイオキシン類濃度への影響を調べた結果、高環境的喫煙群では、低環境的喫煙群と比較して、Total non-ortho PCBs、Total PCDFs TEQ、Total PCDD/DFs TEQ、Total TEQ

が有意に低いこと(それぞれ β (SD) = -9.826 (4.691), $P = 0.049$; β (SD) = -0.460 (0.205), $P = 0.026$; β (SD) = -1.173 (0.560), $P = 0.037$; β (SD) = -1.794 (0.909), $P = 0.050$) が明らかになった。その一方で、喫煙群では、低環境的喫煙群と比較して、Total non-ortho PCBs、Total PCDD/DFs TEQ、Total non-ortho PCBs TEQ、Total coplanar-ortho PCBs TEQ、Total TEQ (それぞれ β (SD) = -17.319 (6.183), $P = 0.006$; β (SD) = -1.472 (0.738), $P = 0.047$; β (SD) = -1.219 (0.392), $P = 0.002$; β (SD) = -1.496 (0.562), $P = 0.008$; β (SD) = -2.968 (1.199), $P = 0.014$) が有意に低いことが明らかになった。

6. ヒト母体血中有機フッ素系化合物の分析および PFCs 移行性に関する研究

1. オンライン固相抽出-LC/MS/MS 法によるヒト血液中 PFCs の高感度分析法の構築および精度管理

本法による定量限界は、全ての測定対象物質において 0.5 ng/mL と高感度な分析が可能であった。血漿試料を用いた添加回収試験 (n=6) においても、平均回収率 93.3% と良好な結果が得られた。また、分析法の安定性および精確性を確保するため、内部および外部精度管理を実施し、いずれにおいても良好な結果が得られたことから、本法の高い安定性および正確性が確認された。

2. ヒト母体血中 PFCs の測定結果

本研究で構築したオンライン固相抽出-LC/MS/MS 法により、北海道に居住する妊婦ボランティア 447 名の母体血を測定した。その結果、PFOS は全ての検体から検出され、その濃度範囲は 1.3~16.2 ng/mL であった。

また、PFOA についても 93.1% の検体から N.D.~5.3 ng/mL の濃度範囲で検出された。また、妊娠回数の増加に伴って、血中 PFOS および PFOA 濃度が減少していく傾向がみられた。このことより、母体は PFCs に暴露されており、臍帯および母乳を介した子どもへの PFCs 暴露が示唆される。

3. 臍帯血、母乳中の PFCs の測定結果および子どもへの移行性評価

ヒト母体血から高頻度に PFCs が検出されたことから、同一個人から採取した臍帯血 (n=41) および母乳 (n=41) についても測定を行った。その結果、臍帯血においては全ての検体から PFOS および PFOA が検出され、母体血中の濃度と有意な相関性が見られた (PFOS; $r=0.83$ 、PFOA; $r=0.87$)。また、母体血と同一個人から採取した母乳試料については、固相抽出法-LC/MS/MS 法を用いて測定を行った。その結果、PFOS および PFOA は全ての検体から検出され、その平均値はそれぞれ 71.0 pg/mL、74.6 ng/mL であった。また、臍帯血と同様に、母乳においても、母体血中の濃度と有意な相関性がみられた。このことから、PFCs は、ヒト母体血から臍帯血および母乳中に移行し、子どもに暴露していることが示唆された。

7. 妊婦の血液及び母乳中のダイオキシン類、PCB 類濃度

2007 年に分析した母体血 56 名分と母乳 65 名分のダイオキシン類 (21 種) の分析を行った結果、母体血を採取した 56 名の妊婦の平均年齢は 31.2 歳であり、母乳を採取した母親の平均年齢は 31.6 歳であった。母体血中の Total TEQ 平均値は 15pg TEQ/g lipid であり、母乳中の Total TEQ 平均値は 10 pg

TEQ/g lipid であった。母乳中ダイオキシン類（初産婦 39 名および経産婦 26 名）の濃度平均値はそれぞれ 11 及び 9.3 pg TEQ/g lipid であった。母体血中ダイオキシン類（初産婦 26 名および経産婦 30 名）濃度平均値はそれぞれ 17 及び 14 pg TEQ/g lipid であった。母乳および母体血中のダイオキシン類濃度の平均値はいずれも初産婦の方が経産婦より高かった。

母体中のダイオキシン類濃度の出産および加齢による影響を解析するため、2003 年から 2005 年までに分析し血中ダイオキシン類濃度を測定した 269 名の妊婦のうち、出産前に採血された 195 名の妊婦の血中ダイオキシン類濃度（初産婦 101 名、経産婦 94 名）平均値はそれぞれ 17 及び 14 pg TEQ/g lipid であった。

8. 尿道下裂症例の内分泌学的予後に関する研究

1. 尿流量測定において、obstruction は 10 例(18%)で認められたが、equivocal 15 例(27%)、normal 30 例(55%)であり、正常と考えられる equivocal+ normal は 45 例(82%)であった。残尿量（正常：20ml 以下または残尿率が 25%以下）は、46 例(84%)で正常であった。

遠位型、近位型に分けて検討を行ったが、尿流量率は、遠位型で obstruction 3 例(13%)、equivocal 5 例(23%)、normal 15 例(65%)であり、近位型では obstruction 7 例(22%)、equivocal 10 例(31%)、normal 15 例(47%)で両群間に有意差を認めなかった。残尿量についても、遠位型 2 例(9%)、近位型 7 例(22%)で異常を呈したが、両群間に有意差を認めなかった。

2. IPSS は、尿道下裂症例で 1 例(5%)中等度の下部尿路症状を認めたのみで、他の症例は軽度の下部尿路症状のみであった。対照群は、全例軽度の下部尿路症状のみであった。

OABSS では、尿道下裂症例の 1 例(5%)に過活動膀胱を認めるのみで、その他の症例には認めなかった。対照群では、全例過活動膀胱は認めなかった。

9. バイオマーカーcytochrome P450 に関する研究

1. 人の胎盤に発現する CYP1A1

人の胎盤では、CYP1A1 は検出されたが、その発現は低く、検出できない個体もあった。また、蓄積するダイオキシン類との相関性は得られなかった。マイクロアレイなどについては、現在解析中である。

2. 人生活圏の複合汚染下でのバイオマーカー

人生活圏に密着して棲息するドブネズミからは高濃度の残留性有機汚染物質が検出された。特に、ドブネズミの肝臓におけるダイオキシン類は、1300～21,000pg-TEQ/g(lipid)の範囲で蓄積してした。非汚染域の対照用としたラットは 16～23pg-TEQ/g(lipid)と低かった。有機塩素系農薬は、その殆どを DDT が占めた。

また、今回の分析により、ドブネズミの肝臓では新規 POPs であるポリ臭素化ジフェニルエーテルの濃度が高いことが分かった。

3. 複合汚染下でのバイオマーカー

肝臓に発現する遺伝子群では、CYP 分子種は棲息域によって以下のような発現レベルの違いを示した。多くの CYP 分子種の中でも、汚染亢進域で唯一共通して発現増加を示した

のは CYP1A1 および CYP1A2 のみであった。

一方、重金属や活性酸素種などによって発現が上昇するいわゆるストレスタンパク質の遺伝子群は、複合汚染下のラットにおいて、酸化ストレスなどで発現が上昇する熱ショックタンパク質(HSP)やヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)に増加が見られた。抗酸化酵素(スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)、カタラーゼ(Catalase)、グルタチオンパーオキシダーゼ(GPx))以外はいずれも発現が上昇していることが明らかとなった。

10. 新生児に対するフタル酸エステルの曝露を評価するため後方視的検討

臨床的背景では、妊娠週数、出生体重等でA群、B群間に有意差を認めなかったが、唯一母体の分娩既往において、B群で経産婦が多く有意差を認めた。

MEHP濃度の比較では、臍帯血および生後1か月で、A群がB群に比べ高く有意差を認めた。

臍帯血のMEHP濃度の経年的変化を、縦軸にMEHP濃度、横軸に生年月日を取り検討した結果、臍帯血および生後1か月のMEHP濃度で、有意な経年的減少を認めた。しかしA群、B群に分け、同様に回帰解析を行った結果、有意な減少は認めなかった。

臍帯血と生後1か月のMEHP濃度の関係を検討した結果、臍帯血に比べ生後1か月のMEHP濃度は高く、有意差を認めた。また、A群、B群に分け同様に検定を行い、両群とも有意差を認めたが、明らかにA群はB群に比べ生後1か月のMEHP濃度が高く検出された。

最後にA、B群に関係なく、生後1か月のMEHP濃度と母乳栄養との関係性を評価した。結果、人工栄養に比べ母乳を使用していた児

では、MEHP濃度は高く有意差を認めた。

以上の結果をもとに、生後1か月のMEHP濃度に影響する因子を評価するため重回帰解析を行った。結果、塩化ビニル製チューブの使用の有無のみが、MEHP濃度に影響を与える因子として抽出された。

11. ヒト無精子症と化学物質に関する研究

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。このシトシンからグアニンへの変換により早期にストップコドンが出現し、コードされるアミノ酸は正常では327個であるが、わずか60個となり不完全なFK506 binding domainが形成される。そこで正常コントロールでも同様にシーケンス解析したところ、40名中4名において同様なヘテロの配列を認めた。しかしながら、このグアニンがRNAレベルで発現し、不完全なアミノ酸をコードしているとは考えにくい。そこで、ヒトFKBP6はgenomic imprintingを受けているのではないかとの仮説のもとに解析を進めた。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。

12. 多嚢胞性卵巣症候群における遺伝子多型に関する研究

インスリン抵抗性関連遺伝子のうち、IRS-1

に関しては多嚢胞性卵巣症候群(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)。一方、ENPP 1、apM1 の genotype 頻度に関しては、PCOS 症例とコントロール症例において、有意差は認められなかった。

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。

13. 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。

14. 免疫学的生殖不全病態の解明と治療方法の開発

1. 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。

2. 免疫グロブリン(Ig)薬理作用機構の解明を目的として、poly(I:C) 誘導の流産マウスモデル(CBA/J×DBA/2J)を作成した。流産マウスモデルへのインタクト型 Ig 投与(0.8g/kgを3日間 i.p)によって、流産率は55%から10%に抑制された。しかし、Fab 型 Ig の投与では、この流産抑制効果は認められなかった。流産抑制効果は、Ig の Fc 部分を介するものと考えられた。この 0.8g/kg, 3 日間の投与方法では、ヒト Ig 治療に用いられる投与量に近似する。また、流産マウスモデルに Ig 負荷非妊娠マウスから得られた脾細胞を養子移入することによって、この流産抑制効果が再現できたことから、Ig により刺激を受けた脾細胞分画が流産抑制効果に介在することが判明した。次に、胎盤の RT-PCR 解析により、poly(I:C) 刺激により上昇した IFN- γ ならびに TNF- α mRNA が正常レベルまでに抑制されることが明らかとなった。したがって、流産マウスモデルにおける Ig の流産抑制効果は、局所での炎症性サイトカイン産生の抑制によると考えられる。

D. 考察

平成 19 年 10 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 14,422 人である。新生児個票の戻った 10,913 人中、先天異常のある児の総数は 231 名、先天奇形の総数は 281（マーカー奇形 187、その他 94）で、先天奇形を有する児の出産頻度は 2.12%であった。主な先天異常は、先天性心疾患 41 人（動脈管開存症 5、心房中隔欠損症 6、ファロー四徴症 4、心室中隔欠損症 18、肺動脈閉鎖 3、他）、ダウンス症候群 14 人、水腎症 14 人、口唇口蓋裂 11 人、停留精巣 10 人、多指症 8 人、口蓋裂 7 人、尿道下裂 6 人、口唇裂 2 人などであった（延べ人数）。

本研究で示した先天奇形の有病率データは、日本における大規模な地域ベースの点で、これまでにない非常に貴重な情報であると考えられる。先天奇形の有病率は、これまでの報告は調査形態、対象者の選択などが一定ではないため、単純な比較は困難である。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）と比較すると、先天奇形の出産頻度は、本研究では 2.12%であり、JAOG の 1.77%に比べて多い結果であった。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、複雑心異常など、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 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 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、このことは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大規模病院であり、胎児期から出生直後の集中的な対応が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 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。

本研究では、日常薬の使用が有意に先天奇形に対するオッズ比を上昇させていたことから、薬剤そのものの作用、あるいは薬物治療を要する疾患あるいは疾患重症度が発症に関与している可能性が考えられた。しかし、日常薬の中は多種にわたっている。また、今回の解析に用いた先天奇形にも種々の疾患がある。そのため、今後はそれぞれの疾患と薬の使用を個別に検討する必要がある。そのためには、個別の疾患数が現地点では不足しており、今後も参加妊婦を増加させる必要がある。また、本研究においては、喫煙、職業的化学物質曝露などと先天異常との関連がみられなかった。この原因として、用いた調査票が対象者による自記式であることから、実際の曝露状況と対象者本人の曝露感覚との不一致などが考えられる。今後、採血保存している血中の化学物質等の測定をすすめ、疾患との関連を検討する必要がある。

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したところ、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 であったが、本研究における初産婦（平

均年齢 31.2 才)の血中ダイオキシン類濃度は 15 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、今回の北海道での母乳中ダイオキシン類濃度は 10 pg-TEQ/g lipid であったのをはじめ、これまでに本研究で測定した血中及び母乳中のダイオキシン類濃度(2003-2005 年)は過去の測定値と比較すると低かった。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。

2003 年から 2007 年までに合計 415 名の血液と 125 名の母乳中のダイオキシン類及び PCB 類濃度の分析データが蓄積されている。これまでも血液中ダイオキシン類濃度が出産により低下することや加齢に伴い上昇することが報告されているが、このような大規模な母集団を対象とした解析は稀である。2003 年から 2005 年に採取した 195 名の妊婦の血中ダイオキシン類濃度の解析により、初産婦、経産婦ともに 100 名前後の集団の血中ダイオキシン類濃度を解析した結果、PCDD、PCDF、ダイオキシン様 PCB 類および総ダイオキシン類の血中濃度は出産により約 20%低下することが示唆された。また、初産婦、経産婦とも年齢の上昇に伴いダイオキシン類濃度が有意に上昇することを統計学的に明らかにした。

本研究では、生体暴露評価に応用できる迅速かつ高感度・高精度な有機フッ素系化合物に対する分析法を構築し、ヒト母体血(n=447)の分析に適用した結果、全ての検体から PFOS が検出されたことから、母体は PFCs に広く暴露していると考えられ、子どもの PFCs 暴露評価の重要性が示唆された。そこで、

PFCs の移行性が示唆されている臍帯血および母乳中についても分析を行ったところ、それらすべての検体から PFOS および PFOA が検出された。臍帯血の分析結果は、PFCs が母体血から胎盤を介して臍帯血に移行すると示唆しており、子どもは胎児期から PFCs に暴露していると考えられる。また、母乳中の PFCs 濃度は臍帯血と比較してごく微量であったが、母乳は授乳期に母体から大量に分泌され、乳児が毎日摂取するものであることから、母乳栄養を介した乳児の PFCs 暴露量の推定を行うことが重要であると考えられる。

E. 結論

平成 19 年 10 月までに、本研究コホートに参加した計 14,422 人から出生した新生児 10,913 人中、先天異常のある児の出産頻度は 2.12%であった。これは、病院をベースとした「日本産婦人科医会先天異常モニタリング(JAOG)」の発生頻度と比べ多く、また重篤な形態異常の頻度が JAOG 調査よりも低い傾向にあった。このことは地域ベースで行なわれている本研究が一般的な地域の有病率を把握していることの査証と考えられた。

今回測定した母体血中の Total TEQ 平均値は 15pg TEQ/g lipid であり、母乳中の Total TEQ 平均値は 10 pg TEQ/g lipid であった。PCDD、PCDF、ダイオキシン様 PCB 類および総ダイオキシン類の血中濃度は出産により約 20%低下することが示唆された。また、初産婦、経産婦とも年齢の上昇に伴いダイオキシン類濃度が有意に上昇することが明らかになった。また、妊婦の能動的喫煙ならびに環境的喫煙曝露が母体血中ダイオキシン類の濃度に影響を与えることが明らかになった。さらに、他地域と比較して低濃度のバックグラウンドレベルである本研究の対象者においても、